



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

GRADO EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍAS INDUSTRIALES

**Selección de alternativas de detoxificación de
material lignocelulósico para la producción de
biocombustibles oxigenados**

Autor:

Aguado García, Jaime

Tutores:

García Cubero, María Teresa

Coca Sanz, Mónica

**Departamento de Ingeniería
Química y Tecnología del Medio
Ambiente**

Valladolid, Julio, 2020.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Jaime Aguado García
Grado en Tecnologías Industriales



Resumen

Se ha estudiado la eficiencia de la etapa de detoxificación de material lignocelulósico mediante resinas de intercambio iónico. Los ensayos con medios modelo han permitido seleccionar la resina y concentración más adecuadas (Lewatit MP500, 2% p/p), consiguiendo la eliminación completa de vanílico, vainillina, siríngico y cumárico, 69,62% de 4-hidroxibenzoico, 53,8% de siringaldehído, 32,68% de ferúlico y 37,74% de fenoles. La implementación de la detoxificación en el proceso de obtención de butanol a partir de bagazo de cerveza, realizando pretratamiento térmico, (pH 1, con H₂SO₄, 121°C, 15% sólidos, 30 min), posterior hidrólisis enzimática (0,27g/gMS de enzimas), detoxificación y fermentación con *Clostridium beijerinckii*, han proporcionado un rendimiento de 0,306g/g de butanol y 0,396g/g de ABE en la etapa de fermentación.

El coste estimado de la planta es 1389150€ y el coste de producción anual es de 1203942.9€. La inclusión de la etapa de detoxificación en el proceso implica un coste adicional de 0,15€/kg BSG.

Palabras clave: Detoxificación, resinas, bagazo de cerveza, biobutanol, fermentación ABE.

Abstract

The efficiency of the detoxification stage of lignocellulosic material has been studied using ion exchange resins. Tests with model media have allowed selecting the most suitable resin and concentration (Lewatit MP500, 2% w / w), achieving complete elimination of vanillic, vanillin, syringic and fumaric acids, 69,62% of 4-hydroxybenzoic, 53,8% of syringaldehyde, 32,68% of ferulic acid and 37,74% of phenols. The implementation of detoxification in the butanol obtaining process from brewers' spent grains, carrying out thermal pretreatment, (pH 1, with H₂SO₄, 121°C, 15% solids, 30 min), subsequent enzymatic hydrolysis (0.27g / gMS of enzymes), detoxification and fermentation with *Clostridium beijerinckii*, have provided a yield of 0.306g / g of butanol and 0.396g / g of ABE in the fermentation stage.

The estimated capital cost of the plant is 1389150€ and the cost of annual production is 1203945€. The inclusion of this detoxification phase in the process implies an additional cost of 0,15€/kg BSG.

Keywords: Detoxification, resins, brewers' spent grain, biobutanol, ABE fermentation.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Jaime Aguado García
Grado en Tecnologías Industriales



ÍNDICE

1. Introducción	7
1.1 Biomasa lignocelulósica	8
1.1.1 Estructura lignocelulósica.....	12
1.1.1.1 Celulosa.....	12
1.1.1.2 Hemicelulosa	13
1.1.1.3 Lignina.....	14
1.2 Bagazo de cerveza.....	15
1.2.1 Producción de cerveza	16
1.2.2 Composición del bagazo de cerveza	18
1.2.3 Usos del bagazo.....	20
1.3 Biocombustibles	23
1.3.1 Clasificación atendiendo a la materia prima	24
1.3.1.1 Primera generación.....	24
1.3.1.2 Segunda generación.....	24
1.3.1.3 Tercera generación	27
1.3.1.4 Cuarta generación	29
1.3.2 Clasificación atendiendo a la fase.....	30
1.3.2.1 Biocombustibles gaseosos.....	30
1.3.2.2 Biocombustibles sólidos.....	31
1.3.2.3 Biocombustibles líquidos	31
1.3.2.4 Biobutanol.....	34
1.4 Fermentación ABE	39
1.4.1 Producción de biobutanol a partir de materia lignocelulósica	39
1.4.1.1 Pretratamiento	40
1.4.1.2 Hidrólisis.....	43
1.4.1.3 Detoxificación.....	45
1.4.1.4 Fermentación	54
2. Objetivos	65
3. Procedimiento experimental	67
3.1 Selección de resinas de intercambio iónico para detoxificación. Ensayos en medio modelo	67
3.1.1 Resinas de intercambio iónico.....	67
3.1.2 Medios modelo.....	70
3.1.3 Descripción de los ensayos realizados	71
3.2 Ensayos en medios reales	72
3.2.1 Diagrama de bloques del proceso completo	72
3.2.2 Descripción de los ensayos realizados	74
3.2.2.1 Pretratamiento ácido y térmico	74
3.2.2.2 Hidrólisis enzimática	74
3.2.2.3 Detoxificación.....	75
3.2.2.4 Inoculación y fermentación.....	75



3.3 Métodos analíticos	76
4. Resultados.....	79
4.1 Ensayos en medios modelo.....	79
4.1.1 Resinas fuertes	79
4.1.1.1 Líquido pretratado.....	80
4.1.1.2 Hidrolizado enzimático	84
4.1.2 Resinas débiles	86
4.1.2.1 Líquido pretratado.....	86
4.1.2.2 Hidrolizado enzimático	90
4.1.3 Resumen de resultados con medio modelo	92
4.2 Ensayos en medio real	92
4.2.1 Rendimientos de detoxificación	93
4.2.1.1 Líquido pretratado.....	93
4.2.1.2 Hidrolizado enzimático	96
4.2.3 Resumen de resultados con medios reales	98
4.2.4 Rendimientos de fermentación	98
5. Análisis económico	105
6. Conclusiones.....	111
7. Bibliografía.....	113
8. Anexos.....	119



1. Introducción

El desarrollo de la sociedad y el aumento del crecimiento de la población ha generado una gran demanda de comida y energía. En los últimos tiempos, la población mundial ha dependido de los combustibles fósiles y de sus productos derivados [1], ya que prácticamente toda la energía usada en el mundo ya sea para actividades industriales, transporte u hogares, está basada en combustibles fósiles [2, 3]. La utilización de este tipo de combustibles es el principal contribuyente del incremento de CO₂ en la atmósfera [3], del empeoramiento de la calidad del aire por la presencia de materia de partículas, productos gaseosos de combustiones incompletas, CO y NO_x [2], hecho que contribuye al aumento de la temperatura global y causa multitud de problemas en el medioambiente [3, 4].

Mientras que para procesos como la generación de calor o de electricidad hay varias alternativas renovables (Hidroeléctrica, eólica, solar, etc.), el sector transportes depende mucho del petróleo [5, 6]. Aproximadamente 84 millones de barriles de crudo son utilizados al día, y se espera que en 2030 aumente hasta los 116 millones. En Estados Unidos y Europa, el sector transporte representa un 60% de esta demanda, y la producción de plásticos y materiales químicos, un 4% [7]. Sin embargo, cada vez hay más concienciación en los gobiernos del mundo y en la sociedad con las emisiones de gases de efecto invernadero [2], poniendo de su parte para buscar soluciones.

La electricidad renovable es una interesante opción para descarbonizar el sector transporte, pero los vehículos eléctricos no contribuyen aún de una manera significativa al descenso de GEI. Otra opción es el uso de biocombustibles, que pueden sustituir, a corto plazo, los combustibles derivados del petróleo usados en transporte, ya que pueden ser usados en infraestructuras y motores ya existentes [5].

La emisión de GEI depende de la fuente de biomasa y su uso de la tierra, por lo tanto, la elección de la biomasa para biocombustibles es crítica [8]. La rápida expansión de los cultivos de 1G, basados en cultivos alimenticios, se convirtió en un problema debido a la deforestación, pérdida de biodiversidad y los monocultivos [5], por ello, el biocombustible debe derivarse de una materia prima que no entre en competencia con alimentos o piensos, como desechos forestales, municipales o cultivos ricos en celulosa [5, 8], haciendo que los precios de cultivos no aumenten, que no haya cambios de uso de la tierra [9] y que los GEI sean menores en comparación a los fósiles [8]. La biomasa es la materia prima más lógica a base de carbono que se obtiene de plantas, microorganismos y animales [10]. La naturaleza y componentes principales de esta biomasa (celulosa, hemicelulosa y lignina), hacen necesaria una etapa extra para llevar a cabo la fermentación y conversión en biocombustible, a parte



del pretratamiento e hidrólisis, que es la detoxificación, para poder eliminar los compuestos inhibidores liberados tras realizar las anteriores etapas [8].

Una sola acción no resuelve todos estos problemas, sino que se requieren más, como la modernización y expansión del transporte público, avances en los vehículos o incluso economía circular en el uso de la biomasa, para hacer un uso más eficiente de la materia prima, pero tener objetivos como la directiva de la UE (UE) 2015/1513, en el que se dice como objetivo que el 25% del transporte para 2030 sea con biocombustibles 2G es un gran avance [7].

1.1 Biomasa lignocelulósica

Según la Agencia Internacional de Energía, la biomasa se define como cualquier materia orgánica que proviene de fuentes biogénicas y está disponible de forma renovable [7].

Los problemas asociados con la rentabilidad y la falta de disponibilidad de sustratos convencionales son uno de los desafíos de la fermentación ABE en la era actual. La investigación debe centrarse en buscar los materiales menos costosos y más abundantes, reducir el riesgo de escasez de alimentos y la sequía y la infertilidad del suelo, y resolver los problemas de los compuestos intermedios que inhiben el crecimiento de cepas y la producción de ABE [11].

Los microorganismos utilizados en este tipo de fermentación, del género *Clostridia*, utilizan una gran variedad de sustratos, haciendo posible la utilización como materia prima de la biomasa lignocelulósica [12]. Su disponibilidad global en grandes cantidades y el hecho de que casi nada de la biomasa potencialmente disponible se está utilizando actualmente [13], son razones por las cuales la biomasa lignocelulósica se considera uno de los recursos más prometedores para la futura generación de bioenergía. Sin una mayor reutilización de estos, estos desechos simplemente se venden a bajo precio, se vierten, se dejan en el campo o se incineran, lo que crea una mayor contaminación ambiental. Por lo tanto, la utilización de estos desechos para la generación de biocombustibles es una alternativa beneficiosa para el medio ambiente [6].

Cada año, se producen alrededor de 2×10^{11} toneladas de biomasa lignocelulósica [12], siendo, por tanto, la fuente de azúcar renovable más abundante. En la actualidad, la biomasa representa el 9.8% del uso de energía primaria del mundo anualmente, entre los cuales el 30% se usa en formas modernas y el 70% se usa tradicionalmente (combustión para calefacción doméstica con una densidad de energía de 15-20 MJ / kg) [12].

La biomasa lignocelulósica se puede clasificar de varias formas, como por ejemplo, en biomasa virgen, biomasa residual y cultivos energéticos. La

biomasa virgen incluye todas las plantas terrestres naturales como los árboles, arbustos y pastos. La biomasa residual se produce como un subproducto de bajo valor de varios sectores industriales como el agrícola (residuo de maíz, bagazo de caña de azúcar, paja, etc.), forestal (desecho de aserraderos y fábricas de papel). Los cultivos energéticos que tienen un alto contenido lignocelulósico sirven como materia prima para la producción de biocombustibles de segunda generación como la caña de azúcar [3].

También se puede clasificar en función de su origen, pero la clasificación más aceptada es la que se puede observar en la Figura 1, dividiéndose en , plantas enteras (cultivos energéticos dedicados, pastos perennes y plantas acuáticas), residuos agrícolas (pastas, hojas, raíces, mazorcas, paja, cáscaras, semillas y vainas de semillas), desechos agrícolas (estiércol sólido de ganado), biomasa forestal de madera blanda y dura), desechos forestales (astillas, tajos, ramas de árboles muertos, aserrín, residuos de poda), desechos industriales (pulpas químicas y sólidos de aguas residuales primarias) y desechos sólidos municipales (desechos de alimentos, periódicos, papel madera y desechos clasificados) [6, 13, 14, 15]

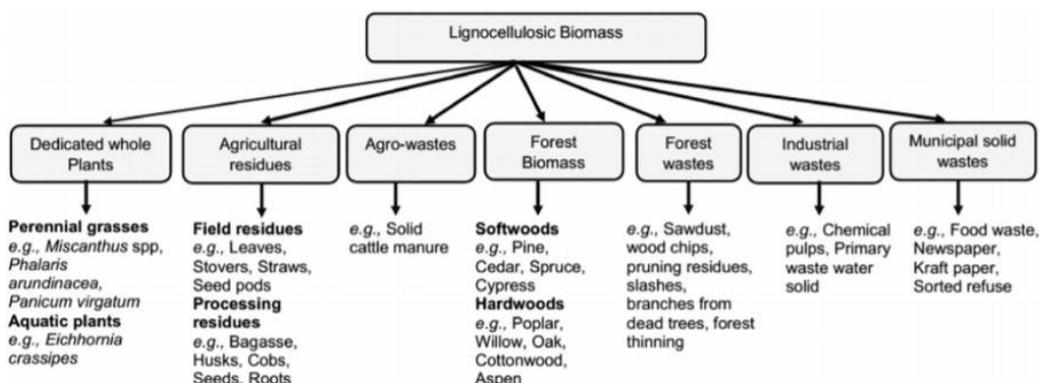


Figura 1. Distintos tipos de biomasa lignocelulósica. [15]

Los componentes de los materiales lignocelulósicos se pueden dividir en:

- **Holocelulosa:** Conjunto compuesto por la hemicelulosa, celulosa y lignina. Son los componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica. La holocelulosa suele constituir alrededor del 70% del peso total de la biomasa [10], correspondiendo a los polisacáridos de alto peso molecular (celulosa y hemicelulosa) entre un 60-80% del peso, mientras que la lignina, es entre el 20-30% del peso [15].
- **Componentes secundarios:** Son componentes que están en una menor proporción, estando divididos en dos: Porciones menores de extractos como resinas, clorofila, ácidos grasos, diferentes sustancias fenólicas, etc. y cenizas, es decir, minerales extraíbles ricos en Ca, K, Mg y Si [7,

10, 12]. A diferencia del contenido lignocelulósico, estos componentes son responsables del olor y el color de la madera, actúan como depósitos de energía y protegen a las plantas de los ataques microbianos [10].

La composición bioquímica y los diferentes componentes varían en la biomasa lignocelulósica dependiendo del material. Características como el aspecto físico, la eficiencia de producción de los biocombustibles, la resistencia, y la producción de energía dependen de la concentración de estos componentes [7, 10].

En promedio, como se puede ver en la Figura 2, la lignocelulosa está compuesta por celulosa (35-50%), hemicelulosa (25-35%) y lignina (10-25%) [12, 14, 15, 16]. Aunque la celulosa es un componente, en principio, constante de la mayoría de los tipos de biomasa celulósica [16], las proporciones y la composición de las hemicelulosas y la lignina cambian entre las especies como se ha señalado anteriormente. En la Tabla 1 se puede ver las distintas composiciones de varios materiales lignocelulósicos.

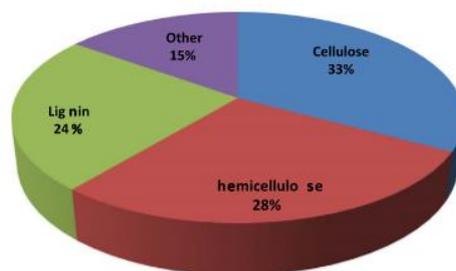


Figura 2. Composición media de la lignocelulosa. [3]

El factor principal a considerar en la utilización de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles es el rendimiento de azúcar que podría obtenerse del proceso de hidrólisis. El rendimiento de azúcar depende del tipo de sustrato, el tratamiento previo y el proceso de hidrólisis. La estructura que presente la biomasa lignocelulósica (madera dura o blanda, tamaño y estructura fibrosa) y la composición química (azúcar potencial) son criterios importantes a considerar [14].

Lignocelulosic material	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Hardwood stems	40–55	24–40	18–25
Softwood stems	45–50	25–35	25–35
Nut shells	25–30	25–30	30–40
Corn cobs	45	35	15
Grasses	25–40	35–50	10–30
Paper	85–99	0	0–15
Wheat straw	30	50	15
Sorted refuse	60	20	20
Leaves	15–20	80–85	0
Cotton seed hairs	80–95	5–20	0
Newspaper	40–55	25–40	18–30
Waste papers from chemical pulps	60–70	10–20	5–10
Primary wastewater solids	8–15	NA	24–29
Swine waste	6	28	NA
Solid cattle manure	1.6–4.7	1.4–33	2.7–5.7
Coastal Bermuda grass	25	35.7	6.4
Switchgrass	45	31.4	12.0

Tabla 1. Composición de celulosa, hemicelulosa y lignina en % de varios materiales lignocelulósicos. [3]

La evolución de la estructura que tiene la lignocelulosa ha hecho poder resistir la degradación y dar robustez estructural a las paredes celulares de las plantas. (Figura 3) Proporciona rigidez y recalcitrancia natural hacia la hidrólisis enzimática, factor que dificulta la conversión de la biomasa en biocombustibles [3, 10, 12, 14].

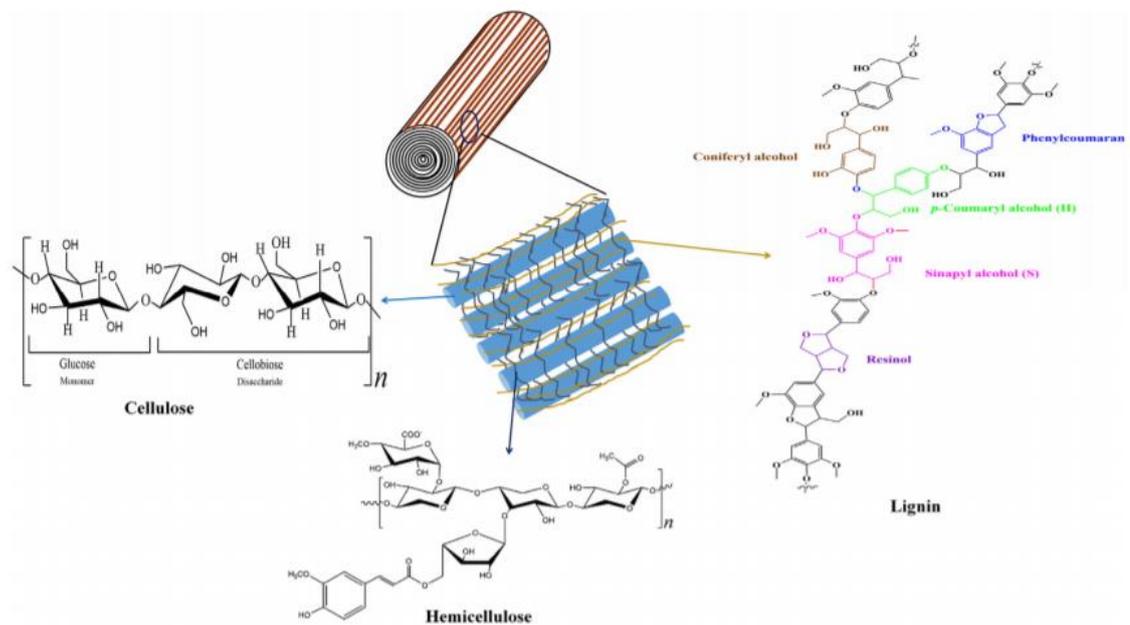


Figura 3. Estructura del material lignocelulósico. [10]

Para obtener estos biocombustibles, se requiere un tratamiento previo para eliminar las barreras físicas y químicas que hacen que la biomasa primitiva sea recalcitrante, separando las celulosas y hemicelulosas de la lignina y haciendo

que la celulosa sea susceptible a la hidrólisis enzimática [16]. Tras ello, tendría lugar la conversión en monosacáridos simples mediante hidrólisis ácida o enzimática, para ser utilizados posteriormente por los microorganismos en el proceso de fermentación [3, 10, 12, 13, 16, 17]. La relación entre los factores relacionados con la estructura y composición muestra la complejidad de los materiales lignocelulósicos y explica la variabilidad en los resultados de los mencionados procesos de los diferentes tipos de biomasa [10, 15].

1.1.1 Estructura lignocelulósica

1.1.1.1 Celulosa

La celulosa es un homopolímero lineal y cristalino de unidades repetitivas de glucosa unidas por enlaces β -1, 4 glucosídicos [1, 8, 18]. La larga cadena lineal de polímeros de celulosa, que tiene alrededor de 10.000 unidades de glucosa, están unidas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, por lo que está empaquetada en microfibrillas y las cadenas tienden a organizarse en paralelo, formando una estructura cristalina organizada (1, 5). (Fig. 4).

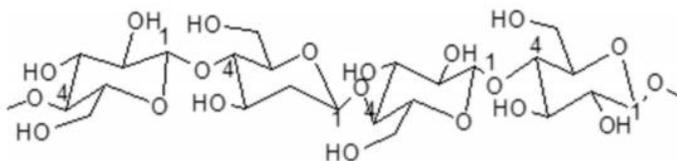


Figura 4. Estructura de la celulosa. [1]

La celulosa está físicamente asociada con la hemicelulosa, y física y químicamente asociada con la lignina [14, 19]. Las moléculas de celulosa individuales están unidas para formar unas moléculas llamadas fibrillas elementales, que están formadas por unas 40-100 cadenas de celulosa. Éstos después se unen mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares en subunidades más grandes llamadas microfibrillas [12, 19], como se observa en la Figura 5. Las fibrillas elementales presentan fases alternas de celulosa altamente ordenada (cristalina) y de celulosa orientada al azar (amorfa) insertada en una matriz de hemicelulosa [14, 18]. La primera proporciona resistencia, mientras que la parte amorfa proporciona elasticidad [19].

Esta estructura presente en la celulosa junto con la presencia de lignina y hemicelulosa hace que el acceso de las enzimas de celulasa a la celulosa se vuelva difícil, reduciendo así la eficiencia del proceso de hidrólisis [14].

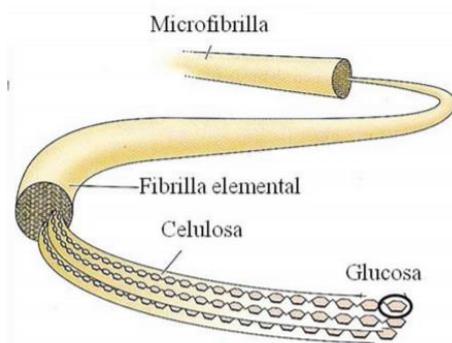


Figura 5. Estructura de una microfibrilla. [19]

La cristalinidad de la celulosa influye en la capacidad de consumir las enzimas de la biomasa lignocelulósica porque las regiones altamente ordenadas son muy compactas y, por lo tanto, las hace resistentes a las enzimas y a los ácidos [10]. La celulosa amorfa, por su parte, puede sufrir una hidrólisis mucho más rápida en comparación. [5, 8, 10]. En segundo lugar, el grado de polimerización de celulosa (DP) también es una indicación de la naturaleza recalcitrante de la biomasa. Cuanto más corta es la cadena de celulosa, más rápida es la hidrólisis de la celulosa. La reducción de DP puede mejorar el grado de hidrólisis enzimática, pero hay que tenerse en cuenta que el cambio en DP siempre va acompañado del cambio de otros factores como la cristalinidad [10].

1.1.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero corto, heterogéneo y altamente ramificado. Es un heteropolímero de D-xilosa, D-arabinosa, D-glucosa, D-galactosa y D-manosa y algunos ácidos orgánicos como el ácido acético y glucurónico [1, 5, 8, 18]. La hemicelulosa tiene una estructura lineal y ramificada con columna vertebral de unidades repetidas del mismo azúcar (homopolímero) o mediante una mezcla de diferentes azúcares (heteropolímero) (Fig. 6) [1, 10]. Está presente en la pared celular, siendo su principal función la unión entre la celulosa y la lignina.

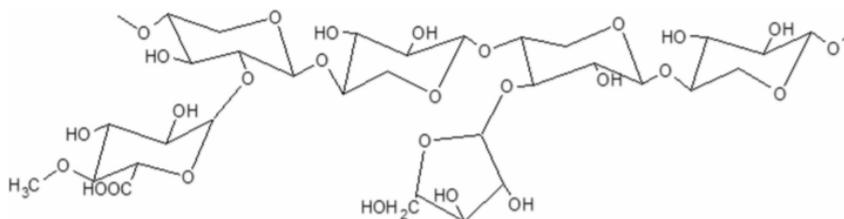


Figura 6. Estructura de la hemicelulosa. [1]

Además de las diferencias en la composición química, la hemicelulosa también difiere de la estructura de la celulosa en otros aspectos, que incluyen: 1) el tamaño de la cadena, que es mucho más pequeña (contiene aproximadamente

50-300 unidades de azúcar); 2) la presencia de ramificaciones en las moléculas de la cadena principal, y 3) es amorfo y menos resistente a los químicos [1, 5]. Se dice que la hemicelulosa actúa como barrera física que limita el acceso a la enzima, pero el impacto no es tan importante como el efecto de la cristalinidad de la celulosa y la lignina, sin embargo, también se ha sugerido que la eficiencia de la hidrólisis enzimática aumenta al eliminar las hemicelulosas de la biomasa [10].

1.1.1.3 Lignina

La estructura de la lignina no está formada por unidades de azúcar, sino por unidades de fenilpropano unidas por distintos tipos de enlaces, principalmente de éter [18], en una forma tridimensional grande y muy compleja. Generalmente se encuentran tres alcoholes fenilpropiónicos como monómeros de lignina, que incluyen los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Fig. 4) [1, 7, 20]. La lignina está estrechamente ligada a la celulosa y la hemicelulosa y su función es proporcionar rigidez y cohesión a la pared celular del material [1, 5], dar impermeabilidad al agua a los vasos de xilema y formar una barrera fisicoquímica contra el ataque microbiano [10]. La lignina, por lo tanto, es de naturaleza hidrófoba y mediante su unión a los polímeros de celulosa y hemicelulosa, forma la barrera fisicoquímica que protege del ataque microbiano y adsorbe las enzimas [1, 10]. Este hecho hace necesario un pretratamiento que solubilice o degrade este compuesto para que la estructura hemicelulósica sea accesible al ataque enzimático y microbiano [1].

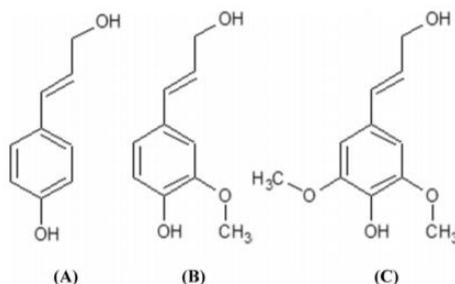


Figura 7. (A) p-cumarílico, (B) coniferílico (C) sinapílico, bloques constructivos principales de la lignina tridimensional. [1]

La lignina es un producto de gran valor agregado, ya que tiene varias aplicaciones en diferentes campos y aspectos. La estructura macromolecular le proporciona una química altamente energética y puede utilizarse fácilmente para generar energía y como combustible en otras industrias, como la industria de la pulpa y el papel [7, 20]. La lignina se puede usar como materia prima para generar hidrógeno en un proceso de biorefinería, la fermentación oscura [21]. Los monómeros de fenol aromático de la lignina son una fuente adecuada para generar compuestos químicos de alto valor agregado que pueden usarse

para la fabricación de bioplásticos y bioadhesivos [7]. Se sabe que la lignina tiene el potencial de mejorar la estabilidad mecánica del plástico biodegradable producido a partir de recursos agrícolas [21]. El uso de enzimas ligninolíticas como lacasas en lugar de comunidades de microorganismos es otra alternativa factible para la delignificación de la lignocelulosa [20]. Por lo tanto, eliminar la lignina de la biomasa puede llegar a tener una gran importancia por el uso en diversas aplicaciones.

1.2 Bagazo de cerveza

La industria cervecera genera cantidades relativamente grandes de subproductos y residuos, siendo los más comunes el bagazo de cerveza, el lúpulo gastado y la levadura. Como la mayoría de estos residuos son de componente agrícola, su reutilización es más sencilla y son reciclables. Por lo tanto, en comparación con otras industrias, la industria cervecera tiende a ser más respetuosa con el medio ambiente [22].

El bagazo de cerveza es el subproducto más abundante de la industria cervecera, siendo alrededor de un 85% del total de subproductos generados [22]. Se estima que unos 20kg de bagazo de cerveza (80% de humedad en peso) son producidos por cada 100 L de cerveza, además de corresponder a un 31% del peso original de la malta [23, 24, 25]. En 2016, la producción anual de bagazo en el mundo fue de 39 millones de toneladas, de las cuales 3.4 millones fueron producidas en Europa [9] y 0.6 millones de éstas, producidas en España (2017) [26].

Tras un período de latencia de 4 a 6 semanas, la cebada se maltea en un proceso de germinación controlado, que sirve para aumentar el contenido enzimático del grano. La malta se realiza en tres pasos: remojo, germinación y secado o cocción. En la industria cervecera, la cebada malteada se muele, se mezcla con agua en el puré y se aumenta la temperatura lentamente de 37 a 78°C para realizar la hidrólisis enzimática de los componentes de la malta, principalmente almidón, pero también otros componentes como los arabinoxilanos, (1/3, 1/4)- β -glucanos y proteínas, y para solubilizar sus productos de descomposición. Durante este proceso, el almidón es convertido en azúcares fermentables (como maltosa y maltotriosa) y azúcares no fermentables (dextrinas), y las proteínas se degradan parcialmente a polipéptidos y aminoácidos. Esta etapa de conversión enzimática, llamada macerado, produce un líquido dulce conocido como mosto. La fracción insoluble y no degradada del grano se deja sedimentar, filtrándose el mosto a través de ella (lautar). La fracción sólida residual resultante del filtrado se conoce como “bagazo de cerveza” (BSG) [22]. Dependiendo del tipo de cerveza que se produzca, el BSG puede consistir en los residuos de la cebada malteada,

o los de la cebada malteada y sus complementos, como el trigo, el arroz o el maíz agregados durante la fase de macerado [22, 24].

El mosto filtrado se usa como medio de fermentación para producir cerveza. Para llevar a cabo esta fermentación, se suele utilizar la bacteria *S.cerevisae*, y para completar la elaboración de cerveza, habría un posterior envasado para su distribución [27].

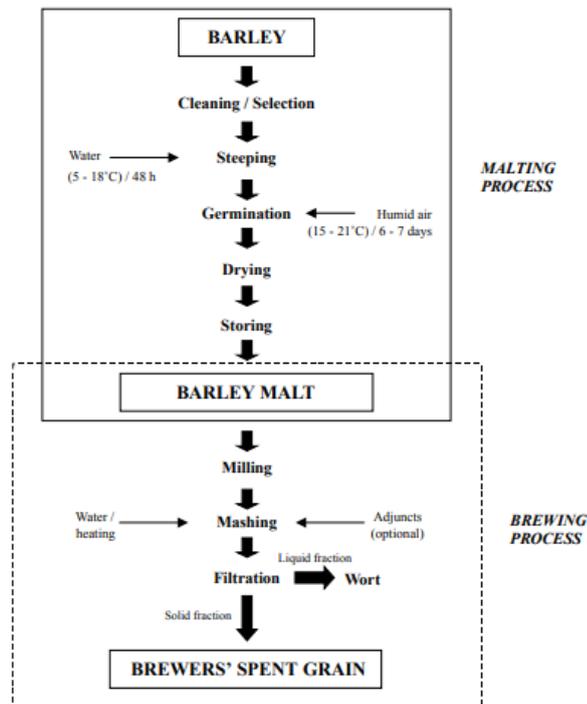


Figura 8. Representación esquemática del proceso de obtención del bagazo de cerveza a partir de la cebada. [22]

1.2.1 Producción de cerveza

España ha aumentado su consumo de cerveza durante los últimos 10 años. En 2018 el consumo total de cerveza ha superado la barrera de los 40 millones de hectolitros, un 1,5% más que el año pasado [27].

España ha experimentado un creciente interés por esta bebida en los últimos años, prueba de ello es la evolución de cifras referentes a centros de elaboración: en 2018 había 538 cerveceras registradas, 18 más que en el año anterior. Cataluña encabeza el ranking, con 111 centros [27].

EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN EN ESPAÑA EN LOS ÚLTIMOS 10 AÑOS (millones de hectolitros)¹⁸

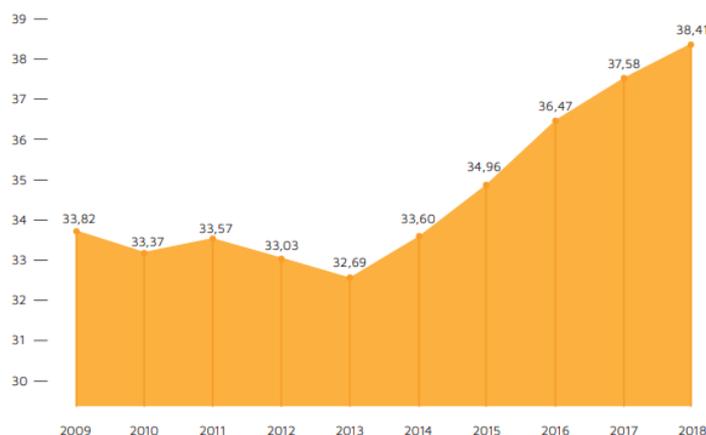


Figura 9. Evolución de la producción de cerveza en España. [27]

Las cerveceras produjeron en España un 2,2% más de cerveza, alcanzando los 38,4 millones de hectolitros, como se observa en la Figura 9.

Esta capacidad y potencia de las cerveceras en nuestro país mantiene a España como cuarto productor europeo, por detrás de Alemania, Reino Unido y Polonia, y undécimo mundial, tal y como se puede observar en las Figuras 10 y 11.

PRODUCCIÓN DE CERVEZA EN EUROPA (miles de hl)¹⁸



Figura 10. Producción de cerveza en Europa. [27]

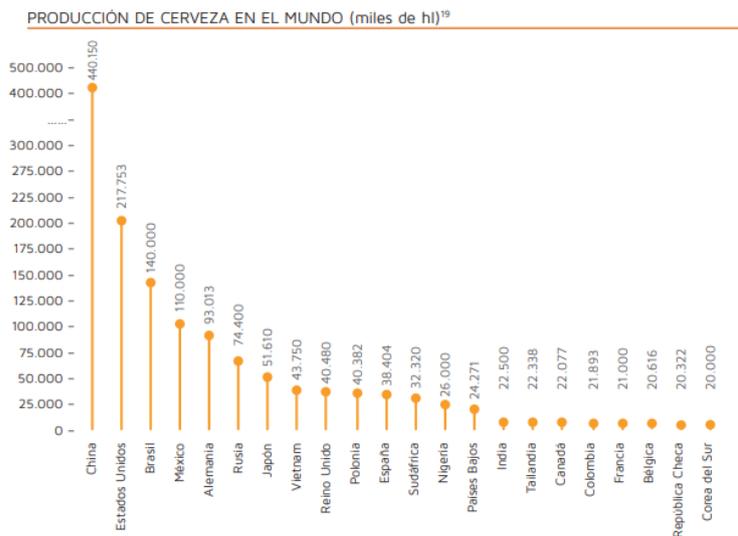


Figura 11. Producción de cerveza en el mundo. [27]

1.2.2 Composición del bagazo de cerveza

La cebada es la principal materia prima utilizada para la producción de cerveza. El grano de cebada es rico en almidón y proteínas y consta de tres partes principales: el germen (embrión), el endosperma (que comprende la aleurona y el endosperma almidonado) y los recubrimientos cáscaras de grano. La última puede dividirse en tres partes, enumerándolas de adentro hacia afuera: la capa de semillas, las capas más internas que rodean la aleurona; sobre la capa de semillas se encuentran las capas de pericarpio, que, a su vez, están cubiertas por la cáscara (Fig. 12) [24, 25].

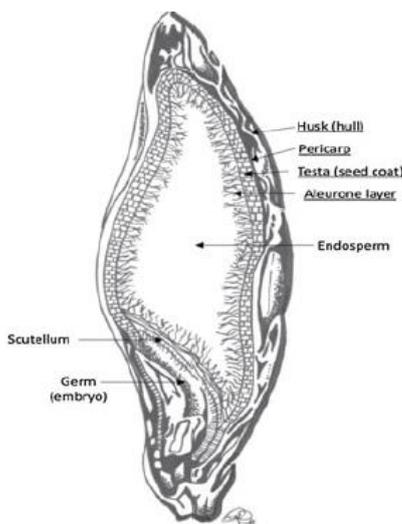


Figura 12. Sección transversal de un grano de cebada que muestra los recubrimientos de granos (subrayados) que constituyen el bagazo de cerveza. [24]

El bagazo de cerveza (BSG) consiste básicamente en las capas de cáscara-pericarpio-capa de semilla que cubrieron el grano de cebada original [22, 24, 25]. Dependiendo de la uniformidad del malteado, también pueden permanecer más o menos endospermo amiláceo y paredes de células vacías de aleurona. El contenido de almidón será insignificante (debido a la ausencia de endosperma almidonado [25]), y algunos residuos de lúpulo introducidos durante el macerado estarán presentes dependiendo del régimen de preparación utilizado. Por lo tanto, los componentes principales de BSG serán las paredes de la cubierta de la cáscara-pericarpio-semilla, que son ricas en celulosa y polisacáridos no celulósicos y lignina, y pueden contener algunas proteínas y lípidos. La cáscara también contiene cantidades considerables de sílice y gran parte de los componentes polifenólicos del grano de cebada [22].

La composición química de BSG varía de acuerdo con la variedad de cebada, el tiempo de cosecha, las condiciones de malteado y maceración, y la calidad y el tipo de complementos agregados en el proceso de elaboración [22]; pero en general, este residuo, además de los componentes anteriormente dichos, también contiene proteínas insolubles [25]. La composición media del bagazo de cerveza se puede observar en la Figura 13:

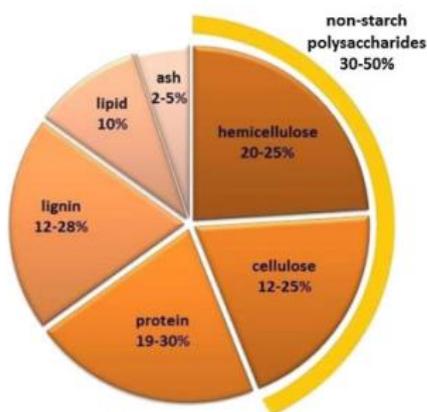


Figura 13. Composición media de bagazo de cerveza. [24]

Como se ha comentado anteriormente, BSG también es rico en compuestos fenólicos, particularmente ácidos ferúlico y p-cumárico junto con oligosacáridos y polisacáridos [25].

Vitaminas, aminoácidos y minerales también se encuentran en BSG. Los elementos minerales incluyen calcio, cobre, cobalto, hierro, magnesio, potasio, selenio, sodio, manganeso, fósforo, y azufre, todos en concentraciones inferiores al 0,5% [22].

Otro asunto importante a tratar dentro de su composición es la humedad que contiene el bagazo de cerveza tras haber sido obtenido. Debido a su alta

humedad y contenido de azúcar fermentable, el bagazo es un material muy inestable y puede deteriorarse rápidamente debido a la actividad microbiana [22]. Presenta un alto contenido de humedad (77-81%) y, si no se usa dentro de los cinco días posteriores a su producción, el crecimiento microbiano causa un rápido deterioro [23]. Su uso por los granjeros locales como alimento para el ganado se debe principalmente a la propensión al deterioro debido al alto contenido de humedad [23]. Sin embargo, la oferta a menudo puede superar la demanda, haciendo que el exceso de bagazo se extienda en campos agrícolas o se deposite en vertederos [9].

Además del problema del deterioro, la humedad presenta otro inconveniente para su transporte y almacenamiento. También se ha comprobado que, aunque al producirse el bagazo puede considerarse microbiológicamente estable, la proliferación de bacterias indica que el material es propenso a un cambio rápido después de su producción. Por lo tanto, este material debe estabilizarse y almacenarse en condiciones apropiadas después de la producción si se va a utilizar en una etapa posterior. Se recomienda que el contenido de humedad se reduzca a ~ 10% para prolongar el tiempo de almacenamiento [24].

Se han propuesto varios métodos para prolongar el tiempo de almacenamiento del bagazo. Mezclas de ácido acético, fórmico, láctico o benzoico-agua-BSG envasadas en recipientes de plástico han sido probadas preservando todas las calidades y el valor nutricional del bagazo [22]. Se han examinado varios métodos físicos de conservación, incluidos el secado en horno, la liofilización, la congelación y el uso de vapor sobrecalentado. El secado al horno se considera el método más adecuado para preservar el bagazo; sin embargo, debe realizarse a temperaturas de menos de 60 ° C porque las temperaturas más altas pueden generar sabores desagradables. Un método de secado alternativo es utilizar vapor sobrecalentado. Se demostró que este método era ventajoso porque consumía menos energía que el secado en horno, mejoraba la recuperación de compuestos orgánicos valiosos y mejoraba la eficiencia del secado [24].

1.2.3 Usos del bagazo

Este material presenta una gran cantidad de usos, desde los tradicionales hasta otros de reciente descubrimiento:

- Tradicionalmente, la principal aplicación del bagazo ha sido como **alimento para animales** (principalmente para ganado), debido a su alto contenido de proteínas y fibra, además, presenta un alto contenido en carbohidratos, proteínas, celulosa, hemicelulosa y lignina, así como sustancias fácilmente disponibles, como azúcares y aminoácidos. Todo esto junto con su bajo costo, ha hecho que sea utilizado como alimento

para animales siendo empleado principalmente por granjas locales [23]. Su consumo ha sido investigado para animales como aves de corral, cerdos, pescados y pollo [22] demostrando ser beneficioso, ya que aumenta la producción y la calidad de la leche de vaca por ejemplo, pero su alto contenido de lignina la hace indigesta para muchas especies animales [9]. El BSG es un excelente ingrediente alimenticio para rumiantes, ya que se puede combinar con fuentes de nitrógeno de bajo costo, como la urea, para proporcionar todos los aminoácidos esenciales [23, 25]. Como alimento para animales, el BSG puede usarse en su forma húmeda, poco después de la separación del mosto en el lavado, o como material seco [23].

- Debido a su bajo coste y su alto valor nutritivo, el bagazo ha sido evaluado para la **introducción en las dietas humanas**, especialmente cuando es necesario aumentar el contenido de fibra, disminuir el contenido calórico y aumentar el contenido de proteínas de los productos alimenticios [25]. Principalmente ha sido probado en la fabricación de copos de cereales, galletas, aperitivos y pan de trigo integral [23, 25]. Sin embargo, el bagazo es demasiado granular para la adición directa en los alimentos, por lo que se debe convertir primero en harina. La harina preparada a partir del bagazo se puede incorporar con éxito en una serie de productos de panadería, incluidos panes, muffins, brownies, etc. [25] Existen algunas limitaciones en el uso de esta harina como aditivo proteico o como reemplazo de las harinas actualmente utilizadas, debido a su color y sabor. Su color marrón sólo le permite ser usado en productos de color blanquecino, mientras que, por las alteraciones provocadas en el sabor y propiedades físicas, como la textura, solo se pueden incorporar cantidades de entre 5-10% [23]. También las paredes celulares de los residuos del grano de cebada en BSG son ricas en celulosa y polisacáridos no celulósicos, los cuales se pueden degradar en sus constituyentes, como glucosa, xilosa, manosa, etc. Estos productos son de importancia industrial como precursores de productos químicos de grado alimenticio (fibra dietética [24]), cosméticos, farmacéuticos o fuentes de energía en fermentaciones microbianas [22,25]. La ingestión de BSG y sus derivados es beneficioso para la salud, proporcionando por ejemplo un aumento del peso fecal y mayor excreción de colesterol y grasa [23,24].
- Otro uso propuesto para BSG es en la **producción de energía**, ya sea por combustión directa o por fermentación para producir biogás (una mezcla de 60-70% de metano, dióxido de carbono y pequeñas proporciones de nitrógeno, hidrógeno, y monóxido de carbono) [23]. El proceso de combustión necesita un secado previo del bagazo hasta un

55% de humedad [23]. Las emisiones de NO_x y partículas de polvo son los inconvenientes más relevantes para este proceso [23].

- El alto contenido de celulosa y hemicelulosa en BSG (aproximadamente 50% p / p de peso seco) también lo hace muy atractivo para la **producción de biocombustibles** como hidrógeno, etanol y butanol a través de procesos de fermentación [9, 22]. Los materiales lignocelulósicos, como el BSG, muestran algunos problemas cuando se hidrolizan enzimáticamente, debido a la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, la porosidad y el contenido de lignina del material, de entre el 12 y el 18% (MS), haciendo necesario una etapa de pretratamiento para modificar la estructura lignocelulósica [9].
- Para la **producción de briquetas de carbón**, el bagazo, que contiene en torno a un 70% de contenido en agua, se seca, prensa y carboniza en una atmósfera baja en oxígeno. Las briquetas producidas de esta manera contienen varios minerales como calcio, magnesio y fósforo, presentando un alto valor calorífico (27 MJ/Kg) [23]. Se compararon estas briquetas con otras producidas de otras materias primas, obteniendo buenos resultados de valor calorífico, pero siendo peores que otras en propiedades de combustión [23].
- El bajo contenido de cenizas en el bagazo y la gran cantidad de material fibroso (celulosa, polisacáridos no celulósicos y lignina) lo hacen adecuado para su uso en **materiales de construcción**. Su uso aumenta la porosidad del ladrillo mejorando su capacidad de secado, y como no requiere alteraciones en su producción, es un buen sustituto de los materiales actuales [22,25].
- Dada la naturaleza fibrosa del bagazo de cerveza, este material ha sido estudiado como materia prima para la **producción de papel**. Se utiliza para preparar toallas de papel, tarjetas de presentación y posavasos, obteniendo en estos productos una textura de alto grado [22, 25].
- Debido a su bajo costo y fácil disponibilidad, BSG ha sido probado como **adsorbente** para varios tipos de compuestos. El grano gastado pirolizado se utilizó como adsorbente para eliminar compuestos orgánicos volátiles de los gases residuales [25]. Las capacidades de sorción de BSG para cadmio, plomo y cromo son positivas en comparación con los valores dados para otros materiales biológicos de bajo costo, siendo similares a los obtenidos por el carbón de corteza de coco [22].
- El polisacárido, la proteína, el alto contenido de humedad y propiedades físicas como el tamaño de partícula, porosidad y capacidad de retención del agua del BSG lo hacen viable para el **cultivo y crecimiento de microorganismos** [22, 25]. Varios estudios han demostrado que el BSG es un medio adecuado para el aislamiento y el mantenimiento de cepas

desconocidas y muy adecuado para el cribado y la producción de nuevas sustancias biológicamente activas [25]. Es necesario un procesamiento previo para liberar los nutrientes precisos para apoyar el crecimiento y la fermentación, mientras que la adición de nutrientes adicionales mejora el crecimiento y el rendimiento de los productos de fermentación [24]. Se ha evaluado el uso de BSG como un sustrato alternativo para la producción de enzimas [22]. BSG también ha sido usado como un medio para la producción de ácido láctico por LAB, como reemplazo para los costosos materiales crudos (glucosa, sacarosa o almidón) [24].

1.3 Biocombustibles

Una materia orgánica que proviene de un organismo vivo es denominada biomasa. En función del tipo de biomasa utilizado (Procesado o no procesado), los biocombustibles pueden dividirse en biocombustibles primarios y secundarios [3, 6, 10, 28]. En función de la materia prima, o de donde provenga, los biocombustibles secundarios son clasificados por generaciones [10, 28]: Primera, segunda, tercera y cuarta generación [1, 3, 6, 10, 28, 29].

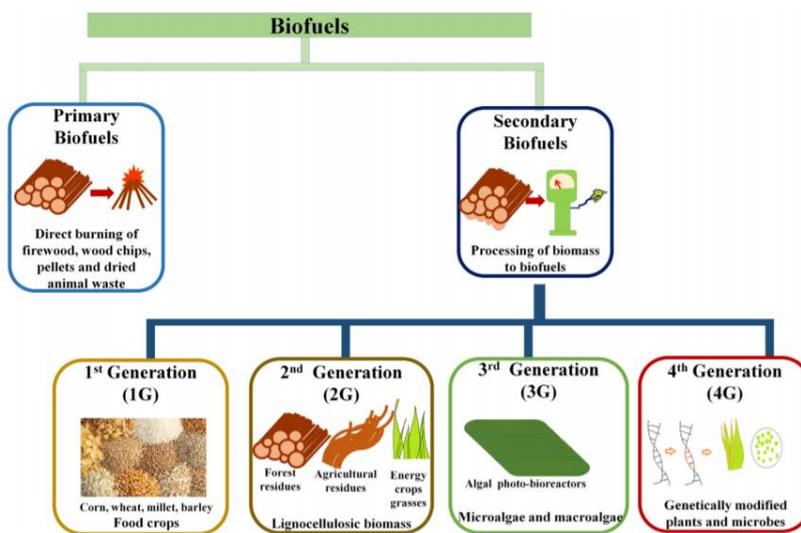


Figura 14. Clasificación de la biomasa en función de la materia prima. [10]

Los biocombustibles primarios son la materia prima natural sin procesar utilizada para generar electricidad y calefacción a través de la combustión [3, 6]. Algunos ejemplos de primarios son leña, plantas, materiales forestales, desechos animales, residuos de cultivos, carbón y pellets. Los combustibles sólidos se incluyen en los biocombustibles primarios [3].

Por otro lado, los biocombustibles secundarios son los combustibles tanto líquidos como gaseosos, destinados principalmente para el sector transporte y

que derivan de la biomasa procesada [3, 6]. Como se ha indicado, está subdividido en generaciones, las cuales se detallan a continuación:

1.3.1 Clasificación atendiendo a la materia prima

1.3.1.1 Primera generación

Estos biocombustibles están hechos a partir de la parte comestible de los cultivos alimenticios [10], como el almidón, maíz, caña de azúcar, colza, remolacha, trigo, arroz, productos azucarados, aceites vegetales [1, 3, 6, 10, 28, 29].

Existe una tecnología ya muy estudiada, y en general bastante sencilla, para convertir estos cultivos en biocombustibles [1], en este caso con las partes comestibles se obtienen bioetanol, biobutanol, biogás y syngas [10]. También es posible la obtención de biodiesel a partir de oil crops (Incluyen flor de girasol, soja, coco, colza, etc.) mediante la transesterificación [28].

El hecho de que para producir energía se utilicen cultivos que puedan utilizarse como alimento, desarrolló un conflicto que se puede referir a él como “Combustible vs comida” [1, 3, 6, 28], lo que desembocó en una subida de los precios tanto de los cultivos como de los alimentos [3]. Debido a la desnutrición que hay en el mundo, este conflicto se convirtió en el principal inconveniente para el desarrollo de esta generación de combustibles.

Además de este inconveniente, surgen otros problemas, como la preocupación por la posibilidad de que, ante la intensificación de este tipo de cultivos dirigidos hacia la producción de energía, tenga efectos negativos en el ambiente, como la deforestación, la pérdida de hábitat y la disminución de la fertilidad del suelo [11]. También existen otros indicadores para conocer si este tipo de proceso se puede considerar rentable, como la evaluación del ciclo de vida, LCA, que reveló que, para la mayoría de los casos de primera generación, hay una ganancia de energía negativa [28].

Por todo esto, a pesar de que sea seguro a nivel económico, ya ha habido lugares como Europa que ha limitado el uso de este tipo de biocombustibles debido a los posibles perjuicios y a que no producen una reducción neta de CO₂ en la atmósfera [11].

1.3.1.2 Segunda generación

Ante los problemas surgidos con la primera generación, había una necesidad de encontrar soluciones alternativas sostenibles, despertando el interés en investigadores para desarrollar los biocombustibles de segunda generación [29].

Los biocombustibles de segunda generación son combustibles sostenibles que son producidos a partir de cultivos no alimenticios, como la biomasa lignocelulósica y residuos agrícolas, forestales, urbanos e industriales [1, 3, 6, 7, 10, 28, 29]. El hecho de querer utilizar recursos renovables ayuda a minimizar el uso de combustibles fósiles y a reducir el contenido de CO₂ en la atmósfera [1], sin embargo, este uso ha producido una “competición” entre la utilización de estas tierras cultivables para cultivos alimenticios o no alimenticios, limitando el desarrollo de los no alimenticios [10].

Estos combustibles están hechos principalmente a partir de celulosa, lignocelulosa y lignina, elementos presentes en la biomasa lignocelulósica, que es una buena alternativa para la sustitución de materias primas como el bagazo y la caña de azúcar, ya que resuelve el problema de utilizar las partes comestibles para uso energético. Los más usados son mazorca de maíz, cáscara de arroz, paja de trigo y bagazo de caña de azúcar [7].

La producción de la segunda generación de biocombustibles a partir de materia prima lignocelulósica se puede llevar a cabo por dos rutas distintas (Figura 15): Ruta bioquímica y ruta termoquímica [5, 6, 7].

La ruta termoquímica es un proceso directo en el que se utiliza una combinación de calor y productos químicos de gas síntesis, bio petróleo, biocarbón [7]. Como se puede ver en la Figura 15, esta ruta contiene dos diferentes procesos: Gasificación para producir el gas síntesis (CO, CO₂ y H₂), y pirólisis para producir un bio petróleo del que se obtiene una gran variedad de biocombustibles de larga cadena de carbono que pueden usarse como diésel sintético o como combustible de aviación [5, 7].

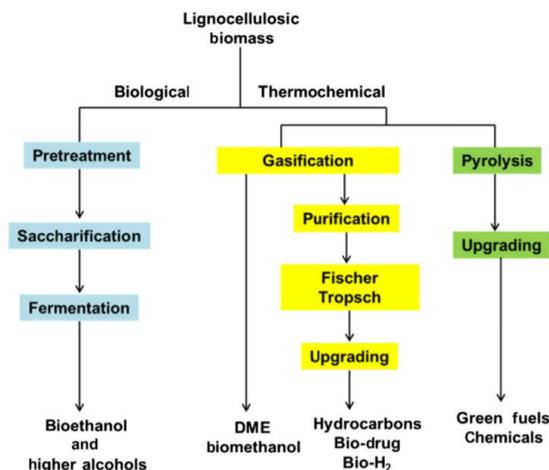


Figura 15. Rutas para la producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica. [5]

La gasificación es un proceso en el cual un material, ya sea gaseoso, líquido o sólido, que contenga carbono, reacciona con aire, oxígeno y/o vapor para producir un gas llamado gas síntesis. Para poder hacer este proceso, la biomasa debe ser antes deshidratada, molida o incluso pretratada para asegurarse una buena conversión. Al igual que la biomasa, este gas también necesita una “limpieza”, que depende de la composición inicial que presenta, el reactor donde se va a llevar a cabo el proceso, y de las condiciones en las que se va a realizar. El proceso de síntesis más conocido es la síntesis de FT (FischerTropsch), que consiste en la formación de hidrocarburos de distintos pesos moleculares a partir de CO y H₂, utilizando como catalizador varios metales, como Fe, Co, Ni o Ru. El proceso FT se realiza típicamente a 200-350°C y 25-60 bar. El metanol, el di-metil-éter (DME), el metano y el biohidrógeno también se pueden obtener a partir del gas de síntesis [5].

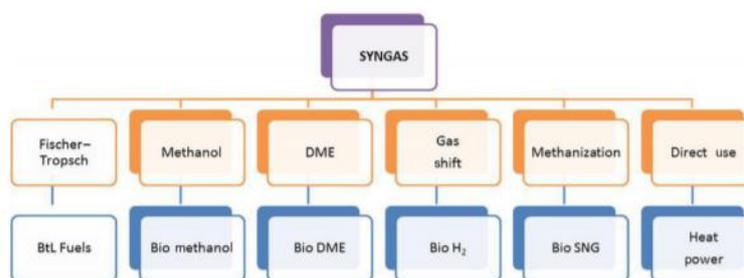


Figura 16. Procesos de conversión para producir biocombustibles a partir de gas de síntesis. [5]

La pirólisis es un método que es capaz de convertir grandes volúmenes de biomasa sólida en líquidos. En la pirólisis, la biomasa se descompone al calentarla bajo una atmósfera inerte en varios productos: sólidos (carbonizados), líquidos (biocombustibles) y gaseosos. La formación de un producto u otro depende principalmente de varias condiciones del proceso, como el tiempo de residencia, la temperatura y la velocidad a la que se calienta. Los aceites obtenidos de este proceso pueden ser utilizados como combustibles en motores diésel, pero tienen una baja volatilidad y alta viscosidad y corrosividad. Estos combustibles producidos por pirólisis tienen ciertas limitaciones, pero pueden mejorarse mediante tratamiento como la hidrodesoxigenación [5].

En resumen, la ruta bioquímica consiste en utilizar microorganismos y enzimas para convertir los carbohidratos en azúcares, para su posterior conversión en combustible mediante fermentación [6, 7]. Este proceso tiene 4 pasos principales: Pretratamiento de la materia prima, hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa, fermentación de las hexosas y pentosas al combustible y recuperación-destilación para tener la calidad deseada [5].

El pretratamiento es un paso principal para romper la fuerte estructura creada entre las uniones de los polímeros, permitiendo el acceso de las enzimas a la celulosa. Debido a la variedad de materias primas existentes es difícil encontrar un pretratamiento perfecto. Tras ello, se pasa a la etapa de hidrólisis enzimática, en el que unas enzimas llamadas celulasas realizan el proceso de conversión a azúcares, para, por último, mediante microorganismos fermentadores, el azúcar sea transformado, por ejemplo, a etanol con *S. cerevisiae* [5].

También hay otra ruta para obtener estos biocombustibles, que es mediante la utilización de ambas rutas conjuntamente. Se basa primero en la obtención de gas síntesis por gasificación, para después transformarlo en ácidos orgánicos y alcoholes, como etanol y butanol, mediante microorganismos carboxidotróficos. Las principales ventajas que presenta este proceso son la baja temperatura y presión a las que se realiza los procesos microbiológicos, la alta especificidad del sustrato o la mejor tolerancia en comparación con los catalizadores metálicos utilizados en pirólisis, mientras que la principal desventaja es el uso de reactores específicos ante la pérdida de masa en la conversión de gas a líquido [5].

A pesar de que la ruta termoquímica es capaz de utilizar una gran variedad de materiales como sustratos, si se observan las emisiones de efecto invernadero y el consumo de combustible, es preferible la utilización de la ruta biológica en lugar de la termoquímica [6]. Tras todos estos datos, hay que decir que este proceso utilizado para la producción de estos biocombustibles no es económicamente viable, debido al alto coste del proceso, con enzimas específicas o la etapa del pretratamiento [3, 7].

La segunda generación presenta varias ventajas, como que no está basada en productos alimenticios, comparativamente barata, que reutiliza residuos de la biomasa [6] y que puede ser mezclada con gasolina, pudiendo ser utilizada y transportada en motores e instalaciones ya existentes realizando pequeñas modificaciones [7]. Como se ha comentado antes, la segunda generación tiene una peor eficiencia por el bajo rendimiento en el proceso, pero al tener un impacto ambiental también menor, además de presentar con el LCA una ganancia de energía positiva [28], se prefiere antes que la primera generación [29].

1.3.1.3 Tercera generación

En la búsqueda de nuevos organismos capaces de ser transformados en combustibles sin entrar en competencia con los cultivos alimenticios, surgió la idea del uso de las microalgas [30].

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos [4] que no tiene ni raíces, ni tallos ni hojas, que son capaces de convertir la energía solar en biomasa [5, 30], siendo el CO₂ atmosférico fuente de carbono y la luz solar fuente de energía [4]. Pueden ser autotróficos, heterotróficos o mixotróficos, que es una combinación de las dos anteriores [31]. Los principales componentes que forman parte de las microalgas son los carbohidratos, lípidos y proteínas, presentando todas importancia industrial [31]. Las cantidades presentes en microalgas depende de la especie de alga que sea y de las condiciones de cultivo bajo las que se haya desarrollado [31].

El cultivo de las microalgas es más rápido y sencillo que el de las plantas terrestres, además de que para ello no es necesario el uso de tierra agrícola de calidad [4]. Las microalgas pueden cultivarse en medios acuosos, como en agua de mar y aguas residuales [28, 29, 30, 31], hecho que minimiza el uso de agua dulce y de tierra cultivable, resolviendo así el conflicto de comida vs combustible como ocurría con la 1ª y 2ª generación [10, 29, 31]. Los requisitos para el crecimiento deben ser favorables, pero son sencillos, como luz, temperatura, salinidad y pH adecuadas, CO₂, nutrientes como N, P y K y azúcares [4, 5].

Por lo tanto, el uso de las microalgas tiene varias ventajas respecto a las plantas de cultivo convencionales, ya que presentan un mejor rendimiento fotosintético [5, 31], tienen un ciclo de cosecha mucho menor [4, 5], permitiendo cultivos múltiples con mejores rendimientos [5], puede retener CO₂ de los gases de combustión [7, 28, 31, 32], puede crecer en condiciones más desfavorables y son económicas [7, 10, 31].

También tiene inconvenientes, como por ejemplo su alto coste operacional junto con el desarrollo que aún se debe realizar para una utilización eficiente [10, 31], el alto contenido de agua en la biomasa de algas, que obliga a realizar una centrifugación o filtración para poder extraer los lípidos [7] y por último se ve afectado por variaciones estacionales, haciendo que el suministro de materia prima difícilmente sea constante [31].

Para el proceso de conversión de la biomasa derivada de las microalgas, primero ésta debe ser fraccionada en sus principales componentes, como proteínas, lípidos y carbohidratos [30] y después transformados en diversos biocombustibles mediante diferentes métodos de conversión química: Fotobiológica, fermentación, digestión anaerobia, gasificación, pirólisis, licuefacción o transesterificación (Fig.17) [5]. La producción de biocombustibles a base de algas es aproximadamente cien veces mayor que la de las plantas superiores [4].

Además de biocombustibles, estos 3 principales componentes pueden transformarse en diferentes bioproductos, dando aún más valor a este proceso de 3ª generación. Las proteínas y los carbohidratos se pueden convertir en alimentos para animales, suplementos nutricionales y biofertilizantes, además de otros productos comerciales como la vitamina B12, cosméticos o ácidos grasos [30].

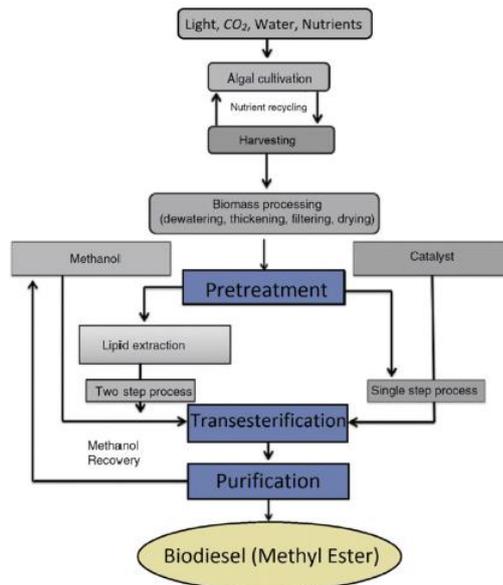


Figura 17. Producción de biodiesel a partir de biomasa de algas. [4]

1.3.1.4 Cuarta generación

El deseo de mejorar la utilización y características de las microalgas, limitadas por la baja eficiencia en la fotosíntesis, y convertir el CO₂ en combustible es la base del desarrollo de la 4ª generación de biocombustibles [31].

La técnica llamada organismos modificados genéticamente (GMO) ha sido aplicada a las microalgas para aumentar la productividad de lípidos mediante especies de microorganismos mejorados genéticamente [30]. A estos microorganismos y algas modificadas genéticamente se les denomina biomasa de cuarta generación [30]. De esta materia prima utilizada se puede decir que es inagotable, barata y que es capaz de convertir energía solar en biocombustibles [1, 7].

Los biocombustibles de cuarta generación son principalmente combustibles fotobiológicos solares y electrocombustibles [1]. Estos biocombustibles se pueden producir de 3 maneras:

- Mediante biología sintética, que consiste en diseñar microorganismos para producir combustibles solares fotobiológicos [1, 7, 31].



- Combinando la producción de energía fotovoltaica y microbiana (electrocombustibles) [7].
- En fábricas donde se producen células u orgánulos sintéticos diseñados expresamente para producir los productos químicos de alto valor deseado y biocombustibles [7].

Esta cuarta generación ha despertado un gran interés, pero aún está en etapas iniciales de desarrollo y falta mucho por investigar [7, 31].

1.3.2 Clasificación atendiendo a la fase

1.3.2.1 Biocombustibles gaseosos

Hay dos tipos de biocombustibles gaseosos:

- Los derivados de la gasificación de la biomasa por procesos pirolíticos, formados principalmente por CO_2 y H_2 . Son llamados syngas.
- Derivados de la fermentación celular, que son los que vamos a tratar, biohidrógeno y biogás.

El biohidrógeno es un gas que no es tóxico, es incoloro, inoloro y que no tiene sabor [1]. Cuando es usado como combustible, el único coproducto que es generado es el agua, por lo tanto, es un producto libre de carbono y no contaminante [1].

En comparación con otros biocombustibles, presenta varias ventajas, como que es el que tiene la capacidad de producir mayor energía, siendo aproximadamente 122kJ/g , y presentando un valor calorífico de 143GJ/Tonelada [1, 6]. Puede ser utilizado directamente en los motores de combustión y para la generación de electricidad en celdas de combustible [4, 6]. Tiene una gran variedad de aplicaciones en la industria, como la síntesis de alcoholes, aldehídos y amoníacos, hidrogenación de por ejemplo petróleo y aceite [6].

Además de su producción por fermentación [6], hay otros métodos como la conversión autótrofa, que es la conversión directa de la energía solar en hidrógeno [6] y la gasificación de la biomasa, estrategia más económica [1, 6, 28].

Por otra parte, el biogás es producido por la descomposición biológica y anaerobia de la materia orgánica [1, 6, 28], siendo la vía de producción de biogás más eficiente en generación de energía, teniendo una relación de salida/entrada de energía de $28,8\text{MJ/MJ}$ [1].

Los desechos producidos durante su producción pueden ser utilizados como acondicionador del suelo [28]. Uno de sus principales usos es generar calor en calderas, pudiéndose llegar a usar directamente en ellas [28].

1.3.2.2 Biocombustibles sólidos

Los biocombustibles sólidos son obtenidos a partir de residuos forestales o subproductos de fábricas de madera, con forma de viruta, que pueden ser utilizados directamente en calderas quemándolos o compactándolo en pellets para su uso doméstico en calderas [28].

El biocarbón es un biocombustible sólido, producto rico en carbono obtenido de la descomposición térmica de la biomasa, a entre 350° y 700°C. Presenta unas características que le hacen ser un factor importante para acondicionar los suelos y como fertilizante, ya que proporciona mayores reservas de carbono al suelo además de favorecer la retención de éste. Se ha observado que su implantación promueve la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas. Para su producción se ha demostrado que la temperatura a la que se realiza la pirólisis influye en las propiedades fisicoquímicas del biocarbón, obteniéndose un buen rendimiento, 50,6%, a 400°C [28].

1.3.2.3 Biocombustibles líquidos

Los combustibles líquidos se pueden dividir en función de su proceso de obtención:

- Derivados de la transesterificación: Biodiesel
- Derivados de la fermentación de biomasa: Biometanol, 2,5-Dimethylfuran, biopetróleo, bioetanol, biobutanol.

Biometanol

Es considerado una fuente alternativa de energía debido a su alto octanaje, baja inflamabilidad, alto rendimiento y las bajas emisiones que ocasiona [1, 28]. Otra de las ventajas que presenta es su mezcla con gasolina y etanol utilizándose en los vehículos actuales sin grandes modificaciones técnicas, como M85, que es una mezcla de 85% de metanol y 15% de gasolina [1, 28]. Las industrias petroquímicas usan el metanol como materia prima para la producción de varios químicos, como el ácido acético y biodiesel mediante la transesterificación [1].

Existen dos métodos principales para su producción, la gasificación y la pirólisis. Diversos materiales han sido estudiados también como materia prima para su producción, como por ejemplo árboles o residuos de cultivos [1, 28].



En comparación con el etanol, tiene un precio más bajo, mejor reactividad, un proceso de recuperación más simple y es más barato de purificar ya que no forma azeótropos, por lo que, a pesar de ser más tóxico, es preferido al biodiesel [1, 4].

Biodiesel

Puede ser producido a partir de materiales renovables y es capaz de sustituir a combustibles derivados del petróleo [1, 4, 28]. Este biocombustible es importante por varias razones: Puede servir como un combustible barato para zonas rurales, su producción es renovable, produciendo pocos residuos tóxicos, siendo las entradas y salidas del proceso biodegradables en su mayoría y por último, puede ser utilizado para mejorar el rendimiento de los motores [4].

Las microalgas son la materia prima preferida de biodiesel por su gran producción y por poder convertir los coproductos generados en biogás o bioetanol [1].

Biopetróleo

El biopetróleo es un biocombustible líquido de un color marrón oscuro con un olor parecido al humo. Es una mezcla compleja de alcoholes, ácidos, ésteres, fenoles, cetonas, aldehídos y oligómeros [28, 33]. Debido al alto contenido de agua, oxígeno y cenizas, es inestable, lo que le hace ser viscoso, y debido a su bajo pH es corrosivo, características que le impiden ser usado directamente como combustible [28, 33]. Puede ser utilizado para obtener calor o electricidad mediante combustión directa y gran variedad de bioproductos [33].

Hay dos procesos que se usan principalmente para su producción a partir de biomasa, pirólisis rápida y licuefacción hidrotermal. El alto coste de los procesos de producción junto con la baja calidad del combustible son las razones que impiden la comercialización del biopetróleo [28].

Dymethylfuran

2.5-Dimethylfuran o DMF es un biocombustible líquido producido a partir de 5-hydroxymethylfurfural (HMF), derivado de la biomasa. Presenta unas propiedades de combustible muy buenas, como su alto octanaje (119), mayor incluso que el de la gasolina y etanol, un alto punto de ebullición, entre 92° y 94°C y una baja solubilidad en agua, del 0,26%. Puede ser mezclado con gasolina, por ejemplo, al 5% [28].

Para su producción, hay varios métodos, como el basado en dos etapas: La primera etapa consiste en la conversión de fructosa en HMF mediante el uso de ZrO_2 como catalizador y de NH_4Br como “promotor”. En la segunda etapa, HMF es convertido en DMF usando un electrodo de grafito con ZrO_2 [28].

Bioetanol

El bioetanol es el biocombustible más común producido industrialmente a partir de biomasa lignocelulósica, como el maíz y la caña de azúcar [1]. Es una prometedora alternativa ante los combustibles utilizados para el transporte y también buena alternativa como biocombustible neutral en carbono. Presenta unas características de combustible destacadas, que incluso pueden ser comparadas con la gasolina: Tiene un número de octano elevado, de 108, lo que en comparación respecto a la gasolina, le permite un encendido temprano del motor; un punto de ebullición bajo, mayor calor de vaporización, contenido de energía similar y un alto contenido en oxígeno (34,7%) debido a la combustión completa del combustible, lo que hace que haya una menor emisión de óxido de nitrógeno y diversas partículas [2, 6].

El uso de bioetanol más común es la mezcla de éste con gasolina, provocando una reducción de hasta un 80% en la emisión de CO₂, reducción de la emisión de gases de efecto invernadero en general, hidrocarburos no quemados, dióxido de azufre y carcinógenos [1, 6, 28]. Si el contenido de etanol en la gasolina no es más de un 15% en volumen (E15), no es necesario realizar ningún tipo de modificación en el motor para su correcto funcionamiento [5, 28]. Se puede destacar el desarrollo de vehículos “flex-fuel”, con motores especiales que son capaces de funcionar desde 100% de gasolina hasta sólo con etanol, cualquier mezcla es posible [5, 6].

Otra de las grandes ventajas que presenta el uso de bioetanol es que tiene un ciclo cerrado de carbono, es decir, que parte del CO₂ generado a lo largo de su producción, es reabsorbido por las plantas [2], pero también hay ciertas desventajas, como que tiene un menor contenido energético, es más volátil y corrosivo que la gasolina, además, sin previa modificación, no puede usarse directamente en motores [14].

Para su producción se realiza una fermentación alcohólica, principalmente de biomasa lignocelulósica [1, 2, 6, 28]. La producción a partir de biomasa lignocelulósica implica 3 operaciones principales: Pretratamiento, sacarificación enzimática y fermentación [6, 28]. La producción global de etanol en el año 2017 fue de unos 107.000 millones de litros, cantidad que se ha duplicado en los últimos 10 años. Los mayores países productores son Estados Unidos, Brasil, Europa, China, Canadá y Tailandia [6]. Muchos materiales como los residuos agrícolas tienen un buen potencial como materias primas para este proceso: materia prima leñosa, rastrojo de maíz, desechos de colza, bagazo de caña de azúcar, etc. [1] En la Tabla 2 se puede ver un resumen de distintas materias primas utilizadas:

Substrates	Pretreatment used	Micro-organism used	Ethanol yield	Refs.
Rambutan fruit waste	None	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.17–4.16%	[54]
Rice straw	Popping pretreatment	"	0.172 g/g	[55]
Olive mill waste water and olive pomace	Ultrasonic, H ₂ SO ₄ , NaOH and CaCO ₃	"	Ultrasonic and NaOH found best	[48]
Jarusalem artichoke	H ₂ O ₂ -CH ₃ COOH	"	Approximately 84%	[56]
Cassava and sweet potato peels	Hydrolysis with <i>Gloeophyllum sepiarium</i> and <i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Zymomonas mobilis</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9–26%	[57]
Cactus (CAC), green coconut shell (GCS), mature coconut shell (MCS) and mature coconut fibre (MCF)	alkaline hydrogen peroxide (Alk-H ₂ O ₂)-sodium hydroxide (NaOH) process	<i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Pichia stipites</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79.27–84.64% to 85.04–89.15% for CAC, GCS, MCF and MCS respectively	[58]
Gamba grass (<i>Andropogon gayanus</i>)	5% and 10% sulphuric acid	<i>Zymomonas mobilis</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26.5% and 44.9% for <i>Zymomonas</i> and 35.8 and 35.3 for <i>Saccharomyces</i>	[59]
Waste papers, news-papers and office papers	Hydrolysis by <i>Trichoderma reesei</i> Rut-C30 and <i>aspergillus niger</i> F38	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CTM-30101	0.38 g/g	[60]
Coconut husk and cactus	Auto-hydrolysis (Steam explosion)	<i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Pichia stipites</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90.09%	[61]
Barley straw	2% NaClO + H ₂ O ₂	-	207 mg/g	[62]
Fungal pretreated wheat straw	35.7% (w/w) NaOH pretreatment at 30 °C for 30 min	White-rot fungus <i>Irpex lacteus</i>	Sugar recovery increased 117% and reduction of enzyme dose of 33%	[63]
Rice straw	Acid and enzyme pretreatment	-	1776 mg COD/L ethanol	[49]
Microalgae (<i>Desmodesmus</i> sp.)	None	-	0.24 g ethanol/g biomass	[64]

Tabla 2. Materia prima utilizada para la producción de bioetanol junto con el pretratamiento y microorganismos usados, y el rendimiento de etanol obtenido. [1]

Una de las mayores limitaciones que tiene este proceso es que el costo es alto, haciendo que no sea económicamente viable en muchas ocasiones para su producción industrial [20, 28].

1.3.2.4 Biobutanol

El butanol es un alcohol primario versátil, con una estructura de 4 carbonos, C₄H₉OH [3, 14, 28]. También es conocido como butil alcohol, n-butanol y como butan-1-ol, un isómero de cadena lineal que acaba con un grupo funcional alcohol -OH [14]. El butanol es un líquido incoloro, inflamable con un olor distintivo que es completamente miscible con solventes orgánicos y parcialmente miscible con el agua. Ha sido producido en gran medida por la industria petroquímica, siendo utilizado históricamente, como más adelante se detallará, como químico y disolvente en la industria [3, 14]. El butanol y sus isómeros presentan la estructura de 4 carbonos, pudiendo ser de cadena lineal o ramificada. Las diferencias entre estas cadenas hacen que tengan distintas propiedades y puedan clasificarse, siendo el n-butanol el que disponga de mejores características para ser usado como combustible líquido o aditivo [2]. Existen varios isómeros del butanol: El ya nombrado butanol normal o n-butanol (CH₃CH₂CHOHCH₃), isobutanol ((CH₃)₂CH₂CHOH) y t-butanol o terbutanol ((CH₃)₃COH). El isobutanol, isómero ramificado, es capaz de juntarse hasta en un 15% en base volumétrica con gasolina, mientras que el etanol lo hace en un 10% [3]. En la Tabla 3 se puede ver un pequeño resumen de estos distintos isómeros con sus características y usos:

Butanol isomer	Molecular structure	Main Applications	Specific characteristic
1-butanol (n-butanol)		Solvents (paint industry) Plasticizers (plastics industry) Hydraulic brake fluid Cosmetics	Gasoline additive Potential gasoline alternative
2-butanol		Solvent (several industries) Domestic cleaning agent Industrial cleaner and paint remover	Perfumes and artificial flavors
iso-butanol		Solvent and additive (paint industry) Industrial cleaner and paint remover Ink ingredient	Gasoline additive
tert-butanol		Solvent Industrial cleaner and paint remover Intermediate for MTBE, ETBE, TBHP	Gasoline additive and octane booster Denaturant for ethanol

Tabla 3. Isómeros del butanol. Estructuras y aplicaciones. [2]

A pesar de presentar problemas con el rendimiento en su producción, el butanol presenta mejores características como combustible que el etanol [1]. Por ejemplo, el punto de fusión lo alcanza a $-89,5^{\circ}\text{C}$, punto de ebullición $117,2^{\circ}\text{C}$, punto de inflamabilidad a 30°C , temperatura de autoignición a 140°C , densidad de $0,8098\text{ g/mL}$ a 20°C , presión crítica de $48,8\text{hPa}$ y una temperatura crítica de 287°C [3, 14].

Presenta más características que pueden resolver ciertos problemas que ocurren en otros alcoholes usados como combustible:

- Mayor poder calorífico:** Debido a que este valor aumenta con el contenido en carbono y el n-butanol presenta 4, que es el doble de los que tiene el bioetanol, junto con que tiene un 50% más de densidad de energía en volumen [2]. Esto también se debe a que es menos corrosivo y evaporativo, permitiéndole liberar más energía por unidad de masa [11]. El valor energético de la gasolina es de en torno a 32MJ/L , mientras que el del butanol es de $29,2\text{MJ/L}$ y el del etanol de $19,6\text{MJ/L}$ [2, 3, 6, 34]. Desde este punto de vista, el biobutanol es bastante similar a la gasolina, hecho que le permite reemplazar a ésta en los motores en términos de energía, pudiendo mantener las otras características del motor constantes. Comparándolo con el etanol, al tener un 25% más de energía, haría que el consumo mejorara y tuviera un mejor kilometraje, sin embargo, la eficiencia en el motor sería peor ya que el etanol tiene un octanaje superior [2].

- **Menor volatilidad** [2, 3, 6, 23, 28, 34]: Esta característica en los alcoholes es inversamente proporcional a la cantidad de carbono, por lo que el butanol tiene menos tendencia a la vaporización. Sumando que el punto de inflamabilidad es mayor que el del etanol, esto hace que el n-butanol sea potencialmente más seguro en transporte y a temperaturas altas [2].
- **Menor entalpía de vaporización** [2, 3]: Debido a que este valor en n-butanol es la mitad del que presenta el bioetanol, es esperable que el motor presente menos problemas de ignición, de arranque de motor en frío [2].
- **Intersolubilidad** [2, 28]: Los alcoholes con mayor número de carbono son más fáciles de mezclar con gasolina y el n-butanol con cuatro carbonos tiene una buena intersolubilidad con la gasolina. Así pues, son más fáciles de mezclar con hidrocarburos no polares y tienen menor afinidad por el agua [2].
- **Mayor lubricación y viscosidad** [2, 3, 28]: La viscosidad aumenta con el número de carbonos que tenga la molécula, por lo que esto podría prevenir a partes del motor, como los inyectores, de problemas de desgaste [2].
- El biobutanol puede ser **quemado directamente en motores** ya creados de gasolina. También puede ser usado en su forma pura o en mezclas en cualquier porcentaje sin realizar ningún tipo de modificación al motor [1, 28], mientras que el etanol solo puede ser mezclado hasta el 85% [3]. Esto es debido al bajo contenido en oxígeno del butanol (22% frente a 35% del etanol) [3, 34], además de que el uso de este líquido disminuye las emisiones y la concentración de partículas. El butanol puede ser mezclado sin separación de fases, hecho que le permite ser transportado y distribuido utilizando las infraestructuras ya creadas [9, 11], con el consiguiente ahorro en coste.

A pesar de tener unas características tan ventajosas, el biobutanol también presenta algunos aspectos negativos:

- Como el biobutanol tiene un poder calorífico más bajo que la gasolina, el **rendimiento** alcanzado por motores alimentado por este biocombustible es menor que el de aquellos que estén alimentado por gasolina [2].
- Debido a la misma razón que el anterior punto, el motor va a demandar una **mayor cantidad de combustible**, por lo tanto, va a haber un mayor consumo si se quiere tener el mismo rendimiento que con gasolina [2].
- Al tener el butanol un **octanaje más bajo** que el bioetanol [2, 28, 34], es aconsejable usarlo en motores con relaciones de compresión más

bajas. Esta característica también reduce la autoignición y perjudica el control de la combustión [2].

- **Baja eficiencia en su producción.** El ratio de producción de bioetanol es entre 10 y 30 veces superior al ratio de producción de biobutanol mediante la fermentación ABE, lo que conlleva un coste muy alto, haciendo prácticamente inviable económicamente su producción a nivel industrial [2, 11].

En la Tabla 4 se puede ver una comparación resumen de las características de la gasolina con varios biocombustibles líquidos.

Como también se ha comentado, n-butanol tiene más aplicaciones fuera del terreno de los biocombustibles, dentro de la industria química. Su uso en esta industria fue en un principio como disolvente, precursor de polímeros y plásticos [35].

	Gasoline	Diesel	Methanol	Ethanol	n-Butanol
Molecular formula	C ₄ – C ₁₂	C ₁₂ – C ₂₅	CH ₃ OH	C ₂ H ₅ OH	C ₄ H ₉ OH
Molecular weight	111.19	198.4	32.04	46.06	74.11
Cetane number	0–10	40–55	3	8	25
Octane number	80–99	20–30	111	108	96
RON	88–98	0	109	109	98
MON	80–88	0	89	90	85
Oxygen content (% weight)	–	–	50	34.8	21.6
Density (g/mL) at 20 °C	0.72–0.78	0.82–0.86	0.796	0.79	0.808
Autoignition temperature (°C)	300	210	470	434	385
Flash point (°C) at closed cup	–45 to –38	65–88	12	8	35
Lower heating value (MJ/kg)	42.7	42.5	19.9	26.8	33.1
Boiling point (°C)	25–215	180–370	64.5	78.4	117.7
Stoichiometric ratio	14.7	14.3	6.49	9.02	11.21
Latent heating (kJ/kg) at 25 °C	380–500	270	1109	904	582
Flammability limits (%vol.)	0.6–8	1.5–7.6	6.0–36.5	4.3–19	1.4–11.2
Saturation pressure (kPa) at 38 °C	31.01	1.86	31.69	13.8	2.27
Viscosity (mm ² /s) at 40 °C	0.4–0.8	1.9–4.1	0.59	1.08	2.63
Energy density (MJ/L)	32	35.86	16	19.6	29.2

Tabla 4. Propiedades de algunos alcoholes y de combustibles fósiles convencionales. [2]

En la actualidad el biobutanol puede ser utilizado en otras muchas funciones, como agente de acabado para la pintura de vehículos, fluidos hidráulicos, disolvente para la producción de caucho y tintes, formulaciones de detergentes, medicamentos, antibióticos, hormonas y vitaminas. También actúa como un agente de hinchamiento para recubrir tejidos en la industria textil y como componente para la fabricación de maquillaje para ojos, lápiz labial y bases en la industria cosmética [14]. Las rutas petroquímicas basadas en los procesos oxo o aldol son las utilizadas aquí [1, 17].



Para su producción existen dos líneas principales: A partir de biomasa, obteniéndose biobutanol y a partir de combustibles fósiles, obteniéndose petrobutanol. Aunque tengan distintos nombres y provengan de distintos procesos, tienen las mismas propiedades químicas [2]. El petrobutanol se obtiene por hidroformilación de propileno, o más conocida como ruta oxo. Aunque es el camino más común, puede que no sea el mejor, ya que los costos están vinculados al precio del crudo y puede ser más barato, pero la sociedad demanda soluciones que sean independientes del petróleo, por lo que este camino no es lo más ecológico posible [2].

La ruta biológica para la producción de butanol a partir de biomasa es la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) [1, 2, 3, 6, 9, 17, 23, 28]. Aproximadamente 5 millones de toneladas de biobutanol son obtenidos cada año [23, 34]. La producción crece a un ritmo de un 3% anual, esperando que se alcance en los próximos años un 20% de la demanda total de gasolina y diesel [34].

Sobre los años 60s, la producción de biobutanol dejó de ser competitiva debido al aumento de materia prima y a que los componentes petroquímicos eran mucho más baratos, pero ahora ha vuelto con fuerza debido a la concienciación social de buscar sustitutos a combustibles provenientes de fuentes no renovables [14].

La ruta biológica tiene varias ventajas respecto a la ruta química, como el uso de recursos renovables, que los productos sean más fáciles de separar y que sean en menor número. Como ha ocurrido en otros biocombustibles ya descritos, al ser la materia prima lignocelulosa, el proceso consta de varias etapas: Pretratamiento, hidrólisis, detoxificación, fermentación y recuperación [2, 23]. Este proceso se puede ver resumido en la Figura 18. El pretratamiento, como en el etanol, es la etapa necesaria para romper la estructura compleja que forman la celulosa, hemicelulosa y lignina [1, 2, 20, 23]. El tipo se elegirá en función del material utilizado [1]. La detoxificación es necesaria para remover los inhibidores, de nuevo, el elegido depende del material y pretratamiento seleccionado [2]. La fermentación es el proceso de conversión de los azúcares en solventes mediante microorganismos, como Clostridia. Tras la fermentación, el producto es recuperado, separando acetona, butanol y etanol gracias a los distintos puntos de ebullición de cada uno [2]. El ratio obtenido para esta familia de microorganismos es de 3:6:1 [9, 20, 23].

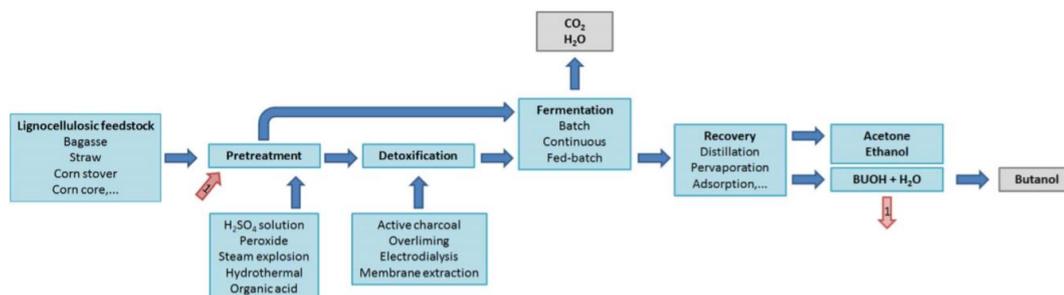


Figura 18. Esquema del proceso de producción del biobutanol por vía biológica. [2]

La producción por esta vía, aunque sea prometedora, tiene varios problemas que afrontar, como el alto coste de la materia prima, el bajo rendimiento, baja productividad, el alto gasto de energía para el proceso de recuperación o la toxicidad de los solventes con los microorganismos de la fermentación [28, 34]. Debido a esta toxicidad, la concentración de butanol no suele ser mayor que 1,5% del volumen total, con un rendimiento por debajo de 0.25gBuOH/g glucosa y una productividad de 4,5 g/(L·h) [28, 34].

Ante estos problemas, la industria ha ido avanzando en diversos campos para poder buscar las mejores soluciones: Para rebajar el alto coste de la materia prima se ha trabajado en el uso de residuo lignocelulósico barato, abundante, renovable y que no sea comida [23], como los residuos agrícolas [6] o las algas [3]. El mayor consumo de energía en el proceso se da en la separación, por lo que se buscan métodos más baratos y sencillos como gas stripping [3].

La familia clostridia es la bacteria más común en esta fermentación [2, 3, 6, 9, 14, 17, 20, 23, 28]. Se han desarrollado distintas soluciones para el problema de los microorganismos, como tener enzimas capaces de desarrollar al mismo tiempo la celulosa y la hemicelulosa [20], o el desarrollo de cepas modificadas genéticamente, para de esta manera poder mejorar la producción de solventes, incrementar la tolerancia al butanol, su capacidad de crecimiento en sustratos complejos o para aumentar su tolerancia a los inhibidores [20].

Por lo tanto, desde el punto de vista de la industria de combustibles, la producción de biobutanol no es económicamente viable, pero el desarrollo de soluciones como las mencionadas, están abriendo el camino para su producción y uso generalizado en un futuro debido a sus mejores características [2].

1.4 Fermentación ABE

1.4.1 Producción de biobutanol a partir de materia lignocelulósica

Una fermentación típica de ABE está dividida en las siguientes unidades principales: Aguas arriba, aguas medias y aguas abajo, como se puede ver en la Figura 19 [11].

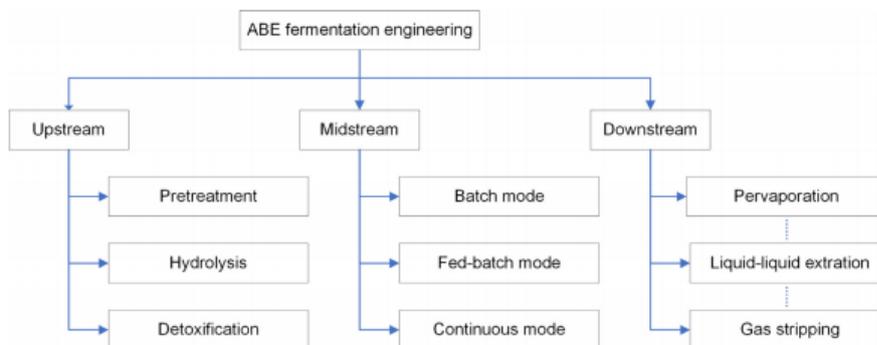


Figura 19. Diferentes procesos de la fermentación ABE. [11]

La elección de la materia prima es un paso importante, ya que determina el tipo y la cantidad de pasos que se van a realizar en aguas abajo. Si el material seleccionado es un sustrato no celulósico se necesitarán al menos las etapas de hidrólisis y detoxificación, pero si el material es celulósico, entonces se necesitará una etapa extra de pretratamiento ante la naturaleza recalcitrante del material. El total de etapas que se tiene que realizar son: Pretratamiento, hidrólisis, detoxificación, fermentación ABE y recuperación del producto [14].

A pesar de que la biomasa lignocelulósica tiene un buen potencial, al tener que realizarse algunos pasos hace que haya un costo adicional de mano de obra, energía, equipo, tiempo y productividad para la conversión total de la biomasa lignocelulósica en biobutanol [14].

1.4.1.1 Pretratamiento

El pretratamiento es una de las técnicas esenciales para procesar biomasa lignocelulósica en la producción de biocombustibles [6], además es uno de los factores más importantes a la hora de controlar el coste total para establecer una biorefinería basada en biomasa lignocelulósica [10].

La biomasa lignocelulósica consiste principalmente en 3 componentes estructurales, la celulosa, hemicelulosa y lignina. Entre ellos, conforman una matriz compacta, que dificulta la accesibilidad de los microbios y enzimas para su posterior degradación e hidrólisis. Sabiendo esto, el proceso de pretratamiento lo que hace es ayudar a eliminar la lignina de la biomasa (delignificar), descomponer la hemicelulosa e incrementar la porosidad de la biomasa, haciendo que se aumente el área y disminuya la cristalinidad del conjunto [6], provocando de esta manera que la celulosa sea más accesible a las enzimas y pueda convertir los carbohidratos en azúcares fermentables [36].

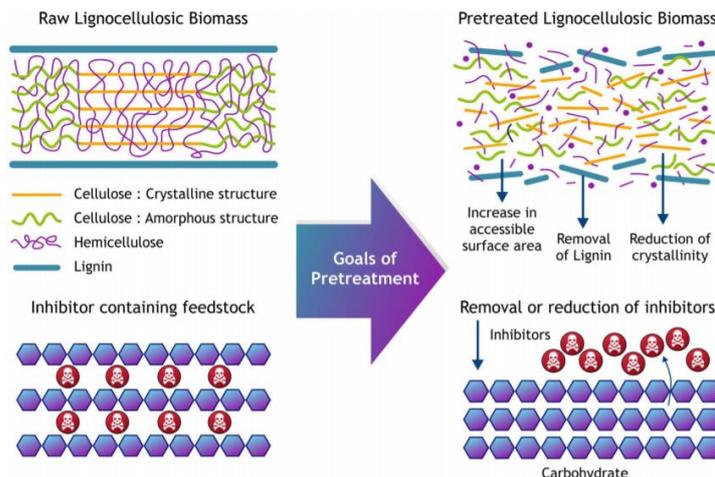


Figura 20. Representación y objetivos del pretratamiento de biomasa lignocelulósica. [36]

Las plantas también tienen unas barreras naturales, que se pueden dividir en 2: Barrera física y química. La barrera física ocurre en materiales basados en queratina y biomasa lignocelulósica, y está basado en la estructura compleja comentada anteriormente, mientras tanto, la barrera química surge en materiales fáciles de digerir, pero que presentan componentes que actúan como inhibidores naturales [20, 36]. Para materiales que contengan barrera química, el objetivo del pretratamiento es eliminar a los inhibidores [36].

Hay que tener en cuenta varios factores que un pretratamiento debe cumplir para que sea eficiente y atractivo económicamente: Evitar la destrucción de hemicelulosas y celulosa [1, 3, 14, 36], producción de fibra celulósica reactiva para ataque enzimático [14], evitar la formación de inhibidores [1, 3, 14, 36], menor consumo de energía [14, 36], menor coste de material para la construcción de reactores de pretratamiento [14], menor generación de residuos [36], poca utilización o nula de productos químicos, siendo al menos respetuosos con el medio ambiente [36], ser capaz de recuperar los catalizadores [36], alta recuperación de los carbohidratos y mejora de la digestibilidad para la siguiente etapa [14, 36] y el hidrolizado pretratado no debe ser tóxico para el cultivo [14].

La selección de un pretratamiento u otro depende de la naturaleza fisicoquímica de la biomasa [8, 10]. Los pretratamientos se dividen principalmente en 4 grupos:

- **Pretratamiento físico:** Este pretratamiento, también conocido como mecánico, utiliza maquinaria capaz de trocear o de moler para reducir el tamaño de la biomasa y así reducir la cristalinidad de la celulosa, mejorando su accesibilidad. En función de los requisitos, el tamaño de la biomasa puede variar de 10-30mm hasta 0,2mm. A menor tamaño,

más fácil para el microorganismo o enzima de digerir y también mayor facilidad para alterar la estructura cristalina de la celulosa, pero también un mayor precio. Ejemplos de este pretratamiento son: Fresado (fresado de bolas, fresado de energía vibratoria), irradiación (rayos gamma, haz de electrones, microondas), otros (hidrotermal, vapor a alta presión, extrusión, pirólisis) [21].

- **Pretratamiento químico:** Los productos químicos más utilizados para el pretratamiento son los ácidos y los álcalis. El pretratamiento ácido con HCl o H₂SO₄, por ejemplo, es eficaz para hidrolizar hemicelulosa y celulosa [6]. Dentro del pretratamiento ácido, hay dos tipos: Diluido y concentrado [9, 12]. El diluido (0,5%-1,0% de ácido sulfúrico), se realiza a temperatura moderadas (140°C-190°C) y es capaz de eliminar y recuperar de una manera efectiva la mayor parte de la hemicelulosa, disolviendo también parcialmente la lignina, lo que hace que aumente la susceptibilidad de la celulosa a las enzimas [3, 12]. Esto provoca que para la mayoría de las materias primas de biomasa utilizadas presente un alto rendimiento de azúcar, pero también desventajas como corrosividad, la necesidad de neutralización ácida o formación de inhibidores [3]. El pretratamiento concentrado, tiene alrededor de un 70% de ácido y se realiza a temperaturas bajas, unos 38°C. Presenta una tasa de conversión de celulosas a glucosa en todo el proceso mucho más alta que la diluida, en torno a un 90% [3]. Este pretratamiento es considerado demasiado corrosivo y peligroso para llevarlo a cabo, además, una gran cantidad de base es necesaria para su neutralización, lo que provoca una alta concentración de sal en el hidrolizado, fuertemente inhibitorio para la fermentación [10,12]. Por estas razones, el diluido suele ser más usado que el concentrado [9, 12, 36]. Por otro lado, el pretratamiento alcalino es capaz de romper los enlaces entre los principales componentes de la lignocelulosa, cambiando la estructura del material. Gracias a ello, aumenta la digestibilidad de la celulosa y la fermentabilidad para la posterior hidrólisis y fermentación. NaOH y cal son dos ejemplos que se utilizan en alcalino [3]. A pesar de que son pretratamientos de una eficacia probada, actualmente se utilizan mucho menos debido a sus efectos en el medio ambiente [6]. Se han desarrollado otras técnicas como organosolv y ozonólisis, que se basan en la eliminación de lignina de la matriz de la biomasa [6, 36].
- **Pretratamiento fisicoquímico:** A parte de químicos y físicos, los pretratamientos fisicoquímicos también son efectivos para el tratamiento de la lignocelulosa. Explosión de vapor, tratamientos con gas como dióxido de nitrógeno, adición de agentes oxidantes, como peróxido de hidrógeno, son varios ejemplos de este pretratamiento. La explosión de vapor consiste en tratar la biomasa con vapor y

temperaturas elevadas, separando las fibras. Puede utilizarse junto a solución ácida/alcalina para mejorar la eficiencia.

- **Pretratamiento biológico:** Consiste en la delignificación y descomposición realizada por microbios de la hemicelulosa, lo que a posteriori, mejora el rendimiento de la hidrólisis [6]. Las principales ventajas de este pretratamiento son la no generación de inhibidores y menor requerimiento de energía, mientras que su principal desventaja es el tiempo requerido y el azúcar consumido por los microbios [8]. Ejemplos de organismos utilizados son los hongos, enzimas lignolíticas, consorcio microbiano y actinomicetos [21, 36].

1.4.1.2 Hidrólisis

El paso de la hidrólisis consiste en la conversión de la celulosa y hemicelulosa contenidas en la biomasa lignocelulósica previamente pretratada, en azúcares monoméricos [20, 37].

La hidrólisis puede ser llevada a cabo de dos maneras: Utilizando ácidos o enzimas.

La hidrólisis ácida tiene dos maneras de poder hacerse: Ácido diluido o ácido concentrado. El diluido se realiza con una baja concentración de H_2SO_4 (0,5%-1,5%) y con una temperatura de entre 120°C-160°C, centrándose en la degradación de la hemicelulosa y también puede servir como pretratamiento de la celulosa [37]. Tras años de estudio, se ha desarrollado el proceso de degradación de celulosa hacia una hidrólisis de dos etapas, para así maximizar los rendimientos de azúcar [37, 38]. La primera etapa se realiza a unos 180°C para la degradación de la hemicelulosa y la segunda etapa a una mayor temperatura, 240°C, para la conversión de celulosa en glucosa [37]. La hidrólisis ácida puede penetrar en la lignina sin haber hecho pretratamiento, haciendo de este un proceso más rápido [11]. La hidrólisis concentrada se aplica tanto para la degradación de la celulosa como la hemicelulosa. Es realizada con un tiempo de duración mayor, utilizando HCl al 41% o 70-90% H_2SO_4 por ejemplo, obteniendo una conversión cercana al 100% de los compuestos a azúcares. Sus mayores limitaciones es el mayor coste de operación, corrosión del equipamiento, puede ser peligroso para el ambiente y la formación de subproductos (p. ej. ácidos acético y fórmico) que complican la etapa de recuperación [11, 37].

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo usando enzimas celulasas bajo condiciones de operación medias, como 40-50°C de temperatura y pH en un rango de entre 4,5 y 5,0 para poder evitar los problemas de corrosión que se generaban con el ácido [20]. La enzimática supera las limitaciones que tiene la ácida, siendo no tóxico, selectivo, teniendo mayor rendimiento [20], formando

menos compuestos inhibitorios, teniendo menos problemas de corrosión y siendo biológico y respetuoso con el medio ambiente [14, 37]. Debido a la complejidad de la biomasa lignocelulósica, una sola enzima no puede realizar una hidrólisis completa, por ello, se requiere una mezcla o cóctel de varias enzimas, [14, 20, 37] para que haya una acción secuencial de ellas [8].

Hay 3 grupos principales de enzimas utilizadas para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica: Celulasas, hemicelulasas y lignanasas.

Las celulasas son enzimas que hidrolizan la celulosa para convertirlo en monómeros de azúcar solubles [20]. La degradación completa de celulosa a glucosa tiene lugar por la acción sinérgica de las 3 enzimas principales que forman parte de las celulasas: Endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas [8, 37]. Las endoglucanasas (EG) actúan principalmente sobre lugares amorfos de la cadena de la celulosa. Rompe al azar enlaces β -1-4 glucosídico en la cadena de polímero de glucosa, produciendo pequeñas cadenas de extremos reductores y no reductores [8, 37]. Las celobiohidrolasas, o también conocidas como exoglucanasas, actúan sobre los oligosacáridos de extremos reductores y no reductores producidos anteriormente para producir celobiosa [37]. Glucosidasas hidrolizan los enlaces glucosídicos, actúan sobre la celobiosa para liberar glucosa [8, 20, 37]. En resumen, la hidrólisis ocurre en dos etapas, hidrólisis primaria y secundaria. Las endoglucanasas y exoglucanasas actúan en la primaria sobre el sustrato sólido liberando azúcares, para que en la secundaria la glucosidasa convierta a la celobiosa en glucosa [8]. Varias especies de bacterias, como Bacillus o Clostridium, y principalmente de hongos, Penicillium o Fusarium, son las principales fuentes de obtención de las celulasas [8, 37].

Las hemicelulasas son un conjunto de enzimas complejas, que son clasificados en función de su acción sobre diferentes sustratos, actuando en hemicelulosa heterogénea para producir azúcares pentosa (xilosa y arabinosa), azúcares hexosa (glucosa, manosa y galactosa) y ácido urónico [37]. Las hemicelulasas más comunes son endoxilanasas o endo-1,4- β -xilanasas, la cual hidroliza las principales cadenas de xilano y β -xilano, xilano 1,4- β -xilano esterases, que atacan los xilo-oligosacáridos para convertirlos en xilosa, esterases de ferúlico y p-cumárico, α arabinofuranosidasas y α -glucuronidasa, α -1-arabinofuranosidasa, esterasa acetilxilano, que actúan en diferentes heteropolímeros, mientras que durante la degradación de glucomanana, la β -mananasa y la β -manosidasa cortan la columna vertebral del polímero [20, 37].

Al igual que las enzimas que degradan celulosa y hemicelulosa, las enzimas capaces de degradar lignina son importantes para lograr el acceso de las enzimas hidrolíticas. Algún ejemplo de lignanasas son: Lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas [37]. Las lacasas por ejemplo, son enzimas



oxidantes que contienen cobre y se pueden encontrar en plantas, insectos, bacterias y hongos. Además de poder degradar la lignina, también aumentan la degradación de la lignocelulosa [20].

Debido a la naturaleza heterogénea de la biomasa lignocelulósica, junto a otras razones relacionadas con las enzimas, hacen que la eficiencia de la hidrólisis varíe [8]. Los factores que afectan se dividen en 2 grupos: Relacionados con las enzimas y relacionados con el sustrato [8, 37]. Dentro de los relacionados con las enzimas, hay factores como la concentración, tipo y fuente de enzimas [37], adsorción enzimática sobre lignina, sinergia, inhibición del producto final (por ello el pretratamiento se debe hacer buscando minimizar la formación de inhibidores), temperatura (crítica en la adsorción de las celulasas) y los tensioactivos (pueden reducir el tiempo de hidrólisis y la cantidad de enzima) [8]. Los factores relacionados con el sustrato son principalmente sobre la estructura, siendo algunos de estos la propia estructura de la materia prima, el grado de cristalinidad que tenga la celulosa, superficie disponible, unión de componentes como lignina y hemicelulosa, porosidad y tamaño de partículas [8, 37].

1.4.1.3 Detoxificación

Durante el pretratamiento utilizado para liberar los monosacáridos de la compleja estructura que presenta la materia lignocelulósica, y debido a las condiciones severas en las que éste se realiza, pueden generar otros compuestos secundarios [6, 16, 34, 38, 39, 40]. Algunos de estos subproductos son conocidos por su capacidad de inhibir parcial o totalmente el proceso de fermentación, siendo conocidos como compuestos inhibidores. Estos compuestos son tóxicos tanto de manera individual como sinérgicamente [12, 23], aumentando la fase de latencia [12], impidiendo el crecimiento microbiano, lo que resulta en una disminución de la formación de producto, tanto en forma de concentración, productividad como rendimiento [6, 11, 12, 16, 41, 42], debido a la tasa alterada de absorción del azúcar, la cual es utilizada en una menor cantidad [41]. Estas características de los compuestos inhibitorios hacen que sea esencial eliminarlos de las soluciones de azúcar derivadas de la lignocelulosa [14, 41, 42], en especial en la obtención de bioetanol y biobutanol [6], para poder alcanzar rendimientos satisfactorios durante la etapa de fermentación. De esta manera, se concluye que es necesario añadir una etapa extra para su eliminación, la llamada detoxificación [11, 14].

Inhibidores

La generación y la naturaleza de los inhibidores provenientes del pretratamiento dependen de varios factores, como el tipo material lignocelulósico utilizado, de la composición de la pared celular y del método de pretratamiento utilizado, teniendo en cuenta también las condiciones bajo las que se ha realizado, como la temperatura, pH, concentración de químicos, etc. [13, 37, 41, 42]

Los inhibidores son clasificados principalmente en 3 grupos: Ácidos débiles, derivados del furano y compuestos fenólicos [14].

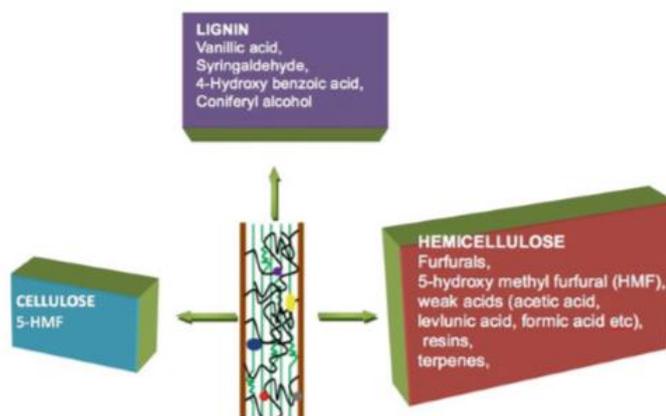


Figura 21. Inhibidores tóxicos generados tras el pretratamiento de lignocelulosa. [41]

Derivados del furano

Los principales aldehídos son furaldehído 2-furaldehído (furfural) and 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF), provenientes de la degradación de azúcares, hexosas y pentosas principalmente. La hexosa se convierte en HMF y la pentosa en furfural [3, 6, 12, 20, 38]. Además, glucosa, manosa y galactosa pueden ser convertidas también a HMF, mientras que xilosa y arabinosa pueden sufrir varias reacciones y formar furfural [20]. También se puede señalar que furfural y HMF pueden romperse para formar ácidos fórmicos y levulínico [39].

La formación de estos componentes depende del pretratamiento usado para descomponer la lignocelulosa. Suelen ser generados en pretratamiento con condiciones ácidas, con bajo pH y altas temperaturas [20, 40, 42]. Tratamientos a altos pH, como la hidrólisis alcalina se obtienen cantidades muy bajas de furanos [20].

Los furanos (junto en ocasiones con ácido acético) son los inhibidores que más fácil se pueden detectar, usándose como medida de efecto inhibitor, sin

embargo, hay que destacar que esto no implica que sean los compuestos más tóxicos [13].

Lo que inhibe cada uno de los componentes, depende de la estructura que presente [13], pero en general se ha encontrado que los furfurales y HMF son inhibidores fuertes del crecimiento de células de la levadura, desactivando la replicación celular [13, 20, 37, 40]. Este hecho implica que afecte a la posterior etapa de fermentación, haciendo que el rendimiento y la productividad del solvente se vea reducido [37, 39, 40]. Los furaldehídos también afectan a la formación de la pared celular, rompe ADN e inhiben la síntesis de proteínas y plásmidos [13, 20], causando una acumulación de especies reactivas de oxígeno que dañan el citoesqueleto, la cromatina nuclear y las mitocondrias [20].

Por separado, furfural inhibe las enzimas glicolíticas y la actividad de hidrogenación de aldehído, resultando en una acumulación de acetaldehído que puede ser responsable de la fase de latencia o retraso en la obtención de solvente, pero no reduce el rendimiento final [13, 39]. Por último, se ha encontrado que los furfurales son tóxicos para el crecimiento de microbios. (penúltimo). 5- HMF puede aumentar la fase de retraso del crecimiento microbiano, agotando el crecimiento celular [20], y también tóxico para la fermentación de microorganismos, causando una menor permeabilidad de la membrana [40].

La presencia de pequeñas cantidades de furanos en el medio, hace que haya mayores rendimientos de etanol [37] y mejor productividad de butanol y ABE [9]. Pueden actuar de forma sinérgica, pero a mismas concentraciones, furfural afecta más a la actividad de los microbios [20].

Fenoles

Los compuestos fenólicos o fenoles son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas. Varían desde moléculas simples hasta compuestos polimerizados, siendo su estructura un anillo aromático y varios grupos funcionales como aldehído, cetona, ácido y grupos metoxi e hidroxilo [20].

Los compuestos fenólicos se forman a partir de la lignina durante la hidrólisis catalizada por ácido o el pretratamiento de la lignocelulosa [3, 6, 13], independientemente de que se agregue o no un catalizador ácido a la reacción. La formación de estos componentes a partir de azúcares es otra posibilidad [37]. Los fenoles pueden existir en tres formas diferentes: Ácido, cetona y aldehído [20], siendo ejemplos de éstos el siringaldehído, vainillina, ácido siringico, ácido p-cumárico y ácido vanílico [3, 6, 12, 13, 40].

Los compuestos fenólicos son fuertes inhibidores de las enzimas celulolíticas y de las células de levadura, afectando de manera negativa a la hidrólisis y fermentación [14, 20]. El efecto tóxico de los componentes en específico varía mucho y puede estar relacionado con grupos funcionales específicos [20, 37, 38], pero en general son más tóxicos que los furanos y ácidos débiles, aunque estén en menor concentración [20]. Los fenólicos con menor peso molecular son más letales para los microorganismos de fermentación que los compuestos de mayor peso molecular [12, 40]. Pequeñas concentraciones, de incluso solo 0,1g/L es altamente letal para los microbios [40,41], mientras que con 0,5g/L se ha observado que inhibe la producción de ABE un 30% [9]. La alta toxicidad está relacionada con su bajo peso molecular, que les permite atravesar las membranas celulares [20, 37, 40, 41], dañando su capacidad de servir como barreras selectivas y matrices enzimáticas que afectan el crecimiento celular y la asimilación del azúcar. También pueden provocar la descomposición de ADN y la inhibición de la síntesis de proteínas y ARN [20].

Ácidos débiles

Además del grupo de inhibidores que son producidos durante el pretratamiento, hay otro grupo, que son los inherentes, es decir, aquellos que están en la biomasa lignocelulósica. Dentro de este último se puede clasificar a los ácidos débiles o alifáticos [20]. Ejemplos de estos ácidos son el ácido acético, fórmico, levulínico y butírico. El ácido acético se forma principalmente a partir de la hidrólisis de grupos acetilo de hemicelulosa [12, 38], mientras que el ácido fórmico es un producto de degradación de furfural y HMF, y el ácido levulínico se forma por degradación de HMF [6, 20, 37]. El contenido presente de estos ácidos varía en función de la materia prima de la que provienen y del pretratamiento [37].

El efecto que causan los ácidos débiles depende del pH que haya [39], pero en general, se sabe que son menos graves en comparación que los furanos y fenólicos [12, 40]. La forma no dissociada de los ácidos débiles entra en la célula a través de la membrana celular y se disocia en el citosol por su pH neutro. Concentraciones muy altas de ácido lleva a una disminución en el pH intracelular, lo que provoca la acidificación del citoplasma y la muerte celular [37, 39, 40]. El aumento de la acidez puede provocar daños en el ADN y el ARN y reducir la actividad biológica y enzimática, como ocurre con las enzimas de la glucólisis [6, 20]. En cuanto al ácido butírico y el acético, la cantidad excedente de ambos provoca el fallo en el paso de la fase acidogénica a solventogénica [14, 34]. El crecimiento de las células en un medio sin control de pH causa la inhibición de solventes, el llamado "acid crash". Si hay más butírico, será tóxico y hará que la fermentación acabe de forma prematura [14].

Es destacable decir que del mismo modo que con otros inhibidores, se ha demostrado que los ácidos débiles a bajas concentraciones, con un valor de pH alrededor de 5,5, pueden aumentar la producción de solvente (etanol con *S. cerevisiae*) y previene la degeneración del cultivo [12, 20, 37, 40].

A parte de los 3 grupos principales de inhibidores que se han comentado, hay otros componentes que causan efectos similares, por ejemplo componentes inorgánicos como los iones, originados en el pretratamiento, de los productos químicos añadidos [37] o como los iones de metal pesado (hierro, cromo, níquel y cobre), que previenen de la corrosión del equipamiento de hidrólisis, pudiendo inhibir el crecimiento de los microorganismos [14]. En pequeñas cantidades puede mejorar la producción de solvente [37]. Otro ejemplo es el propio solvente, como etanol [20] o butanol, haciendo que el total de solventes no pueda superar cierta cantidad (20g/L en el butanol [14]) porque mostraría un fuerte efecto inhibitor en la viabilidad, crecimiento, rendimiento y transporte de azúcares [14, 20, 34].

Como se ha dicho anteriormente, es esencial eliminar estos inhibidores del hidrolizado lignocelulósico para poder obtener buenos rendimientos de solvente durante la etapa de fermentación [41]. El enfoque más importante que se ha desarrollado para tratar de realizar esta función es hacer una etapa de detoxificación antes de la fermentación [11,38]. Los diferentes tipos de detoxificación se agrupan en 3 categorías [6, 11, 14, 20, 38, 40, 41]: Métodos físicos (Evaporación, desorción de vapor, extracción con solventes), métodos químicos (Neutralización, calcium hydroxide overliming, carbon activo, resinas de intercambio iónico) y métodos biológicos (Enzimas-lacasas, microbios). Hay otros estudios que añaden otra categoría más, los métodos integrados (detoxificación in situ por microbios, fermentación incorporada).

Una de las ventajas que presenta la detoxificación es que es un método selectivo y se dirige principalmente a eliminar inhibidores en lugar de azúcares [20], pero antes de llevarlo a cabo, se tiene que tener en cuenta la composición del hidrolizado y la materia prima utilizada [39], ya que cada método tiene su propia especificidad para eliminar los compuestos inhibidores derivados de la pared celular [41]. Además la detoxificación es un proceso caro, por lo que es necesario saber esas características para poder seleccionar uno eficiente y barato [39]. En la Tabla 5 se puede ver un resumen de varios métodos con sus ventajas y desventajas:

Métodos físicos

Normalmente este tipo de detoxificación consiste en el uso de la técnica de evaporación al vacío para así eliminar las sustancias tóxicas volátiles, como el ácido acético y el furfural [12]. El furfural suele ser eliminado en casi su

totalidad mediante este método, pero los compuestos no volátiles se acumularían y permanecen en el hidrolizado [12,41].

Otros métodos que se incluyen en los físicos son stream stripping o destilación al vapor, que consiste en pasar vapor seco a través de los hidrolizados de lignocelulosa, haciendo que se inhiban compuestos como el furfural y los ácidos débiles [41]. La extracción de solvente se realiza para eliminar compuestos de hidrolizados en algún solvente líquido inmiscible, pero debido a la pérdida considerable de azúcares fermentables, se realizó una separación de fases modificado, con dos fases, usando polímeros con sal para su eliminación [41]. Otro ejemplo es la separación asistida por membrana, dejando a un lado los inhibidores al tener las membranas poros muy pequeños de tamaño uniforme. [41]

Métodos químicos

En general, la detoxificación química utiliza un ajuste del pH para hacer que precipiten los inhibidores y se separen posteriormente por métodos como filtración o adsorción [12]. En función de los materiales utilizados para la separación, existen distintos métodos que usan varios químicos alcalinos, los cuales presentan una afinidad específica hacia ciertos inhibidores, u otros materiales como carbón activo o resinas intercambiadoras de iones [12,41].

Neutralización: Como el hidrolizado de lignocelulosa es altamente ácido, se utilizan químicos alcalinos como el hidróxido de sodio para alcanzar pH de 5,5-6,0, para así precipitar los inhibidores y puedan ser separados por filtración. [41]

Método de detoxificación y condiciones	Ventajas	Desventajas	Referencias
Evaporación	Elimina tóxicos volátiles, como el ácido acético, furfural y vainillina. Puede incrementar la cantidad de azúcar	Se acumulan las sustancias no volátiles	[12, 41]
Stream Stripping	Eliminación de los compuestos orgánicos de aguas residuales. Elimina furfural, ácidos débiles y aún más efectivo en fenoles volátiles		[41]
Separación de inhibidores basada en tamices moleculares y de membrana	Reducción del arrastre de la fase orgánica en la acuosa. Concentra compuestos no volátiles y elimina tóxicos volátiles. Elimina entre 92-100% inhibidores	Alto coste y consumo de energía. Requiere de una etapa de filtración.	[41, 43]

Extracción líquido-líquido o extracción de solvente	Proceso efectivo para la extracción de componentes inhibidores	Efecto en la composición química del hidrolizado, centrifugación necesaria para separación de fase. Baja selectividad	[17, 41, 43]
Resinas de intercambio iónico	Efectivo, simple de operar, alto rendimiento de solvente y alta productividad. Aumento fermentabilidad del sustrato. Alta eliminación de los grupos principales de inhibidores.	Alto coste, pérdidas de azúcares fermentables (~26%). Necesidad de compuestos básicos para trabajar a pH 10.	[11, 12, 13, 38, 39, 41]
Carbón activo	Gran capacidad de sorción, fácil de usar y rentable económicamente. Pocas pérdidas de azúcar. No varía con el pH del hidrolizado. Mejora de la fermentabilidad.	Pérdida del 10% en gránulos por cada ciclo. Solo elimina inhibidores en específico	[13, 39, 41, 43]
Overliming	Opción más económica, mejora capacidad de fermentación, eliminación compuestos volátiles, filtración de precipitados	Pérdidas de azúcar, viabilidad a gran escala	[39, 41, 43]
Método biológico, enzimas	Simplicidad, condiciones más suaves, evita el uso de productos químicos, alta efectividad, altamente específico en el sustrato, respetuoso con el medio ambiente, menos residuos, detoxificación más rápida, eliminación de derivados de lignina con poca pérdida de azúcar	Etapas iniciales de lag, incubación larga, alto coste de enzimas, tiempo de reacción lento, especificidad, lo que lo hacen poco atractivo para biorefinerías	[13, 14, 20, 39, 40, 41]
Método biológico, microbios	Reduce la contaminación ambiental, requiere menos energía, condiciones medias de temperatura y presión y el proceso de bioconversión es altamente específico en el sustrato	Detoxificación más lenta que las enzimas, periodo de incubación más largo y pérdida de azúcares fermentables	[13, 40]
Detoxificación microbiana in situ	Eficiente	Gran consumo de azúcares fermentables (hasta 36%)	[40]
Particionamiento bifásico	Efectivo para separar elementos inhibidores	Solvente orgánico, factibilidad a escala piloto	[43]

Tabla 5. Ventajas y desventajas de diferentes métodos de detoxificación

Overliming con hidróxido de calcio: Es uno de los métodos más comunes para la detoxificación. Se agrega hidróxido de calcio al hidrolizado a temperatura ambiente para alcanzar valores de 11 de pH. Más tarde, tras 30 minutos, se



filtra y se ajusta a un pH de 6,0 mediante ácido sulfúrico, filtrándose de nuevo. Como resultado, compuestos como furfural, HMF y fenólicos son eliminados parcialmente, junto con la pérdida de un 10% del azúcar por adsorción [39, 41].

Carbón activo: Es un método viable económicamente, en el que el carbón activo se utiliza para adsorber, teniendo una capacidad específica para eliminar fenoles, furfural y 5-HMF [41]. Presenta unas mínimas pérdidas de azúcar, además se sabe que un ajuste de pH antes de empezar y trabajar a una temperatura alta mejora mucho su eficiencia en eliminar los inhibidores [12].

Resinas de intercambio iónico: Estas resinas son más eficientes para eliminar los 4 grupos principales de inhibidores sin grandes pérdidas de azúcar que con el carbón activo [41]. Este método elimina en concreto de una manera eficiente los fenoles y el ácido acético mediante adsorción de estos cambiando el equilibrio iónico con la introducción de estas resinas, que pueden ser aniónicas, catiónicas o hidrofóbicas [12]. Las resinas de intercambio aniónico funcionan mejor cuando el hidrolizado es ajustado a un pH de 10, lo que necesita gran cantidad de productos químicos básicos [13]. Hay veces que varios métodos de detoxificación se combinan para obtener una mejor ratio de eliminación, como una primera modificación con overliming para después utilizar una resina, resultando una gran mejora en la producción ABE [12].

Métodos biológicos

Los métodos biológicos consisten en el uso de microorganismos y enzimas que actúan en componentes específicos tóxicos que están en el hidrolizado, cambiando su estructura o su composición, convirtiéndolos en componentes menos tóxicos [13]. Además, es una alternativa respetuosa con el medio ambiente, reduciendo la contaminación que otros métodos pueden generar [13,41].

Enzimas: Este tipo de detoxificación es considerado como una vía prometedora dentro de la biotecnología, verde y sostenible, para la detoxificación de lignocelulosa [13,41]. Consiste en la utilización de enzimas que implica la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos de bajo peso molecular [13,41]. Las lacasas y peroxidases muestran características positivas para la polimerización de los fenoles derivados de la lignina y por tanto eliminar estos sin afectar a los niveles de azúcar. Los hongos de la pudrición blanca como *Cythus bulleri*, *Trametes versicolor* son productores de lacasas [40,41]. La detoxificación puede ser realizada más rápido que mediante microbios, por ejemplo, y puede ser realizada a condiciones medias de temperatura y pH [13].

Además de estas 3 grandes estrategias para hacer frente a los inhibidores, hay otros métodos distintos:



Selección de materias primas que tengan una naturaleza menos recalcitrante, ya que de esta manera permite hacer pretratamientos a condiciones medias, reduciendo las concentraciones de furaldehídos y fenoles. También se puede aplicar ingeniería genética para obtener materias primas con esas características [6,20,39].

La modificación de microorganismos para tener una alta resistencia frente a inhibidores es muy recurrente y utilizada [20, 39, 40, 41], pero hay que tener en cuenta también la alta especificidad de estos microorganismos [20]. Hay cepas que pueden ser modificadas genéticamente mediante ingeniería, sobreexpresando genes que codifican y contribuyen al suministro de enzimas y ganar resistencia frente a inhibidores [13, 20, 40], produciendo de esta manera microorganismos que requieren poca o ninguna detoxificación [13]. Un ejemplo es *S.cerevisae*, modificada para producir lacasas, permitiendo de esta manera hacer en una etapa de manera simultánea la detoxificación y la fermentación de etanol, eliminando la etapa extra. (SSF o fed-batch) [13]. También es posible realizar pretratamientos con estos microorganismos, siendo ésta una estrategia indirecta de detoxificación mediante la eliminación de la lignina, mejorando tanto la fermentación como la hidrólisis enzimática [20, 40]. Es una estrategia que se tiene menos en cuenta, pero la mejora de las enzimas para la etapa de hidrólisis y producir menos inhibidores, es otra opción interesante [39].

Por último, también se pueden hacer cambios en las estrategias de fermentación para minimizar los efectos de los inhibidores en los microorganismos fermentadores, como por ejemplo en el etanol, que, usando una alta densidad celular, podrá soportar mejor el estrés de los inhibidores, obteniendo una mayor productividad [40].

Existen varios estudios en los que se comparan los rendimientos y resultados obtenidos por varios métodos de detoxificación, en cuanto a eliminación de inhibidores, consumo de azúcares o rendimientos de solvente [38, 39, 42]. En ellos se puede comprobar que el método de resinas de intercambio iónico, en especial el aniónico con un pH de 10, muestra unos buenos resultados, siendo en Sárvári Horváth et al. (2004) [38] el mejor de entre las 6 resinas comparadas, en Guo et al. (2013) [42], es el que mejores resultados tiene en eliminación de inhibidores tras el método de carbón activo, mientras que por último, en Larsson et al. (1999) [39], en comparación con otros 11 métodos, el aniónico con pH 10 obtiene el mejor rendimiento y productividad de etanol, el mayor rendimiento de biomasa, mejor media de eliminación de inhibidores, incluyendo eliminación de inhibidores como el ácido levulínico que solo lo eliminaba él, mientras que también era el que más azúcar consumía, como se puede comprobar en la Tabla 6.

No	Detoxification method	Y EtOH (g/g)	Q 6 h (g/L/h)	Yx (g/g)
1	Reference fermentation	0.45 ± 0.004	1.46 ± 0.021	0.090 ± 0.001
2	None ^a	0.32 ± 0.004	0.04 ± 0.015	0.010 ± 0.001
3	pH 10 (sodium hydroxide)	0.42 ± 0.005	0.46 ± 0.019	0.015 ± 0.001
4	pH 10 (calcium hydroxide)	0.44 ± 0.007	1.21 ± 0.065	^b
5	pH 5.5, 0.1% sulfite	0.34 ± 0.006	0.09 ± 0.035	0.020 ± 0.001
6	pH 10, 0.1% sulfite	0.42 ± 0.004	0.45 ± 0.015	0.030 ± 0.001
7	pH 5.5, 1% sulfite	0.42 ± 0.005	0.45 ± 0.017	0.020 ± 0.001
8	pH 10, 1% sulfite	0.43 ± 0.004	0.47 ± 0.016	0.040 ± 0.002
9	Evaporation of 10%	0.34 ± 0.006	0.06 ± 0.017	0.015 ± 0.001
10	Evaporation of 90%	0.42 ± 0.010	0.33 ± 0.026	0.030 ± 0.002
11	pH 5.5, anion exchange	0.45 ± 0.008	0.66 ± 0.052	0.060 ± 0.010
12	pH 10, anion exchange	0.49 ± 0.010	1.42 ± 0.040	0.080 ± 0.005
13	Laccase	0.47 ± 0.004	0.68 ± 0.007	0.055 ± 0.003
14	Laccase control	0.32 ± 0.006	0.05 ± 0.032	0.012 ± 0.001
15	<i>T. reesei</i>	0.43 ± 0.005	0.55 ± 0.070	0.055 ± 0.005
16	<i>T. reesei</i> control	0.42 ± 0.006	0.17 ± 0.035	0.030 ± 0.003

Tabla 6. Rendimiento, productividad de etanol y rendimiento de biomasa para diferentes métodos de detoxificación. [39]

Sabiendo mediante estos estudios la gran efectividad que muestra en solventes como el etanol, éste es el método elegido para realizar la detoxificación en nuestro trabajo.

1.4.1.4 Fermentación

Los azúcares obtenidos durante el proceso de hidrólisis pueden ser convertidos en diferentes productos de valor añadido mediante fermentación usando microorganismos [6]. El medio de la fermentación que contiene los sustratos y nutrientes se preparan bajo condiciones estériles [34]. Este medio, para la fermentación ABE, es inoculado con una cepa adecuada productora de butanol, (normalmente cepas clostridia) seguido de una incubación a 35°C, durando la fermentación entre 36 y 72 horas [34]. Sus principales componentes producidos son los solventes (acetona, etanol y butanol) [2], junto con otros subproductos como ácidos orgánicos (ácido butírico y acético) y gases (H₂ y CO₂) [2, 14]. Los solventes suelen obtenerse en un ratio de 3:6:1 respectivamente, siendo la concentración del butanol en torno a un 3% [3].

La fermentación ABE es uno de los bioprocesos más conocidos y cuenta con más de un siglo de historia. Se usó industrialmente para la producción de butanol ampliamente y se convirtió en el segundo proceso de fermentación industrial más grande después del etanol al usar levadura como organismo de fermentación [3].

Louis Pasteur, en 1861, fue el primero en obtener butanol a partir de este proceso biológico [14,44]. Descubrió y aisló por primera vez una cepa productora de ácido butírico, observando más tarde que junto a éste, se produjo butanol [14]. Se realizaron más descubrimientos en el siglo XX, como la producción de acetona, de butanol en 1911 por Fernbach, hasta que Weizman, entre 1912 y 1914 descubrió los primeros *Clostridium acetobutilycum*, que permitió la industrialización de este proceso durante la década de los 40 y 50 [14,44].

Microorganismos

La selección de la cepa o microorganismo es crucial para la producción de ABE, ya que determina el rendimiento de la fermentación e influye en los métodos para el pretratamiento / hidrólisis de la materia prima y la recuperación del disolvente. Muchas cepas capaces de llevar a cabo la fermentación ABE se reconocen actualmente y se pueden clasificar principalmente como cepas de género *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium Acetobutylicum* (*C. Acetobutylicum*), *C. beijerinckii*) y cepas no *Clostridium* (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus buchneri*, *Saccharomyces cerevisiae*) [11].

Son bacterias anaerobias obligatorias, formadoras de esporas, grampositivas y con forma de varilla, presentando un ciclo de vida complejo [12,17]. Debido a algunos genes especiales y varias enzimas producidas en *Clostridia*, se usan principalmente como bacterias productoras de solventes en la fermentación ABE [12], además estas bacterias son capaces de producir ácidos grasos volátiles como el ácido acético y el ácido butírico en condiciones apropiadas de operación como productos secundarios de la mencionada fermentación ABE [3,17]. La producción de ácido ocurre durante la fase vegetativa de las células y la asimilación de ácidos a los solventes ocurre durante el inicio de la esporulación, siendo explicado detalladamente más adelante [17]. Además de las características comunes que clasifican a estas especies como pertenecientes al género *Clostridium*, comparten la capacidad de crecer a temperaturas refrigeradas (<4°C) y se consideran psicrófilos psicrotolerantes [45].

Probablemente debido a la diversidad de los ambientes que habitan (por ejemplo, suelo, sedimentos acuosos, rumen e intestinos), estos microorganismos han evolucionado y desarrollado [46] junto con las vías catabólicas y anabólicas específicas que presentan, una diversidad de sustrato excepcional y son capaces de usar una gran variedad de materiales, incluidos carbohidratos simples y complejos, como glucosa, sacarosa y celulosa, azúcares de pentosas y hexosas, lignocelulosas y gases de síntesis como fuente de carbono (CO, CO₂/H₂) [3, 11, 12, 46, 47]. Últimamente se han probado nuevos materiales como materia prima, como las algas, patatas [31]. La mayoría de las especies producen butanol como producto principal, pero puede producir una gran variedad de productos en cantidades significativas, como 1,3-propanodiol e isopropanol [12, 47]. Una diversidad de sustrato y producto tan excepcional hace que los clostridios solventogénicos sean atractivos para aplicaciones de biorrefinería [47].

El rendimiento de la fermentación ABE utilizando cepas de *Clostridium* de tipo salvaje está altamente limitado por la tolerancia débil a los solventes, el



crecimiento lento y la baja densidad celular durante la fase solventogénica del crecimiento de *Clostridium* [11].

En comparación con las cepas de género *Clostridium*, las cepas que no son de *Clostridium* pueden reducir o eliminar los principales subproductos de la acetona y el etanol de la biología sintética [11]. Aunque el progreso en la ruta del butanol en cepas que no son de *Clostridium* es interesante, las concentraciones de butanol para las cepas que no son de *Clostridium* son mucho más bajas que las de las cepas de género *Clostridium*, razón por la cual, no suelen ser seleccionadas para los procesos [11], tal y como ocurre en este trabajo.

Tipos de *Clostridia*:

Entre la gran variedad de cepas de género *Clostridium*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* y *C. saccharobutylicum* pueden producir solventes con rendimientos relativamente altos durante la fermentación en condiciones apropiadas, siendo éstas las cepas más utilizadas para la producción de butanol [3, 11, 17, 31, 47]. Algunas otras especies de *Clostridium*, por ejemplo, *C. pasteurianum*, *C. tyrobutyricum*, *C. cellulolyticum*, *C. thermocellum*, *C. aurantibutyricum*, *C. pasteurianum*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* y *C. tetanomorphu*, también han despertado interés por sus especificidades de sustrato o producto, mostrando también una producción significativa de butanol [3, 47].

La selección de las cepas bacterianas para la producción de butanol depende de los siguientes factores, (1) tipo de sustrato seleccionado, (2) requerimiento de nutrientes, (3) tolerancia al butanol, (4) rendimiento y concentración dirigidos, (5) resistencia al bacteriófago y antibiótico [3].

Tradicionalmente, la cepa *C. Acetobutylicum* es la que se ha utilizado para la fermentación ABE por ser la más investigada durante el siglo XX, comenzando su andadura en 1914, cuando Wiezmann aisló la cepa *Clostridium acetobutylicum* para producir la acetona-butanol-etanol [3]. Se trata de una bacteria estrictamente anaerobia, del grupo de las gram-positivas, con un tamaño entre 1 y 1,5 μm , flageladas y que forman esporas [48]. *C. acetobutylicum* tiene una alta actividad de amilasa y, por lo tanto, utiliza materiales con almidón, como el maíz y la yuca. Sin embargo, debido al fuerte efecto CCR (represión del catabolito de carbono), *C. acetobutylicum* es menos eficiente en el uso de fuentes de carbono complejas, por ejemplo, hidrolizados lignocelulósicos [47]. Las cepas de *C. acetobutylicum* de tipo natural no son óptimas para la producción de butanol debido al ciclo de vida indeseable de formación de esporas y la tolerancia limitada a la toxicidad del solvente, lo que lleva a una baja concentración de butanol (<12 g / L), productividad (<0.3 g /

L h), y rendimiento (<0.25 g / g). En consecuencia, la producción de butanol por fermentación ABE convencional tiene un alto coste de producción [48].

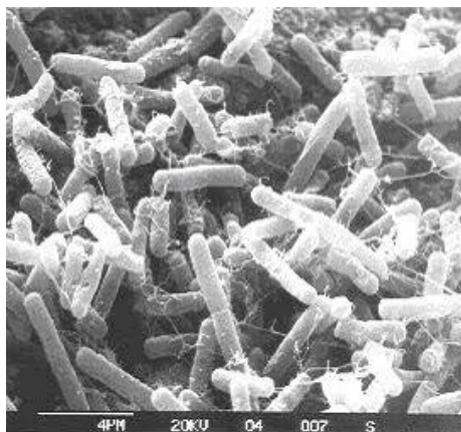


Figura 22. Microfotografía electrónica de *C. acetobutylicum*

C. acetobutylicum fue la principal especie empleada en la fermentación industrial de ABE hasta que se desarrolló una taxonomía más detallada y algunas cepas de *C. acetobutylicum* se reclasificaron como *C. beijerinckii* según el tipo de producto [12].

C. beijerinckii tiene la mejor tolerancia para la presencia de compuestos inhibidores en el medio de fermentación (furfural y furfural 5-hidroximetílico principalmente) y para cambios de pH, mientras que su productividad de butanol puede no ser la más alta entre las cuatro cepas principales mencionadas anteriormente [31]. Tanto *C. beijerinckii* como *C. acetobutylicum* poseen genes que codifican proteínas que facilitan el transporte y el metabolismo de la xilosa. La distribución de estos genes de utilización de xilosa varía según la especie. El sistema de utilización de xilosa está presente como un gran grupo de genes en *C. beijerinckii*, mientras que se distribuyen en varias ubicaciones del genoma en *C. acetobutylicum* [31]. Las cepas de *C. beijerinckii* pueden producir butanol a partir de glucosa, xilosa o hidrolizados lignocelulósicos con altos rendimientos: 0,39 g / g, 0,29 g / g, y 0.27 g / g, respectivamente [49], mostrando por tanto que la preferencia de azúcar de esta cepa es glucosa, seguida de xilosa y arabinosa [9]. *C. beijerinckii* no muestra un gran efecto CCR al fermentar azúcares mixtos. Esto junto con sus tolerancias a inhibidores y cambios de pH, hacen que *C. beijerinckii* parezca estar más indicado que *C. acetobutylicum* para utilizar diversos hidrolizados celulósicos [47].

C. saccharoperbutylacetonicum, siendo otra de las cepas más utilizadas, destaca por ser versátil con respecto a su preferencia de sustrato, y puede usar sustratos a base de almidón y azúcar, con una producción moderada pero constante de butanol [31].

Además de estas cepas principales, hay una gran variedad de bacterias de género *Clostridium* que se pueden clasificar en función de distintos aspectos, como el sustrato, solventes o condiciones bajo las que se desarrolla óptimamente. Hay microorganismos termófilos, como *Clostridium thermocellum* o *Clostridium cellulolyticum*, mejor conocidos como productores de etanol [35], microorganismos capaces de usar gases C1, como CO y CO₂, como *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* y *C. carboxidivorans* [47], incluso un tipo de *clostridia* que produce de manera principal ácido butírico, como *Clostridium butyricum* y *Clostridium tyrobutyricum* [49].

En la Tabla 7 se puede ver un resumen de los sustratos utilizados por varias especies de *Clostridia* junto con sus productos de fermentación.

Species / strain	Substrates	Products	pH	Temp. (°C)
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Glucose, xylose, arabinose, cellobiose, mannose, galactose	Acetone, butanol, ethanol, acetate, butyrate, H ₂ , CO ₂	5.5 – 6.5	35 ± 1
	Starch Lactose Sucrose, fructose, lactose, maltose, cellobiose			
<i>C. carboxidivorans</i> P7	Syngas (H ₂ , CO, CO ₂)	Acetate, ethanol, butyrate, butanol	5.0 - 6.0 6.2 5.7-5.8	37 ± 1
	H ₂ , CO		6.2	
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Glucose, starch, maltose	Acetone, butanol, ethanol, acetate, butyrate, H ₂ , CO ₂	5.6-5.9	30
	Molasses, starch			
<i>C. saccharobutylicum</i> 262	Glucose, xylose, arabinose, cellobiose, mannose, galactose	Acetone, butanol, ethanol, acetate, butyrate, H ₂ , CO ₂	5.5 – 6.5	35
<i>C. butylicum</i> NRRL 592	Glucose, xylose, arabinose, cellobiose, mannose, galactose	Acetone, butanol, ethanol, acetate, butyrate, H ₂ , CO ₂	5.5 – 6.5	35
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Glucose, xylose, arabinose, cellobiose, mannose, galactose	Acetone, butanol, ethanol, acetate, butyrate, H ₂ , CO ₂	5.5 – 6.5	35
	Starch		6.8	36
	Sucrose, fructose		6.8	35
	Maltodextrin		6.5	33-35
NCIMB 8052	Glucitol (sorbitol), mannitol		N/A	37
<i>C. aurantibutyricum</i> ATCC 17777	Glucose, xylan, starch, pectin, arabinose, xylose, galactose, mannose	Acetone, butanol, isopropanol, acetate, butyrate	5.5 – 6.8	37
	Glucose		6.8	35
<i>C. pasteurianum</i> DSM 525	Glycerol	Butanol, ethanol, 1,3-propanediol, acetate, butyrate, lactate	5.0 – 7.0	37
			4.5 – 7.5	35
			7.0	35

Tabla 7. Resumen de clostridias solventogénicas con sus sustratos, productos, pH de fermentación y temperatura [12].

Fases de la fermentación con clostridia

El proceso de fermentación típico de los clostridios solventogénicos se pueden dividir en dos etapas: Acidogénesis y solventogénesis.

- **Acidogénesis:** Durante la primera fase, se metabolizan los azúcares y se genera masa celular. Los principales productos que se originan de la fermentación de carbohidratos, como la xilosa, son los ácidos (acetato y butirato), y el dióxido de carbono y el hidrógeno como gases [49]. También es destacable la formación de ATP (Adenosine triphosphate),

que es esencial para el crecimiento celular como suministro de energía [47]. Duración de la etapa entre 12 y 18 horas.

- **Solventogénesis:** Durante esta etapa, los azúcares cambian de sentido por así decirlo, asimilándose los ácidos anteriormente producidos, y corrigiendo esa bajada de pH provocada en la anterior etapa. La transducción de señales juega un papel clave en el inicio de la solventogénesis. El acetato, el butirato y el pH bajo son las señales extracelulares y los acil fosfatos son las señales intracelulares para el cambio hacia la formación de solventes [17]. Una vez realizados estos pasos, en esta fase se produce la formación de los solventes (acetona, butanol y etanol) [17, 47]. Sin embargo, algunas cepas pueden perder la capacidad de reabsorber estos ácidos; es decir, migrar de la acidogénesis a la solventogénesis, lo que resulta en la obtención de un título de solvente muy bajo, por lo que los ácidos orgánicos se acumulan [49]. La influencia de varios factores, como las condiciones del cultivo, afectan a la concentración, rendimiento, selectividad y productividad del butanol [50]:

- pH medio del cultivo.
- Concentración de ácidos en el cultivo.
- Composición general y métodos de cultivo.
- Temperatura del medio.
- Nivel de nutrientes.

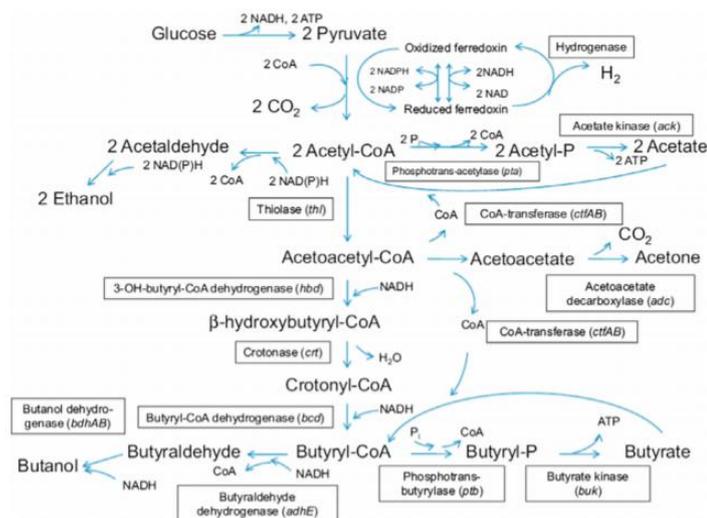


Figura 23. Ruta metabólica para la fermentación ABE empleada por *C. Acetobutylicum*.

[11]

La composición del caldo es muy importante en esta etapa, pero su composición varía mucho dependiendo de factores como el tipo de pretratamiento, sustrato y bacteria utilizado, y como se ha señalado anteriormente, tiempo de fermentación y condiciones del cultivo. [31] Añadido

a esto, existen una serie de limitaciones que pueden llegar a determinar la rentabilidad del proceso [12,31]:

- Para concentraciones mayores a 20g/L de butanol en el caldo, el proceso sufre inhibición por producto.
- La velocidad volumétrica es baja, de 0,5g/(L-h) aproximadamente.
- El rendimiento de producción de butanol también es bajo, en torno a 0,30 g de butanol por cada gramo de sustrato.

La composición de los caldos varía en función de la bacteria seleccionada para llevar a cabo la fermentación. Tradicionalmente, con *C.acetobutylicum*, la proporción de solventes es de 3:6:1, siendo acetona, butanol y etanol respectivamente. A pesar esta variación, los caldos tienen unas características comunes:

- El agua, con alrededor del 90%, es el componente principal de los caldos de fermentación. [14]
- La concentración de solventes no suele superar los 20g/L. [14, 34]
- La concentración de butanol suele ser de 10g/L, salvo si la bacteria esta modificada y sea más resistente a la inhibición por producto. [10]

En la Figura 24 se puede comprobar como varía la obtención de los solventes deseados con el tiempo de fermentación:

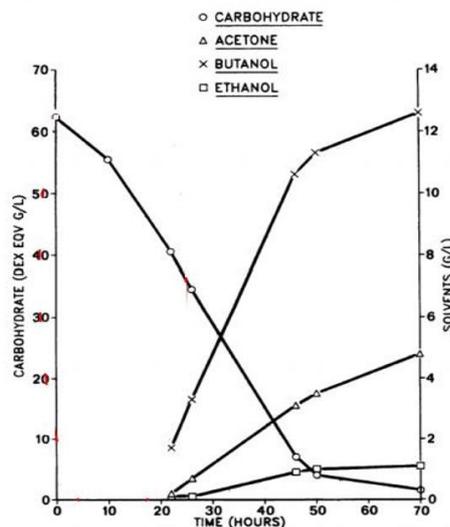


Figura 24. Variación en la concentración de las especies en función del tiempo de fermentación. [51]

Mejoras producidas mediante ingeniería o co-cultivos

El rendimiento de la fermentación ABE utilizando cepas de *Clostridium* de tipo salvaje está severamente limitado por la tolerancia débil a los solventes, el

crecimiento lento y la baja densidad celular durante la fase solventogénica del crecimiento de *Clostridium*, por esa razón, se han probado distintos caminos para poder mejorar la producción de butanol mediante este tipo de fermentación [11]:

Ingeniería genética, sobreexpresando o eliminando genes asociados con la formación de subproductos, mejorando la producción de solventes [14] o eliminando la producción de alguno, como la acetona; mejora mediante mutación o la propia ingeniería de cepas, para mejorar la tolerancia microbiana al butanol, y de esta manera mejorar la producción y rendimiento del butanol. Un ejemplo es el mutante *C. beijerinckii* BA101 de *C. beijerinckii* NCIMB 8052 [12, 17, 50]; mutagénesis aleatoria y combinación genómica, métodos basados en la evolución natural [50]; uso de distintas rutas de fermentación, en lugar de la típica de pretratamiento-hidrólisis (PHF), se desarrolla la CBP, en la que toda la ruta se junta en una única etapa, siendo los microorganismos fundamentales para su desarrollo [50]; las condiciones de cultivo también son un factor muy importante de los que depende el rendimiento de la producción de biobutanol [50]; el co-cultivo es otro método eficaz y rentable, en el que se utilizan dos microorganismos para poder fermentar el máximo posible de los componentes, ya que algunos tienen preferencia por tipos de azúcares simples en concreto [3, 46, 50], y por último, la producción de alcoholes en huéspedes clostridiales no nativos, diseñando e implementando nuevas rutas metabólicas para ello [46].

Métodos de fermentación

El rendimiento de una fermentación ABE depende también del modo de operación elegido para llevarlo a cabo. A continuación, se describen varios, y un pequeño resumen de ellos puede observarse en la Figura 25:

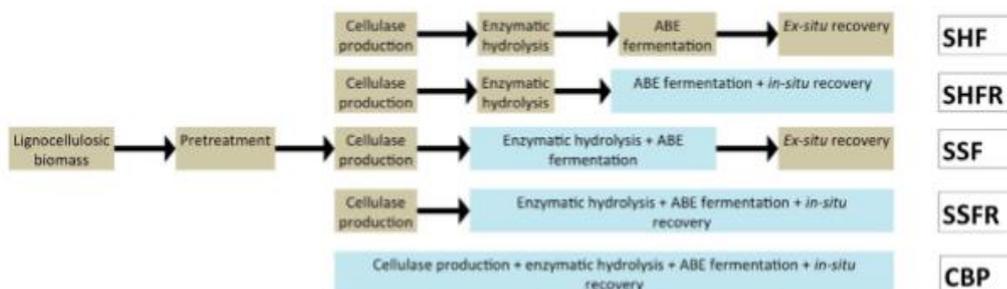


Figura 25. Distintos métodos de realización de hidrólisis y fermentación en biomasa lignocelulósica. [14]

Cultivo en batch

Es el sistema en el cual no hay interacción entre el sistema y el entorno durante los experimentos [44]. En este proceso, considerado como una técnica de fermentación discontinua, los materiales iniciales y suplementos son cargados en el fermentador con los microorganismos únicamente al inicio de la fermentación [20, 44]. Tras ello, la fermentación es llevada a cabo durante un periodo de tiempo, bajo unas condiciones óptimas, como pH, temperatura, etc. [20] sin añadir nada más al fermentador, lo que hará que la concentración de la nutrición disminuya [44]. Una vez acabado, el contenido se sacará para procesarlo y empezar de nuevo [20,44].

Este tipo de reactores son utilizados para la obtención de biobutanol debido a su simplicidad y alta eficacia [3,44], pero debido a las desventajas que presenta, como una fase de retraso prolongada, largo tiempo de producción, toxicidad de los productos finales [3], baja densidad celular, o bajo rendimiento [12], se ha tratado de buscar soluciones como la inmovilización y reciclaje celular [12,31].

Fermentación en fed-batch

Es el sistema en el que mientras se está llevando a cabo la fermentación, sustratos altamente concentrados son añadidos por intervalos en una determinada concentración para así impedir la inhibición del sustrato [12, 20, 44]. Este método suele empezar con un nivel de sustratos parecido al de batch. Mientras éste está siendo utilizado por las células, se va añadiendo pequeñas cantidades de sustrato para reemplazar a lo ya consumido, proporcionando una mejor productividad del reactor y concentración del producto final [12]. Este ciclo puede repetirse cuantas veces se desee.

Comparado con el método batch presenta varias ventajas, como admitir una mayor concentración tanto de sustrato como de producto final [3,17], reducción del volumen del reactor [17], lo que implica una menor cantidad de agua residual generada y una mejora en el proceso económico, reduciendo gastos [12, 17]. Sin embargo, debido a la acumulación del solvente, que puede llegar a causar inhibición en las células, y a la fermentación bifásica de ABE [12,31], este método no suele ser utilizado para la obtención de butanol a no ser que haya integrado en éste un proceso de recuperación [12, 14, 17, 31].

Fermentación en continuo

Este método implica la adición de sustrato en el reactor y la eliminación de los productos de la fermentación de manera continua [3, 17, 20, 44]. Estas dos operaciones se realizan a la misma velocidad [20, 44], dando como resultado que el volumen dentro del reactor siempre permanece constante [3, 20, 44],

reduciendo, de este modo, la fase de retraso o latencia que se asocia a los procesos realizados con batch y fed-batch [17]. De esta manera el porcentaje de producto final es mayor que en los otros métodos [20]. Se puede trabajar con 1 o 2 fermentadores, pero se ha visto que no se puede trabajar más de 2 o 3 semanas, debido a que las bacterias pierden la capacidad de producir disolventes, proceso llamado degeneración del disolvente. Por ello es preferible usar 2 [3, 35]. Se ha demostrado que operar a pH constante da rendimientos mejores que sin mantenerlo constante, siendo el valor óptimo 4,5 [3].

Presenta varias ventajas, como operar en modo continuo, manteniendo la producción constante [3], buena utilización y reducción del reactor [11], bajo coste, calidad constante y productividad alta [44]. Sin embargo, tiene desventajas, como que para tener esa productividad alta, es a costa de obtener una menor concentración de producto debido a la dilución [12], no supera los problemas de toxicidad del butanol [34], el sustrato debe ser inoculado constantemente [44] y presenta pérdida celular durante la extracción del producto, pero se puede utilizar tanto el reciclaje como la inmovilización celular para resolverlo [3, 11, 12, 17], dando mejores resultados para el butanol la inmovilización [17].

Además de los métodos descritos, hay otros, como por ejemplo hidrólisis y fermentación separadas (SHF), que es el proceso empleado cuando se usa biomasa lignocelulósica como materia prima para la fermentación [12]. Este método destaca porque la hidrólisis y la fermentación se realizan en reactores distintos [12, 13, 20], hecho que permite la realización de ambos procesos en condiciones óptimas, que suelen ser pH de 5,0 y 50°C para hidrólisis y sobre los 35°C para fermentación [12, 20]. Además, la levadura puede ser reutilizada después de la fermentación, sin embargo, el uso de este método implica un alto coste de producción debido al alto coste de los equipos y su tiempo de procesamiento. También hay riesgo de contaminación microbiana y bajo rendimiento de solvente debido al tiempo de proceso, unos 14 días [20].

Para poder superar las limitaciones del SHF, se han desarrollado tecnologías de conversión integradas, como SSF, SSCF y CBP. Estas tecnologías realizan en un único reactor la hidrólisis y fermentación, reduciendo los costes, tiempo de producción e inhibidores [20]. La sacarificación y fermentación simultánea (SSF) es el proceso en el que se llevan a cabo las 2 operaciones en el mismo reactor y al mismo tiempo, pudiéndose hacer con la adición de celulasa para realizar la hidrólisis al material pretratado, y microorganismos para la fermentación ABE, todo ello en un mismo recipiente [12, 14]. SSF es un método más sencillo, ya que no es necesaria la etapa de hidrólisis y todo se realiza en un reactor [14, 20], pero su mayor inconveniente es la temperatura a la que se realiza, ya que la celulasa trabaja entre los 45-60°C y la fermentación sobre los 35° [12, 14, 20], viéndose obligado a realizarlo a unos 40°C, que es la



temperatura máxima a la que puede trabajar la clostridia, afectando por tanto el proceso de hidrólisis y aumentando la utilización de la enzima [13, 14].

La recuperación in situ es una técnica utilizada para reducir la toxicidad del butanol, y así poder tener más un 2% de concentración [14]. La introducción de esta técnica en SSF conforma SSCF, reduciendo las inhibiciones celulares y mejorando la producción ABE [14]. Mientras que, en todas las técnicas descritas, las enzimas se obtienen del exterior o produciéndolas en una unidad separada, en CBP (Bioprocesamiento consolidado), las enzimas y el solvente son producidos en un reactor por un conjunto de microorganismos (Bacterias, hongos, levaduras.) [20]. Por lo tanto, la producción de celulasa, la hidrólisis de celulosa y fermentación se realizan en un solo paso, reduciendo mucho los costes [20]. Se podría incluso añadir también la recuperación in situ y el pretratamiento, para hacer todo el proceso en un paso, pero esto llevaría a un peor título de solvente [14].



2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo es el análisis de un proceso de detoxificación, utilizando resinas poliméricas (funcionales y no funcionales), tanto a la corriente líquida generada en el pretratamiento ácido de la materia prima lignocelulósica, como del hidrolizado enzimático de la fracción sólida resultante

Para conseguir este objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de la eficiencia de diferentes resinas en la etapa de detoxificación para disminuir la presencia de elementos inhibidores y así aumentar la eficiencia del proceso. Para ello se harán diferentes experimentos para analizar la influencia de las principales variables del proceso en la concentración y selectividad del producto final.
- Análisis de la influencia del proceso de detoxificación en la etapa de fermentación para la obtención del butanol, en términos de rendimiento y productividad.
- Realización de un estudio económico preliminar para evaluar el coste que supondría la introducción de esta etapa de detoxificación en el proceso de producción de butanol.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Jaime Aguado García
Grado en Tecnologías Industriales

3. Procedimiento experimental

A continuación, se va a explicar de manera detallada los diferentes ensayos realizados en laboratorio, los métodos analíticos utilizados para obtener los distintos parámetros del proceso y los materiales que se han utilizado en los mismos.

3.1 Selección de resinas de intercambio iónico para detoxificación. Ensayos en medio modelo

De entre todas las resinas disponibles, se han elegido las resinas de intercambio iónico aniónicas para ser utilizadas en específico para este trabajo. La razón principal por la cual se han seleccionado es porque los compuestos fenólicos que se quieren eliminar tienen un carácter aniónico, y por tanto, las resinas de intercambio iónico deben tener el mismo carácter para poder intercambiar el anión y que éste quede, retenido por la resina produciéndose la eliminación.

A pesar de haberlas elegido por esta razón, también puede ser que una parte de los compuestos queden retenidos por fenómenos de adsorción, como ocurre con los azúcares.

3.1.1 Resinas de intercambio iónico

En este apartado se describirán las características más relevantes de las resinas utilizadas en la experimentación, pudiendo encontrarse las hojas de características completas en los anexos de esta memoria. Como ya se ha comentado anteriormente, se trata de resinas de intercambio aniónicas y se han elegido 4, que a su vez se pueden dividir en 2 grupos, dependiendo del carácter del anión principal:

- Resinas aniónicas de base fuerte: Lewatit VP OC 1074 y Lewatit MP Monoplus 500
- Resinas aniónicas de base débil: Lewatit A 365 y Lewatit S 4528

Lewatit VP OC 1074

Lewatit VP OC 1074 es una resina básica fuerte, macroporosa y de tipo I de intercambio aniónico, formada por poliácridamida. Tiene forma de grano y tiene una distribución especial del tamaño del grano para poder usarse en distintos procesos, como:

Tiene una excelente estabilidad mecánica, buena estabilidad química y propiedades osmóticas, que le hacen ser adecuado para la decoloración de los jugos de la producción de azúcar, especialmente de la caña de azúcar.



La estructura macroporosa y la equilibrada matriz de la resina facilitan la velocidad de desarrollo de la adsorción y la desorción. Sustancias adsorbidas, como, por ejemplo, sustancias orgánicas aniónicas hidrofílicas de alto peso molecular y colorante de soluciones azucaradas, pueden ser deabsorbidas fácilmente mediante regeneración con una solución de cloruro de sodio neutral o alcalina. Esta resina también es altamente recomendada para usarla donde se requiera la eliminación completa y rápida de una concentración alta de sustancias orgánicas.

Lewatit MonoPlus MP 500

Lewatit Monolus MP500 es una resina de intercambio aniónico de tipo I, macroporosa y básica fuerte con granos de tamaño uniforme (monodisperso) formado por un copolímero de estireno-divinilbenceno, diseñado para todas las aplicaciones de desmineralización.

Los granos monodispersos tienen una alta estabilidad química y osmótica. La monodispersidad extremadamente alta (coeficiente de uniformidad: máx 1,1) y el muy bajo contenido de máx 0,1% ($<0,315\text{mm}$) dan como resultado pérdidas de presión particularmente bajas en comparación con las resinas estándar. Debida a su estructura macroporosa especial, la resina puede realizar adsorción y desorción efectivas de sustancias orgánicas naturales.

Esta resina se puede usar sobre todo para la demineralización de agua para generación industrial de vapor y para distintos procesos de pulido.

Esta resina también permite trabajar con altos caudales durante la regeneración y carga además de, tener una buena eficiencia de utilización, necesitar poca agua durante el lavado y permitir una buena separación de los componentes en las aplicaciones en lecho mixto.

Lewatit S 4528

Es una resina de intercambio aniónico, macroporosa, básica débil de grado alimenticio basada en poliestireno. Tiene forma de grano y tiene una distribución especial del tamaño de estos granos que le permite ser usado para procesos como sistemas de regeneración de corrientes estándar.

La resina S-4528 también es adecuada en su forma de base libre para la eliminación de ácidos, así como para la decolorización simultánea de soluciones de productos orgánicos como azúcar, gelatina, glicerina, mosto de uva, concentrados de frutas, etc.

Su estructura macroporosa asegura una muy buena adsorción tanto de sustancias orgánicas como ácidas. Estos son adsorbidos por regeneración con solución de sosa cáustica. En relación a su baja basicidad, la resina puede ser



usada en el tratamiento de productos susceptibles a los álcalis. La isomeración parcial resultante del contacto con la resina de intercambio iónico, como por ejemplo la conversión de glucosa en fructosa y manosa, es insignificante.

Lewatit A 365

Es una resina de intercambio aniónico de basicidad débil, calidad alimentaria, tipo gel, basada en un polímero de poliacrilato. A365 ha sido diseñado para ofrecer una capacidad de operación excepcionalmente alta, buena estabilidad física y una excelente resistencia al choque osmótico mecánico.

La matriz acrílica de la resina ofrece una cinética rápida para aniones comunes, incluyendo aniones más grandes y voluminosos como el sulfato. Esta resina es completamente regenerable con NaOH y otras bases débiles y el consumo necesario para la regeneración está cerca del estequiométrico al ser una verdadera resina de base débil. Esta resina está recomendada para aplicaciones como la desmineralización de agua de alta TDS, eliminación selectiva de sulfatos, purificación de soluciones acuosas, incluidas aplicaciones de decoloración y cartuchos de un solo uso.

Esta resina es suministrada en una distribución de tamaño de partícula heterodispersa como granos esféricos en su forma libre húmeda. La manera en la que está preparada hace que presente bajas pérdidas de presión durante los servicios que realiza.

En la Tabla 8 se comparan las distintas características fisicoquímicas de las 4 resinas elegidas:

Características/Resina	VP	MP 500	S 4528	A 365
Capacidad total (min.eq/l)	0,85	1,1	1,7	3,4
Coefficiente de uniformidad (max.)	1,8	1,1	1,6	1,7
Tamaño efectivo (mm)	0,55(+/-0,05)	0,62(+/-0,05)	0,5	>0,4
Densidad aparente (+/- 5%, g/l)	720	640	620	730
Densidad (g/ml)	1,08	1,06	1,02	1,13
Retención de agua (wt. %)	66-72	60-65	46-52	44-51
Cambio de volumen	-	22	45	16
Estabilidad (Rango pH)	0-14	0-14	0-14	0-14
Estabilidad (Rango temperatura °C)	-	-	-	1-70
Almacenabilidad (producto, años)	2	2	2	2
Almacenabilidad (Rango temperatura, °C)	-20/+40	-20/40	-20 / 40	-20 /+40

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de las resinas proporcionados por el fabricante

3.1.2 Medios modelo

En esta parte del trabajo, los experimentos no se harán con materia prima, sino que se trabajará con medios que simulan lo más posible la composición del líquido pretratado y del hidrolizado enzimático. El objetivo que se pretende conseguir es, de entre las 4 resinas seleccionadas para este experimento, determinar cuál o cuáles de ellas tienen un mejor rendimiento para la etapa de detoxificación. El motivo por el que se hace con estos medios modelo es que permite conseguir el objetivo marcado sin la necesidad de malgastar materia prima y tiempo únicamente en decidir cuál es mejor utilizar, además de que realizar el pretratamiento y la hidrólisis es mucho más largo que simular su composición y hacer estos medios modelo.

La composición que se utiliza para estos medios ha sido obtenida de un trabajo anterior (Plaza et.al 2017) [9] en el que se estudia los efectos de un pretratamiento ácido para la obtención de biocombustibles, analizando las dos corrientes líquidas, pretratado e hidrolizado enzimático, por lo que es similar a lo que realizamos aquí, por esa razón es elegido. Los componentes que forman los medios son azúcares fermentables y fenólicos, que son los componentes inhibidores de la detoxificación. En la tabla 9 se indican las concentraciones utilizadas en la preparación de los medios modelo:

	Líquido pretratado	Hidrolizado enzimático
Glucosa (g/L agua)	15	40
Xilosa (g/L agua)	30	15
Arabinosa (g/L agua)	15	0
Cumárico (g/L agua)	1	0,5
Ferúlico (g/L agua)	1	0,5

Tabla 9. Composición de los medios modelo.

Dentro de los componentes fenólicos, se han seleccionado los ácidos cumárico y ferúlico, ya que, de acuerdo con la bibliografía consultada, son dos los de los compuestos mayoritarios en este tipo de material lignocelulósico, y por lo tanto con la inclusión de estos dos componentes en la composición del medio modelo, se tiene una buena representación de los fenólicos.

3.1.3 Descripción de los ensayos realizados

Como se ha señalado en el apartado anterior, lo que se busca aquí es realizar la detoxificación para elegir una de las resinas, así que se puede resumir los ensayos realizados en la preparación de los medios modelo y la realización de la detoxificación.

Para la preparación de los medios modelos, se pesa cada uno de los componentes por separado, y se llevan a un vaso de precipitados de 1L, añadiendo agua destilada de tipo II hasta unos 500mL. Para facilitar la disolución, se coloca el vaso sobre una placa calefactora provista de agitación magnética, y mediante un imán que se coloca en el fondo del frasco, la mezcla se va moviendo para poder diluirse. Pueden presentar alguna dificultad para diluirse totalmente, por lo que es recomendado realizarlo con calor. Una vez disuelta la mezcla, se lleva a un matraz de 1L, enrasando con agua hasta el volumen final.

Tras realizar esta preparación, lo siguiente es la detoxificación mediante resinas de intercambio iónico, siendo el primer paso de este proceso, la preparación de las resinas ya que llevan un tiempo sin utilizarse.

Es necesario activarlas para que recuperen sus propiedades. Para ello, se introducen 15 g de resina en un frasco de al menos 250mL, y se añade una disolución 1M de NaOH en cantidad suficiente y se somete a agitación magnética durante varias horas a 200 rpm. Este proceso se repetirá para cada una de las 4 resinas. Una vez reactivadas, se procede al lavado con agua y posterior filtrado al vacío (mediante una bomba de vacío, un embudo y filtros para análisis cuantitativo de 80g/m² de 0'185mm de espesor y de 43-48 μm de tamaño de poro), El proceso se repite al menos tres veces para asegurar un lavado correcto de la resina. Tras haber realizado esto, las resinas están preparadas para su utilización.



Para llevar a cabo la detoxificación, se utilizarán 12 recipientes de tipo penicillium flasks de 100mL. El volumen total de disolución a detoxificar será de 50 mL, a los que se añadirán diferentes porcentajes de resina (%w/v), para analizar la influencia de este parámetro sobre la pérdida de azúcares y la eficacia de eliminación de los diferentes inhibidores a distintas concentraciones.

Dentro de cada frasco habrá 50mL, por lo que sabiendo que los porcentajes que se van a utilizar son 1%, 2% y 3%, se tendrá que echar de cada una de las resinas 0,5, 1 y 1,5 g respectivamente. Todos los ensayos se realizarán por duplicado.

Cuando ya esté todo preparado, los frascos se tapan con un tapón de plástico, atravesado por una jeringuilla, para permitir la salida de posibles gases y, se introducen en un agitador orbital a 35°C de temperatura, 200 rpm durante 24 horas, tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio de adsorción/intercambio iónico.

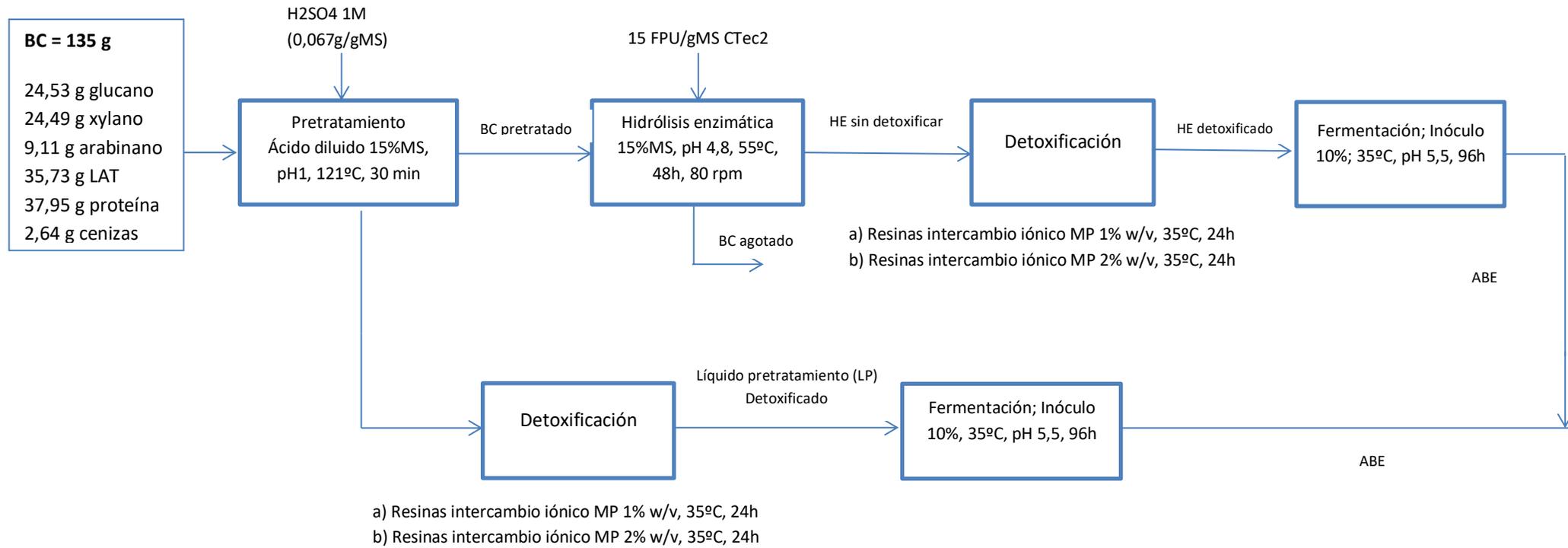
Se tomarán muestras de los líquidos al inicio y al final de la detoxificación (por triplicado), para su posterior análisis.

3.2 Ensayos en medios reales

Una vez realizados los ensayos en medios modelo, han sido elegidas las resinas que mejor se adaptan a las necesidades que requiere la detoxificación, por lo tanto, ahora se trabajará con bagazo de cerveza, teniendo que obtener las corrientes líquidas a partir de éste, realizar la detoxificación con las resinas seleccionadas y trabajar con los medios reales obtenidos para estudiar el rendimiento obtenido de fermentación y producción de biobutanol.

3.2.1 Diagrama de bloques del proceso completo

El diagrama de bloques completo, con todos los datos de cada una de las corrientes se puede consultar en los Anexos.



3.2.2 Descripción de los ensayos realizados

Los ensayos realizados con medios reales son:

- Pretratamiento ácido y térmico
- Hidrólisis enzimática
- Detoxificación
- Inoculación y fermentación

3.2.2.1 Pretratamiento ácido y térmico

Este pretratamiento es realizado para remover la lignina y alterar la estructura lignocelulósica, con la intención de que se incremente el rendimiento de los azúcares fermentables para etapas posteriores, como la hidrólisis enzimática.

Se llevó a cabo un pretratamiento térmico, con catalizador ácido a pH 1, mediante ajuste con H_2SO_4 1M, trabajando con una carga de sólidos (bagazo de cerveza), del 15% MS, temperatura de 121°C y un tiempo de reacción de 30 minutos en autoclave. El slurry resultante se filtra mediante una malla, obteniéndose dos corrientes: Una fracción líquida a la que se denomina líquido de pretratamiento y una fracción sólida, que constituye el sólido pretratado, que será sometido posteriormente a hidrólisis enzimática.

La fracción sólida se lava con agua, se ajusta el pH hasta un valor de 5,5 con NaOH 10M y se filtra de nuevo, separando el sólido resultante, que se desmenuzará y secará en una estufa para su posterior caracterización y utilización.

3.2.2.2 Hidrólisis enzimática

Este proceso tiene como objetivo liberar los azúcares presentes en el sólido pretratado, contenidos principalmente en las fracciones celulósica y hemicelulósica de la materia prima. Para ello, se utilizan enzimas específicas, capaces de hidrolizar dichas fracciones en azúcares simples potencialmente fermentables.

El sólido pretratado se somete a hidrólisis enzimática en un reactor de alta carga de sólido de doble cámara. Las condiciones bajo las que se realiza este ensayo son: 15% de carga de sólidos MS, 0,27g/gMS de enzimas comerciales, pH de 4,8, 55°C, 80 rpm y tiempo de 48 horas.

El reactor en el que se lleva a cabo esta etapa se encuentra encamisado para mantener una temperatura de operación de 50-55°C. Por la parte superior, a través de las boquillas provistas en la tapa, se añaden primero las enzimas, después el agua, y tras ello, se va añadiendo el sólido pretratado, previamente calculado, hasta alcanzar el 15% MS. A medida que se va introduciendo el



sólido, debe controlarse la velocidad de agitación y el par de agitación para evitar problemas con el motor del agitador, ya que el elevado porcentaje de sólidos y su carácter altamente higroscópico dificulta la agitación.

El reactor dispone de un sistema de control de pH, de forma que éste se mantenga en un valor fijo de 4,8 (valor óptimo para la operación con estas enzimas). El sistema de control consiste básicamente en una sonda de pH, de forma que, si el pH varía de la consigna fijada, se procede a la adición de un álcali o ácido desde dos depósitos.

Una vez transcurridas 48 horas, se retira la tapa superior del reactor y se procede a la filtración del slurry que ha sido obtenido. El procedimiento a seguir es similar al seguido en la etapa de pretratamiento: Se filtra el slurry, obteniendo una fracción sólida, que se denomina sólido agotado, que será pesado para plantear los balances globales de materia, y una fracción líquida que constituye el hidrolizado enzimático, del cual cogeremos una muestra para su posterior análisis en HPLC y así cuantificar la presencia de inhibidores y la recuperación de azúcares.

3.2.2.3 Detoxificación

El proceso a seguir es similar al llevado a cabo en los ensayos con medios modelo. En este caso ya han sido seleccionadas tanto la resina como las concentraciones que mejores resultados han dado en el ensayo anterior, por lo que se llevarán a cabo un menor número de muestras.

La resina que se usa puede ser del sobrante que se ha recuperado al hacer el anterior ensayo, pero puede que se tenga que volver a regenerar, como ha ocurrido en este caso, si ha pasado demasiado tiempo. Se utilizarán 8 penicillium flasks de 100mL, con porcentajes de resina del 1% y 2% en este caso (0,5 y 1 gramos de resina respectivamente), y para cada medio. Cuando estén preparados todos los frascos, se tapan con un tapón de plástico atravesado con una jeringuilla y son introducidos en un agitador orbital con las mismas condiciones que anteriormente, 35°C de temperatura, 200 rpm durante 24 horas.

Una vez finalizado el proceso de detoxificación, se toman muestras por triplicado, para su posterior análisis y se guarda la disolución filtrada para su fermentación.

3.2.2.4 Inoculación y fermentación

En primer lugar, se lleva a cabo el crecimiento del microorganismo a utilizar en la fermentación. Este proceso es realizado para poder reactivar el stock, que



es el medio líquido donde se encuentra la bacteria que vamos a utilizar para realizar más tarde la fermentación: *Clostridium beijerinckii*.

Para ello se prepara una disolución, con la misma proporción de glucosa y de xilosa, junto con agua destilada de tipo II hasta los 80mL, que se esteriliza a 120°C durante 40 minutos. Mientras tanto, el microorganismo, que se conserva en frigorífico en medio líquido, se dispone en el agitador a 35°C, primero para que la bacteria se reactive un poco y para que todo el material depositado en el fondo se mezcle.

Posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar se realizará la inoculación del microorganismo en el medio de crecimiento: En un frasco previamente esterilizado se añade la mezcla de xilosa y glucosa, los nutrientes y finalmente el microorganismo. Tras 24 horas en un incubador orbital, a 37°C, se obtiene un inóculo adecuado para su uso en la fermentación.

Una vez obtenido el inóculo, se procede a realizar la fermentación de las corrientes detoxificadas que proporcionaron los mejores resultados de eliminación de compuestos fenólicos, tanto el líquido de pretratamiento como para el hidrolizado enzimático. Asimismo, se lleva a cabo la fermentación de las corrientes sin detoxificar. La fermentación se realiza en frascos de vidrio encapsulados provistos de aguja para la eliminación de los gases generados durante la fermentación, principalmente de dióxido de carbono. Se inocula el microorganismo en una proporción 1:10 (v/v) a las diferentes corrientes y se introducen en un incubador orbital, a 30°C y 150 rpm durante 96 horas.

De esta etapa del proceso, se toma muestra (por triplicado) al inicio y a final de la fermentación (t=0 y t=96h) para su posterior análisis, en una proporción 1:2.

3.3 Métodos analíticos

1. Caracterización de la materia prima

Para la caracterización del bagazo de cerveza, en lo que se refiere a extractivos, carbohidratos estructurales, lignina y cenizas, se han seguido los métodos del National Renewable Energy Laboratory [52].

2. Determinación de azúcares y solventes mediante HPLC.

Mediante HPLC o cromatografía líquida de alta resolución son determinados diferentes compuestos: azúcares fermentables (glucosa, xilosa y arabinosa) y solventes (acetona, butanol, etanol) como productos del proceso de fermentación.



El cromatógrafo usado (WATERS HPLC) está dotado de un detector con medida del índice de refracción (Waters 2414 Refractive Index Detector) y una columna Aminex 87-H de Biorad. Se utilizó como fase móvil H₂SO₄ 5 μM con un flujo de 0.6 mL/min, temperatura 60 °C y un volumen de inyección de 20 μL.

Las muestras de hidrólisis y fermentación contenidas en tubos eppendorf se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos (EPPENDORF, MiniSpin). Se realizó una dilución 1:5 con agua Milli-Q del sobrenadante. Esta dilución se filtró por medio de filtros de jeringa de 0.22 μm y se almacenó en viales de HPLC hasta su análisis.

3. Determinación de compuestos fenólicos

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó a partir del método de Folin-Ciocalteu [53], empleando ácido gálico como patrón y una absorbancia de 765 nm.

La concentración de los compuestos fenólicos individuales (ácido ferúlico y ácido cumárico) se llevó a cabo mediante HPLC, siguiendo el método descrito por Zarena y Sankar (2012). Se utilizó una columna Bondapak C18 (Waters, Irlanda), a 30 °C y detector DAD (a 280 nm). Como fase móvil se utilizó una mezcla agua:metanol:ácido acético (85:14:1) con un flujo de 1.0 mL/min.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Jaime Aguado García
Grado en Tecnologías Industriales

4. Resultados

El objetivo de este capítulo es recoger los distintos resultados que se han obtenido con los medios que se han utilizado.

4.1 Ensayos en medios modelo

La etapa de detoxificación como se ha visto, es un importante proceso previo para poder alcanzar el mejor rendimiento de fermentación. Como se ha comentado en el apartado anterior, en primer lugar, se han realizado ensayos de detoxificación utilizando medios modelo, para poder comparar de una manera más sencilla el rendimiento de la detoxificación en función del medio, del tipo de resina y de la relación resina/disolución, y así, más adelante, trabajar en el medio real con las condiciones de operación más adecuadas.

En primer lugar, se estudiará el comportamiento de dos resinas fuertes: Lewatit MonoPlus MP 500 y Lewatit VP OC 1074. Estas resinas eliminan todos los aniones y su uso se ha generalizado para eliminar aniones débiles. Como se ha comentado anteriormente, se caracterizan por tener una estructura macroporosa, forma de granos o perlas, proporcionándolas una alta estabilidad mecánica, química y osmótica, destacando de sus características fisicoquímicas que presentan una mayor retención de agua que las resinas débiles.

Posteriormente, se analizará el comportamiento de otras dos resinas débiles: Lewatit A365 y Lewatit S4528. Las resinas aniónicas débiles eliminan con gran eficiencia los aniones de los ácidos fuertes, tales como sulfatos, nitratos y cloruros. Como características principales, destaca que tiene forma de perlas o granos, similar a las fuertes, y que a pesar de que las resinas débiles no se suelen poder utilizar en rangos altos de pH debido a problemas de oxidación, estas dos elegidas tienen un rango de estabilidad de 0 a 14 de pH.

4.1.1 Resinas fuertes

A continuación, se podrá ver cuál es el efecto de estas dos resinas fuertes en la producción de azúcares fermentables y de la eliminación de compuestos tóxicos, tanto en la corriente líquida procedente del pretratamiento (líquido pretratado) como en la corriente líquida procedente de la hidrólisis enzimática (hidrolizado enzimático).

Las características, en cuanto a composición, de ambos medios son las siguientes:

- Líquido pretratado (g/L agua): Glucosa: 15g/L; Xilosa: 30g/L; Arabinosa: 15g/L; Cumárico: 1g/L; Ferúlico: 1g/L

- Hidrolizado enzimático (g/L agua): Glucosa: 40g/L; Xilosa: 15g/L; Cumárico: 0,5g/L; Ferúlico: 0,5g/L

4.1.1.1 Líquido pretratado

En la Tabla 10 se muestra la cantidad inicial y final de ácidos cumárico y ferúlico presente en el medio modelo simulando un líquido pretratado al someterle a la detoxificación. Las figuras 26 y 27 muestran los porcentajes de eliminación obtenidos para ambos ácidos.

Líquido pretratado		Cumárico		Ferúlico	
Resina	%(m/v) Resina/disolución	Inicio (g/L)	Final (g/L)	Inicio (g/L)	Final (g/L)
VP	1%	1,982	1,577	1,555	0,676
	2%	1,982	0,317	1,555	0,283
	3%	1,982	0,108	1,555	0,093
MP	1%	1,982	0,471	1,555	0,542
	2%	1,982	0,083	1,555	0,127
	3%	1,982	0,016	1,555	0,023

Tabla 10. Concentraciones de ácido cumárico y ácido ferúlico al inicio y al final de la detoxificación con resinas fuertes.

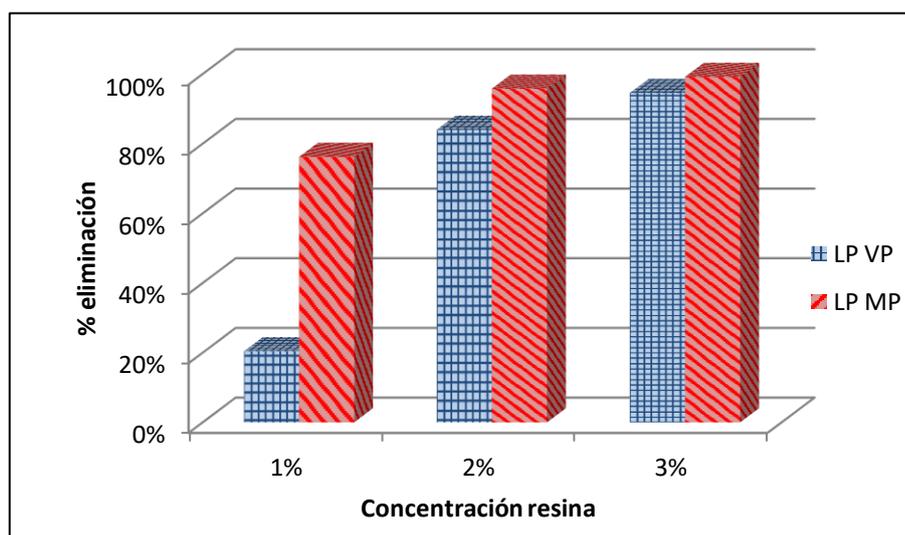


Figura 26. Porcentaje de eliminación de ácido cumárico en el líquido pretratado.

Como se puede observar en la figura anterior, ambas resinas presentan una mayor eficacia cuanto mayor sea el porcentaje de resinas utilizado, siendo el porcentaje de eliminación con un 3% en peso cercano al 100%, sobre todo en la resina MP, 99,17%.

Por otra parte, la resina MP elimina una mayor cantidad de ácido cumárico, para cualquiera de las cantidades de resina utilizadas, siendo para el 1% de concentración de resinas, un 20,40% para VP y 76,21% para MP, para 2%, 84% y 95,77% y para el 3%, 94,54% y 99,17% respectivamente, por lo que, para este medio, la resina MP es mejor.

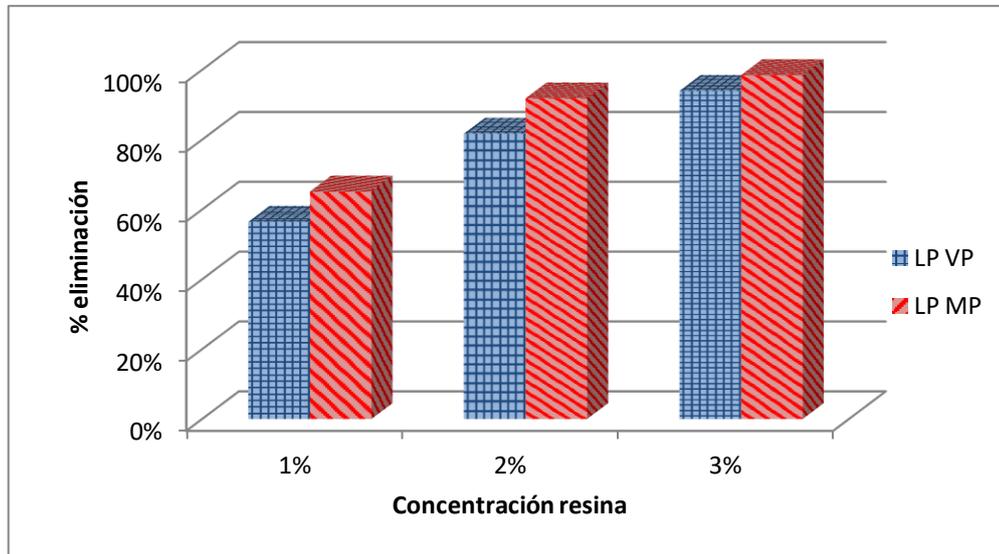


Figura 27. Porcentaje de eliminación de ácido ferúlico en el líquido pretratado

Con respecto a la eliminación de ácido ferúlico, el comportamiento es análogo al observado con ácido cumárico, de suerte que el porcentaje de eliminación de ácido ferúlico aumenta con la cantidad de resina utilizada, llegando a alcanzar con la máxima concentración de resina unos porcentajes de eliminación del 93,96% para VP y del 98,48% para MP.

En esta figura se puede ver que la resina MP llega a alcanzar valores más altos de eliminación que la resina VP, siendo éstos en concreto: Con 1% de concentración de resina, 56,49% VP y 65,12% MP, para 2%, 81,74% VP y 91,81% MP, y para 3%, 93,96% VP y 98,48% MP, por lo que se puede decir que la resina MP vuelve a ser más efectiva que la VP para este proceso.

Por otra parte, se ha llevado a cabo un análisis del comportamiento de las resinas fuertes utilizadas en relación con la potencial pérdida de azúcares potencialmente fermentables. En la Tabla 11 se puede ver la cantidad de glucosa, xilosa y arabinosa que presenta el medio al inicio y al final.

Como se desprende de los datos recogidos, a mayor cantidad de resina aumenta la cantidad de azúcares retenidos por la misma y por tanto las pérdidas de azúcar, hasta un máximo de 8,59% para la resina VP y de 9,24% para la resina MP, siendo en ambos casos glucosa y trabajando la resina VP con un 2% (m/v) de resina y trabajando con un 3% (m/v) la resina MP.



Por otra parte, se observa que, para los menores porcentajes de resina, la resina MP retiene menos azúcares que la resina VP. Así, por ejemplo, para un 1% (m/v) de resina, las pérdidas de glucosa fueron del 8,22% y 7,29% respectivamente para las resinas VP y MP. A medida que aumenta la cantidad de resina utilizada, se van igualando las pérdidas de azúcares e incluso al 3% (m/v), esta tendencia se invierte de forma que se observa una mayor pérdida de azúcares, siendo éstas en glucosa del 8,57% y del 9,24% respectivamente para las resinas VP y MP. También se observa con los otros azúcares al mismo porcentaje (3% (m/v)): 8,16% VP y 8,49% MP para xilosa y 7,22% VP y 7,47 MP para arabinosa.

A partir de los datos que se han mostrado en las tablas y figuras se puede decir que, para las concentraciones de 1 y 2%, la resina MP es claramente mejor dado que se elimina un mayor porcentaje de inhibidores con las menores pérdidas de azúcar, mientras que para la relación resina/disolución más alta, 3%, aunque se elimina una mayor cantidad de inhibidores, las pérdidas de azúcares fermentables son mayores. Aun así, no es una diferencia sustancial, por lo que aquí seguiría siendo mejor la MP.



Líquido pretratado		Glucosa			Xilosa			Arabinosa		
Resina	% (m/v)	Inicio	Final	% pérdida	Inicio	Final	% pérdida	Inicio	Final	% consumo
VP	1%	15,75	14,46	8,22%	31,53	29,08	7,78%	15,84	14,73	7,03%
	2%	15,75	14,40	8,59%	31,53	29,02	7,97%	15,84	14,63	7,67%
	3%	15,75	14,40	8,58%	31,53	28,96	8,16%	15,84	14,70	7,22%
MP	1%	15,75	14,60	7,30%	31,53	29,43	6,66%	15,84	14,79	6,65%
	2%	15,75	14,42	8,45%	31,53	29,06	7,82%	15,84	14,65	7,53%
	3%	15,75	14,30	9,25%	31,53	28,85	8,49%	15,84	14,66	7,47%

Tabla 11. Pérdida de azúcares fermentables en el líquido pretratado para detoxificación con resinas fuertes.

Hidrolizado enzimático		Glucosa			Xilosa			Arabinosa		
Resina	% (m/v)	Inicio	Final	% pérdida	Inicio	Final	% pérdida	Inicio	Final	% consumo
VP	1%	37,32	37,30	0,05%	14,28	14,28	-0,01%	No presenta arabinosa		
	2%	37,32	35,98	3,59%	14,28	13,84	3,14%			
	3%	37,32	35,50	4,89%	14,28	13,56	5,04%			
MP	1%	37,32	36,54	2,09%	14,28	13,94	2,40%			
	2%	37,32	36,29	2,76%	14,28	14,21	0,53%			
	3%	37,32	35,80	4,08%	14,28	14,25	0,22%			

Tabla 12. Pérdida de azúcares fermentables en el hidrolizado enzimático para detoxificación con resinas fuertes.

4.1.1.2 Hidrolizado enzimático

Con este medio se vuelve a realizar lo mismo, se estudia la acción de este tipo de detoxificación mediante los datos de inhibidores y azúcares fermentables, que se recogen en la Tabla 13 y en las figuras 28 y 29.

Hidrolizado enzimático		Cumárico		Ferúlico	
Resina	%(m/v) Resina/Disolución	Inicio (g/L)	Final (g/L)	Inicio (g/L)	Final (g/L)
VP	1%	0,665	0,107	0,581	0,071
	2%	0,665	0,011	0,581	0,011
	3%	0,665	0,007	0,581	0,004
MP	1%	0,665	0,006	0,581	0,024
	2%	0,665	0	0,581	0
	3%	0,665	0	0,581	0

Tabla 13. Concentraciones de ácido cumárico y ácido ferúlico al inicio y al final de la detoxificación con resinas fuertes

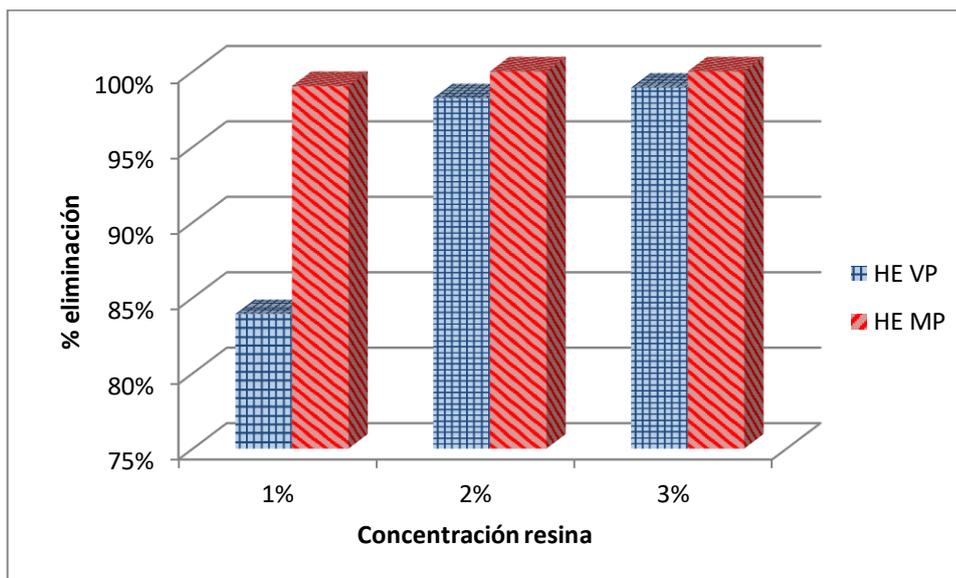


Figura 28. Porcentaje de eliminación de ácido cumárico en el hidrolizado enzimático

Como se observa en la Tabla 13 y Figura 28, las resinas en hidrolizado enzimático presentan un comportamiento similar al líquido pretratado, a medida que aumenta la cantidad de resina, aumenta el % de eliminación, llegando a alcanzar una eliminación con un 3% de resina, de 98,92% con VP y del 100% con MP.

Se puede observar que la resina VP es un poco más inestable, ya que con el 1% tiene un porcentaje sensiblemente más bajo que los demás, como se puede ver en la gráfica, de 83%, para aumentar con un 2% hasta 98,22% y con 3% hasta 98,92% como se ha señalado antes. Por otro lado, la resina MP muestra

mejores resultados y más estables, alcanzando con un 1% de resina una eliminación de 99,03% y con el 2 y 3%, eliminación del 100%.

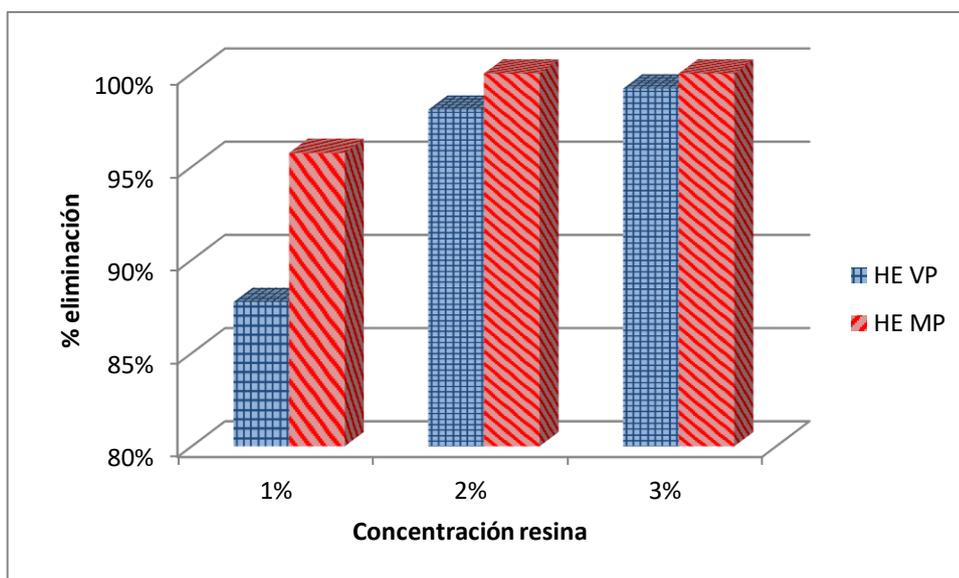


Figura 29. Porcentaje de eliminación de ácido ferúlico en el hidrolizado enzimático

Con los resultados que se pueden ver en la tabla 13 y figura 29 se comprueba que la eliminación de ferúlico es similar a la de cumárico, vuelve a ocurrir, que a mayor cantidad de resina, mayor eliminación. Cuando se tiene un 1% de resina VP, la eliminación vuelve a ser notablemente más baja, teniendo un 87,74%, mientras que la resina MP alcanza el 95,74%. Con concentraciones de 2% y 3%, VP mejora sus resultados alcanzando 98,05% y 99,19%, mientras que MP consigue un 100% con las dos concentraciones.

A destacar en cuanto a los datos de pérdidas de azúcares dados en la Tabla 12, como ha venido ocurriendo en los anteriores apartados, el consumo de azúcares aumenta con la cantidad de resina empleada, llegando a alcanzar un máximo de consumo de 4,89% de glucosa y de 5,04% de xilosa con la resina VP, y de 4,08% para glucosa y 2,40% para xilosa con la resina MP, obteniéndose todos estos resultados con una concentración del 3%(m/v) salvo para la xilosa con la resina MP, que se alcanza con un 1%.

Por otra parte, se observa que con un 1% de resina VP, el consumo es prácticamente nulo, siendo de un 0,05%, mientras que con la resina MP se alcanzan valores algo más altos, 2,09% para glucosa y 2,40% para xilosa. A medida que se aumenta el %(m/v) de resina, aumentan todas las pérdidas, acabando como se ha visto anteriormente, perdiendo más azúcares con la resina VP que la MP.

A la vista de estos resultados, teniendo en cuenta eliminación de inhibidores y consumo de azúcares, la resina más adecuada para el hidrolizado enzimático

será de nuevo la resina MP, debido a que en porcentajes bajos de concentración de resina, a pesar de que la resina VP presente consumos prácticamente nulos (0,05%), también es significativo que elimina menos inhibidores, y si además se trabaja con las concentraciones más altas, MP elimina más y consume menos: Con 3%, MP elimina el 100% de cumárico y ferúlico, mientras que VP elimina 98,92% y 99,19% respectivamente; MP consume 4,08% de glucosa y 2,40% de xilosa mientras que VP consume 4,89% de glucosa y 5,04% de xilosa. Por lo tanto, podríamos decir que para todos los tramos de concentraciones, la resina MP presenta un mejor comportamiento.

4.1.2 Resinas débiles

En este apartado se comprobará cuáles son los resultados de eliminación de inhibidores y consumo de azúcares mediante la detoxificación con resinas débiles.

4.1.2.1 Líquido pretratado

Los resultados más significativos obtenidos de la experimentación con resinas débiles y líquido pretratado se muestran en las siguientes Tablas y Figuras. En la tabla 14 se muestran las concentraciones de ácidos cumárico y ferúlico al inicio y al final de la detoxificación, para cada una de las resinas y relaciones resina/disolución ensayadas, mientras que las Figuras 30 y 31 muestran los porcentajes de eliminación obtenidos para los diferentes ensayos.

Líquido pretratado		Cumárico		Ferúlico	
Resina	(%)(m/v) Resina/disolución n	Inicio (g/L)	Final (g/L)	Inicio (g/L)	Final (g/L)
S45	1%	1,982	0,002	1,555	0,005
	2%	1,982	0,039	1,555	0,053
	3%	1,982	0	1,555	0,00036
A365	1%	1,982	0,0008	1,555	0,0017
	2%	1,982	0,0002	1,555	0,0003
	3%	1,982	0	1,555	0

Tabla 14. Concentraciones de ácido cumárico y de ácido ferúlico al inicio y al final de la detoxificación con resinas débiles.

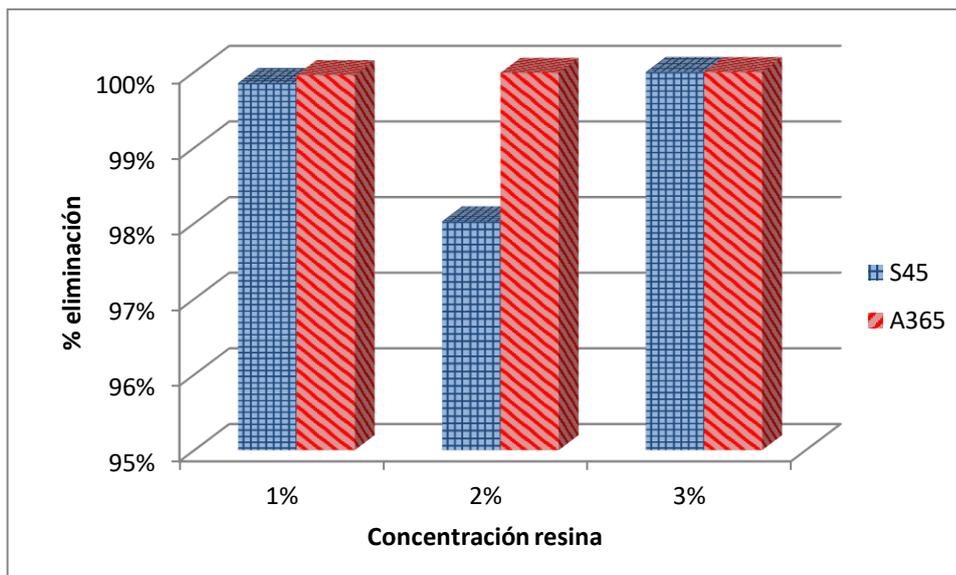


Figura 30. Porcentaje de eliminación de ácido cumárico en el líquido pretratado

Al observar la figura 30, se puede ver que, con estas resinas débiles, cuanto más aumente la concentración de la resina, aumenta la eliminación, aunque ya de por sí se mantiene más o menos constante, llegando hasta el 100% de eliminación para ambas resinas con un porcentaje de 3%(m/v) para las dos.

Viendo los datos de la Tabla 14 de “final” de cada uno de los elementos inhibidores, se puede comprobar que estas resinas a porcentajes ya bajos, son muy efectivas y presentan valores más o menos constantes: Con un 1% de resina, la S45 presenta una eliminación del 99,85% y la A365 del 99,95%, con un 2%, S45 elimina un 98,02%, presentando un pequeño bajón en su efectividad, mientras que la A365 un 99,98%, y finalmente para el 3% como se ha visto anteriormente, ambas eliminan el 100% del ácido cumárico presente.

En cuanto al ácido ferúlico (Figura 31), se observa un comportamiento análogo al ácido cumárico con la concentración de resinas, ya que éste es eliminado en mayor medida cuanto más concentración de resinas haya y porque se muestran muy efectivas, y por tanto constantes, desde bajas concentraciones, alcanzando un máximo de 99,97% de eliminación con la resina S45 y un 100% para la A365, ambas con un porcentaje de 3%(m/v).

Analizando la figura 31, se observa que desde la concentración más baja de resina ya hay porcentajes cercanos al 100%, con la excepción de que para la resina S45, con un 2% tiene una peor eficiencia, similar a lo ocurrido con el ácido cumárico, obteniendo un valor de 96,58%. Los demás valores obtenidos en eliminación han sido 99,67% con S45 y 99,88% para un 1% de resina, 96,58% para S45 y 99,97% para A365 para un 2% y para 3% de resina, 99,97% con S45 y 100% con A365.

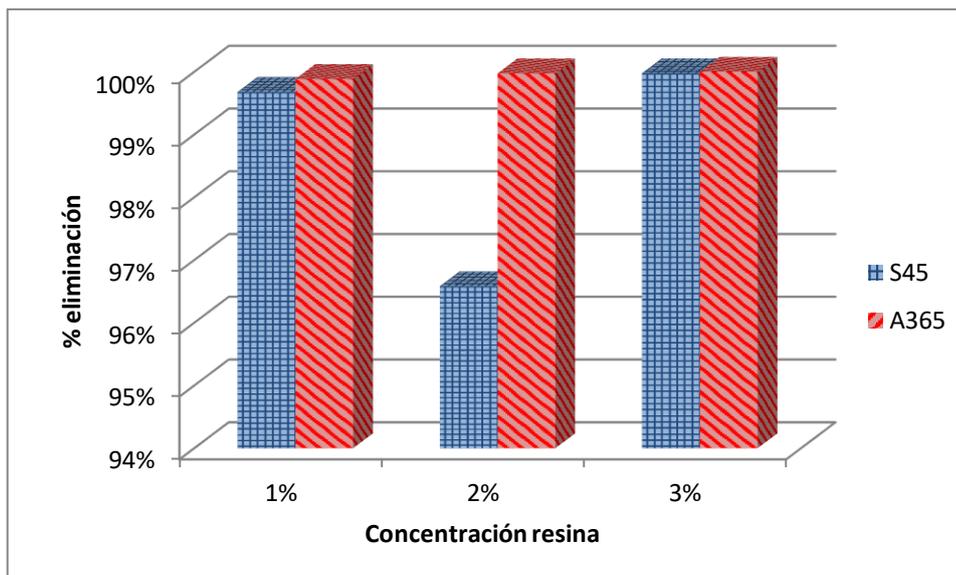


Figura 31. Porcentaje de eliminación de ácido ferúlico en el líquido pretratado

Por los datos que aparecen en la Tabla 15 se puede ver que la resina S45 a medida que aumenta su concentración, la pérdida de azúcares aumenta de una manera notable, llegando a alcanzarse pérdidas de azúcares casi el doble al 3% que con 1% (10,93% a 18,23% respectivamente en xilosa). Por otro lado, la resina A365 no presenta variaciones tan grandes al aumentar su concentración, como por ejemplo en la xilosa, (17,67% de pérdida al 1% de resina, y del 23,57% con un 3%). En términos generales, la resina A365 presenta mayores pérdidas de azúcar que la resina S45, como se puede comprobar en los valores máximos (3%(m/v)): 19,04% con S45 y 16,91% con A365 para glucosa, 18,23% con S45 y 23,57% con A365 para xilosa, 18,44% con S45 y 21,55% con A365 para la arabinosa.

Estos resultados hacen que deba llegarse a un compromiso ya que, aunque los porcentajes de eliminación de inhibidores son muy elevados, también lo son las pérdidas de azúcar, lo que implica una menor concentración de éstos disponible para la etapa de fermentación y, por tanto, un menor rendimiento de la misma.



Líquido pretratado		Glucosa			Xilosa			Arabinosa		
Resina	% m/v	Inicio	Final	% pérdida	Inicio	Final	% pérdida	Inicio	Final	% consumo
S45	1%	15,75	13,86	12,04%	31,53	28,08	10,94%	15,84	14,11	10,95%
	2%	15,75	13,48	14,44%	31,53	27,20	13,74%	15,84	13,66	13,78%
	3%	15,75	12,75	19,05%	31,53	25,78	18,23%	15,84	12,92	18,44%
A365	1%	15,75	13,21	16,12%	31,53	25,96	17,68%	15,84	12,93	18,36%
	2%	15,75	13,14	16,56%	31,53	25,05	20,55%	15,84	12,78	19,34%
	3%	15,75	13,09	16,91%	31,53	24,09	23,58%	15,84	12,43	21,56%

Tabla 15. Pérdida de azúcares fermentables en el líquido pretratado para detoxificación con resinas débiles.

Hidrolizado enzimático		Glucosa			Xilosa			Arabinosa		
Resina	% m/v	Inicio	Final	% pérdida	Inicio	Final	% pérdida	Inicio	Final	% consumo
S45	1%	46,71	45,90	1,75%	18,01	17,59	2,36%	No presenta arabinosa		
	2%	46,71	46,07	1,38%	18,01	17,63	2,10%			
	3%	46,71	46,12	1,26%	18,01	17,82	1,05%			
A365	1%	46,71	46,04	1,44%	18,01	17,19	4,55%			
	2%	46,71	46,00	1,53%	18,01	16,90	6,17%			
	3%	46,71	45,64	2,29%	18,01	16,35	9,20%			

Tabla 16. Pérdida de azúcares fermentables en el hidrolizado enzimático para detoxificación con resinas débiles.

4.1.2.2 Hidrolizado enzimático

Los resultados con medio modelo simulando las concentraciones de hidrolizado enzimático se muestran en la Tabla 17, en la que se indican las concentraciones de ácido cumárico y ácido ferúlico al inicio y al final de la detoxificación, para cada una de las condiciones ensayadas. Las Figuras 32 y 33 muestran los porcentajes de eliminación de ácido cumárico y ferúlico respectivamente.

Hidrolizado enzimático		Cumárico		Ferúlico	
Resina	%(m/v) Resina/disolución	Inicio (g/L)	Final (g/L)	Inicio (g/L)	Final (g/L)
S45	1%	0,67	0,00	0,58	0,00
	2%	0,67	0,00	0,58	0,00
	3%	0,67	3,49E-05	0,58	1,13E-04
A365	1%	0,67	0,00	0,58	0,00
	2%	0,67	0,00	0,58	0,00
	3%	0,67	2,29E-04	0,58	3,24E-04

Tabla 17. Concentraciones de ácido cumárico y ácido ferúlico al inicio y al final de la detoxificación con resinas débiles.

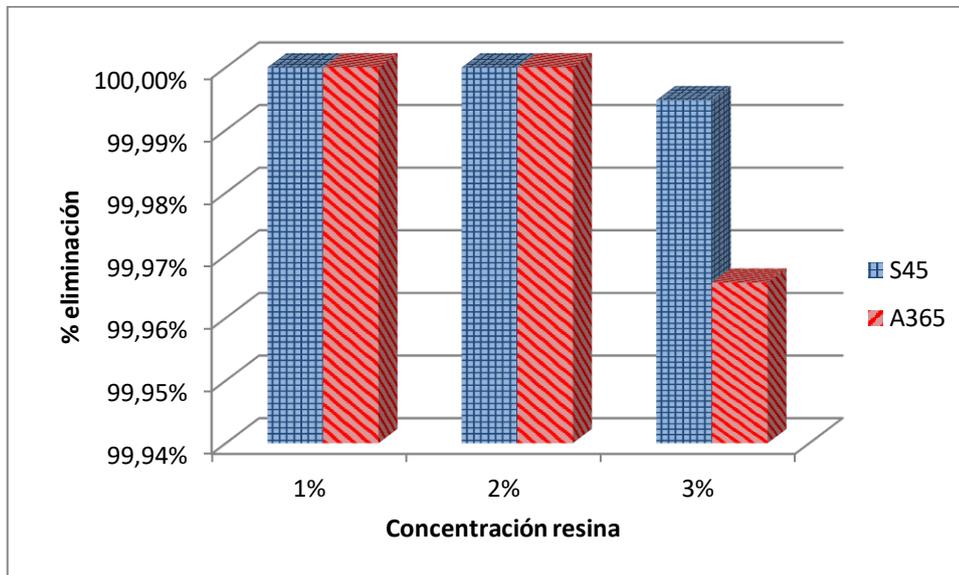


Figura 32. Porcentaje de eliminación de ácido cumárico en el hidrolizado enzimático

El comportamiento que se puede observar de eliminación de ácido cumárico en el hidrolizado enzimático con resinas débiles es análogo al encontrado en el mismo proceso con resinas fuertes, porque como se tiene una menor cantidad de compuesto inhibidor tras realizar la hidrólisis, parece que es más fácil la eliminación total de éstos, haciendo que en este caso, ya con bajas

concentraciones, alcancen altos niveles de eliminación, concretamente para ambas resinas, con concentraciones de 1% y 2%, eliminan un 100% de ácido cumárico

También se puede comprobar observando la Figura 32, de una manera un poco exagerada, para darnos cuenta, que tanto con la resina A365 como S45, con un 3% de concentración, aparece una pequeña cantidad de inhibidor, que hace que la eliminación no sea completa (99,99% para A365 y 99,96% para A365), pero es un valor tan bajo para ambas resinas, que se puede decir que para esta concentración lo elimina completamente también.

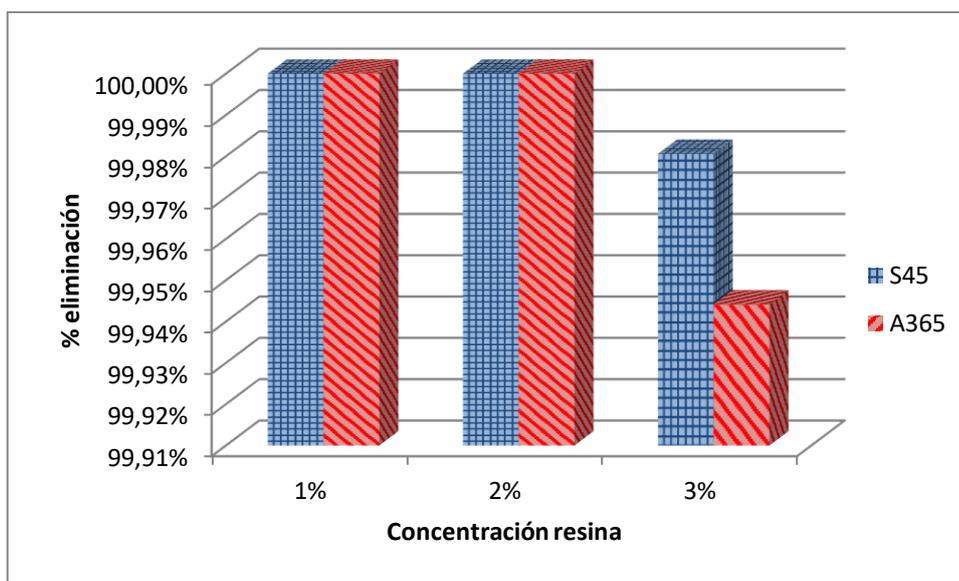


Figura 33. Porcentaje de eliminación de ácido ferúlico en el hidrolizado enzimático.

La eliminación del ácido ferúlico ocurre de una forma análoga al ácido cumárico, porque como se puede observar en la Figura 33, con los primeros porcentajes de concentración de resina, ya se alcanza una eliminación total del inhibidor, más concretamente, para A365 y S45, se elimina el 100% con un 1% y 2% (%(m/v)).

Con una concentración del 3% de resina también ocurre lo mismo, el porcentaje de eliminación baja un poco, obteniéndose 99,98% para S45 y 99,94% para A365. Como se puede ver, son valores algo más bajos que los obtenidos con el ácido cumárico, pero aun así se puede seguir diciendo que la eliminación es completa.

Con los datos de la Tabla 16 se puede observar de nuevo un comportamiento similar a lo ocurrido con resinas fuertes, ya que aquí el porcentaje de consumo es mucho menor al obtenido en el líquido pretratado. En este caso, la resina S45 consume una menor cantidad de azúcares tanto para glucosa como xilosa, siendo los datos de consumo para glucosa: Para 1% de concentración, S45



consume un 1,75% y A365 un 1,43%; para 2%, S45 consume 1,38% y A365 1,53%, y para 3%, S45 1,26% y A365 2,29%. Para glucosa se obtienen estos datos: Consumo de 2,35% para S45 y de 4,55% para A365 con un 1% de concentración, para un 2%, S45 tiene un 2,1% mientras que A365 6,17%, y finalmente con un 3%, S45 1,04% y A365 9,19%.

Con estos datos, además de ver que los porcentajes de consumo son menores que para el líquido pretratado, también se observa que a medida que aumenta la concentración de la resina S45, en vez de aumentar el consumo, disminuye. Es cierto que las diferencias entre consumos de azúcares no son notablemente diferentes, por lo que puede ser que esto sea debido a pequeños errores de tipo experimental.

4.1.3 Resumen de resultados con medio modelo

Teniendo en cuenta todo lo observado para los dos tipos de resina, se pretende encontrar analizando estos datos cuál es la mejor resina para la realización de los ensayos en medio real y así realizarlo únicamente con uno y no hacer varios ensayos más que gracias a este trabajo con medios modelo sabemos que van a tener un peor rendimiento.

Las resinas débiles son muy buenas en cuanto a la eliminación de inhibidores con cualquier concentración de éstas, pero su consumo de azúcares es muy elevado, sobre todo en el líquido pretratado. Si este consumo se compara con el que se produce en las resinas fuertes, por ejemplo, en glucosa: Máximo de 19,05% en débiles (Tabla 15) contra un máximo de 9,25% (Tabla 11), se puede ver con mayor claridad aún que las débiles tienen un consumo demasiado elevado para acometer la función de eliminar los inhibidores.

En cuanto a las fuertes, la resina MP puede llegar a un 100% de eliminación de inhibidores, con en torno a un 2% o 3% de concentración, teniendo además un consumo de azúcar menor que las fuertes y que la otra resina fuerte, VP. Con un 1% de concentración, no se elimina el 100% de los inhibidores, pero se consume menos azúcar que con los otros porcentajes.

Tras estudiar todas estas comparaciones, la resina que más se acerca a lo que se busca es la resina fuerte MP, en sus concentraciones 1% y 2%. Ésta será la que se utilice en los ensayos en medio real, los cuales se explican y detallan a continuación.

4.2 Ensayos en medio real

En este apartado se analizarán los resultados obtenidos en un medio real. Para ello, se ha trabajado con bagazo de cerveza al que se le ha sometido un pretratamiento térmico con ácido diluido y posterior hidrólisis enzimática, para

obtener las dos corrientes de líquido pretratado e hidrolizado enzimático estudiados en el apartado anterior.

Por otra parte, debe destacarse que, en estos medios reales, se encuentran otros compuestos inhibidores, además de los ácidos ferúlico y cumárico incluidos en los medios modelo. La composición obtenida del análisis de ambas corrientes se recoge en la Tabla 18.

Medio	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Ac. Acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	Fenólicos (g/L)
HE	33,08±0,12	15,00±0,10					1,32±0,06
LP	4,06±0,07	8,42± 0,09	9,50±0,04	0,34±0	0,0357±0	0,041±0,0002	1,70±0,1

Tabla 18. Composición de los medios reales utilizados.

Es por este motivo, que se ha llevado a cabo el análisis de los compuestos fenólicos totales y, también de 4-hidroxibenzoico, vanílico, vainillina, siríngico y siringaldehído, además de azúcares potencialmente fermentables y otros compuestos que pueden afectar a la fermentación como son ácido acético, furfural o HMF.

4.2.1 Rendimientos de detoxificación

Una vez hecho el ensayo en medio modelo y por lo tanto, elegido la resina con la que se va a trabajar, se realiza de nuevo la detoxificación en el líquido pretratado e hidrolizado enzimático.

4.2.1.1 Líquido pretratado

En la tabla 19 se muestran las concentraciones de los compuestos fenólicos analizados al inicio y al final de la detoxificación, para las distintas condiciones de detoxificación ensayadas.



	4-hidroxibenzoico (mg/L)	Vanílico (mg/L)	Vainillina (mg/L)	Siríngico (mg/L)	Siringaldehido (mg/L)	Cumárico (mg/L)	Ferúlico (mg/L)	FENOLES HPLC TOTALES (mg/L)
LP	0,42±0,01	0,34±0,02	2,03±0,12	0,43±0,02	62,22±4,25	3,50±0,10	412,71±29,23	481,65±33,75
LP MP1%	0,30±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	42,86±3,35	1,12±0,07	335,75±18,58	380,36±22,01
LP MP2%	0,13±0,005	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	28,74±1,50	0,00±0,00	277,79±8,68	299,84±10,18

Tabla 19. Concentraciones de compuestos inhibidores en el líquido pretratado antes y después de detoxificar

	4-hidroxibenzoico (mg/L)	Vanílico (mg/L)	Vainillina (mg/L)	Siríngico (mg/L)	Siringaldehido (mg/L)	Cumárico (mg/L)	Ferúlico (mg/L)	FENOLES HPLC TOTALES (mg/L)
HE	0,00±0,00	14,71±0,53	2,11±0,10	1,32±0,01	41,19±2,23	160,13±11,00	95,61±4,12	315,07±18,08
HE MP1%	0,00±0,00	14,31±,50	0,00±0,00	0,00±0,00	36,81±1,34	136,20±9,24	58,43±2,13	245,76±13,22
HE MP2%	0,00±0,00	10,38±0,64	0,00±0,00	0,00±0,00	34,96±0,06	127,75±9,26	43,94±1,75	224,17±11,70

Tabla 20. Concentraciones de compuestos inhibidores en el hidrolizado enzimático antes y después de detoxificar

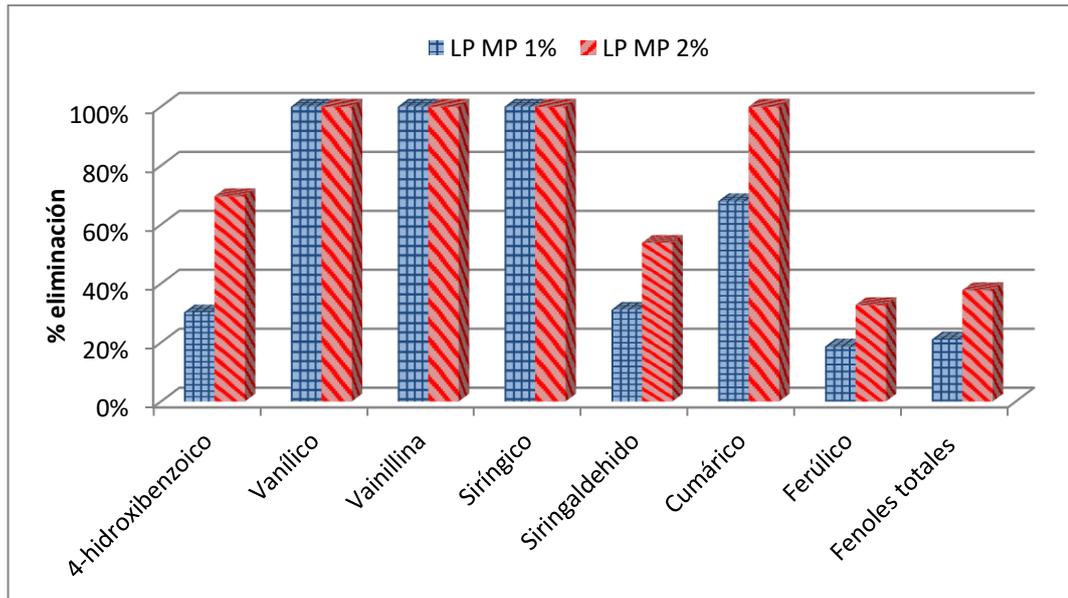


Figura 34. Porcentaje de eliminación de inhibidores en medio real para líquido pretratado

Viendo la Figura 34, se puede observar cómo se ha comentado antes, que presenta una mayor cantidad de inhibidores, y que, en todos ellos, al aumentar la concentración de resina a un 2%, la eliminación de los compuestos inhibidores es bastante mayor, llegando a una eliminación total del compuesto en Vanílico, vainillina, siríngico y cumárico, es decir, un 100%. A destacar también que en vanílico, vainillina y siríngico, con un 1% de concentración también alcanzan un 100% de eliminación.

En cuanto a los demás compuestos, el 4-hidroxibenzoico, alcanza un 30,20% de eliminación con 1% de concentración de resina, y un 69,62% con 2%; siringaldehído es eliminado en un 31,11% con 1% de resina y en un 53,81% para 2%; con cumárico como se ha dicho, es eliminado totalmente con 2% de resina pero con 1% solo un 67,94%; el ácido ferúlico se elimina en un 18,64% con 1% resina y en un 32,68% para 2%.

Medio y % resina	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Ac Acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	Fenólicos (g/L)
LP	4,06±0,07	8,42±0,09	9,50±0,04	0,34±0	0,036±0	0,041±0,0002	1,70±0,1
LP MP 1%	4,01±0,08	8,33±0,13	9,28±0,05	0,34±0	0,0346±0	0,038±0,0001	1,57±0,03
LP MP 2%	3,93±0,03	8,21±0,04	9,35±0,15	0,34±0	0,034±0	0,038±0,0004	1,54±0,02

Tabla 21. Concentraciones de azúcares e inhibidores en líquido pretratado antes y después de detoxificar



En este ensayo con líquido pretratado, se observa que la pérdida de los azúcares (Tabla 21) es bajo, llegando a 3,21% de glucosa, 2,49% de xilosa y 1,54% de arabinosa, todos estos porcentajes de eliminación con una concentración del 2% de resina. Salvo en la arabinosa, en todos al aumentar la concentración de resina.

En comparación con el ensayo hecho anteriormente en medio modelo, las pérdidas de azúcar son menores, mientras que en el ensayo con medio real se obtiene una pérdida de glucosa del 1,36% y 3,21% para las relaciones resina/disolución del 1% y 2% (m/v), en el ensayo con medio modelo, éstas fueron del 7,29% y 8,45% respectivamente. Para la xilosa, en el medio real, las pérdidas fueron del 1,08% (1% m/v) y 2,49% (2% m/v), mientras que en el medio modelo éstas fueron del 6,66% y 7,82% respectivamente. Finalmente, en relación con las pérdidas de arabinosa observadas en el medio real, éstas fueron del 2,30% y 1,54%, frente a 6,65% y 7,52% en el medio modelo para el 1% y 2% (m/v) respectivamente. En cuanto a los demás componentes, presentan un porcentaje de eliminación muy bajo, pero en este caso no se puede comparar con lo ocurrido en el medio modelo, ya que no se consideraron en la formulación de dicho medio modelo por no presentar influencia negativa en el proceso de fermentación. En concreto, la concentración del ácido acético se mantiene, para HMF se observaron eliminaciones del 3,08% al 1% de concentración de resina y del 3,36% al 2%; para furfural al 1% obtiene una eliminación del 6,83% y al 2% del 7,31%, y finalmente, los compuestos fenólicos alcanzan porcentajes de eliminación del 7,64% al 1% y del 9,41% al 2%.

4.2.1.2 Hidrolizado enzimático

Aquí se estudiará el rendimiento de la detoxificación para el hidrolizado enzimático. Los resultados más significativos se muestran en la Tabla 20 (compuestos fenólicos) y Tabla 22 (azúcares) y en la figura 35.

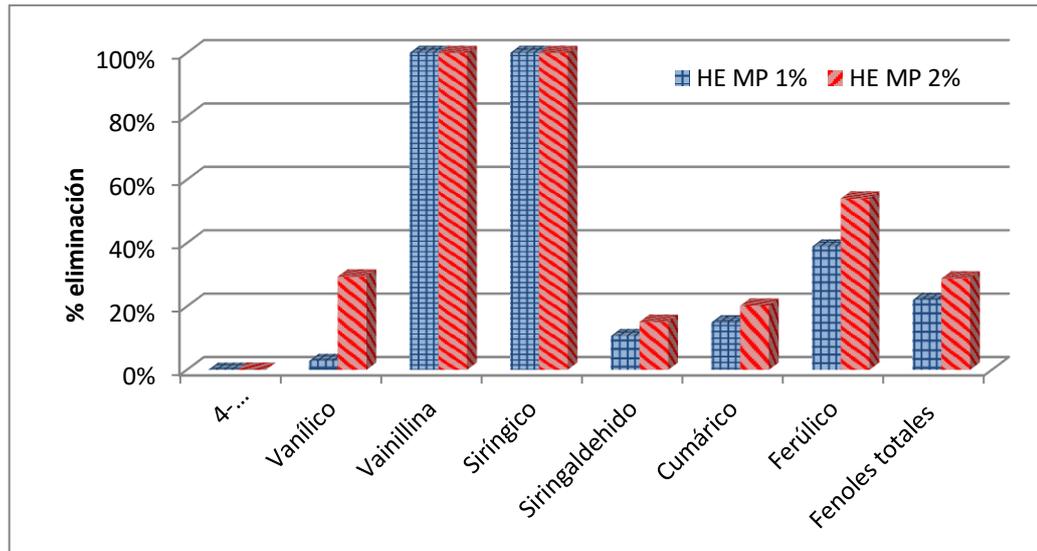


Figura 35. Porcentaje de eliminación de inhibidores en medio real para hidrolizado enzimático

El porcentaje de eliminación de hidroxibenzoico es del 0% porque como se ve en la tabla 20, no hay nada de ese compuesto en el hidrolizado sin detoxificar. Para el resto de los componentes, al aumentar como en todos los demás casos la concentración de la resina, aumenta el % de eliminación, pero se puede ver que, en este caso, al trabajar con el hidrolizado, los resultados son bastante peores, solo la vainillina y el siringico se eliminan totalmente, mientras que los demás no llegan al 60%. Se esperaba un mejor rendimiento, los resultados no se ajustan a lo esperado. Estos menores porcentajes de eliminación obtenidos pueden haberse debido a la compleja matriz que presentan las soluciones reales en comparación con la composición que presentaban los medios modelo, con menos inhibidores.

	Glucosa		Xilosa		Fenólicos	
	media	sd	media	sd	media	sd
HE	33,08	0,12	15,00	0,10	1,32	0,06
HE MP 1%	29,57	0,10	13,30	0,09	1,25	0,05
HE MP 2%	30,05	0,09	13,45	0,08	1,19	0,07

Tabla 22. Concentración de azúcares e inhibidores en hidrolizado enzimático antes y después de detoxificar

Al aumentar el porcentaje de resina utilizada en la detoxificación, disminuyen las pérdidas de azúcares (10,61% para 1% y 9,18% para 2% en glucosa, 12,61% y 10,32% para xilosa), esto puede ser debido a la matriz que presentan estos medios reales, que incluyen muchos componentes que anteriormente no se habían analizado. Por el contrario, la eliminación de compuestos fenólicos aumenta al aumentar el porcentaje de resina utilizada.

4.2.3 Resumen de resultados con medios reales

Habiendo estudiado estos resultados de los medios reales, se puede llegar a la conclusión, de que la detoxificación al llevarla al medio real ha sido peor que en el medio modelo, se han obtenido resultados peores de lo esperado. Esto que ha ocurrido se puede deber a que al trabajar con el medio modelo, solo se tenían en cuenta como inhibidores al cumárico y al ferúlico, mientras que en el medio real hay más compuestos de carácter aniónico, haciendo que la resina se sature antes, que estos compuestos se queden retenidos y no se alcance la misma efectividad que conseguía con el medio modelo. Otra razón a tener en cuenta es que estas resinas no son específicas para la eliminación de fenólicos, por lo que al haber aquí más compuestos que dificulten un poco más el proceso, se obtiene un menor rendimiento.

En relación con la pérdida de azúcares observada, el comportamiento ha sido diferente para el líquido de pretratamiento y para el hidrolizado enzimático. Mientras que para el líquido de pretratamiento las pérdidas han sido menores en el medio real que en el medio modelo, probablemente debido a una saturación de las resinas por la elevada concentración de diferentes componentes que se encuentran presentes en la matriz, para los hidrolizados enzimáticos se ha observado una mayor pérdida de azúcares en el medio real. Esta diferencia observada en hidrolizado enzimático puede ser debida a varios factores, como, por ejemplo, al igual que se comentó anteriormente, la compleja matriz, que puede hacer que la resina presente una mayor afinidad a la adsorción de azúcares que en los medios modelo, es decir, la cinética y el equilibrio de adsorción pueden verse modificados por el hecho de tener esta matriz diferente.

4.2.4 Rendimientos de fermentación

Tras haber realizado la etapa de detoxificación con las resinas elegidas en los medios reales, se hace a continuación la etapa de fermentación. Dentro de este apartado, se podrá ver cuál es el rendimiento obtenido de cada uno de los medios, sin detoxificar y detoxificados, en la producción ABE, pudiendo ver y comparar mediante estos datos qué influencia ha tenido en el resultado final el haber realizado a estas corrientes la detoxificación.

En la Tabla 23 se muestran los datos de azúcares al inicio y al finalizar la fermentación.

	Glucosa inicial (g/L)	Xilosa inicial (g/L)	Arabinosa inicial (g/L)	Glucosa final (g/L)	Xilosa final (g/L)	Arabinosa final (g/L)
LP	3,24±0,03	7,99±0,05	7,71±0,16	0,00±0,00	6,08±0,16	6,73±0,11
LP MP1% 0,498	3,14±0,00	7,96±0,02	7,62±0,03	0,00±0,00	3,29±0,85	3,00±1,15
LP MP2% 1,002	3,16±0,03	7,97±0,19	7,62±0,16	0,00±0,00	2,55±0,16	1,38±0,10
HE	28,22±1,18	12,17±0,27	0,00±0,00	25,07±0,47	10,94±0,15	0,00±0,00
HE MP1% 0,496	25,75±0,05	11,68±0,04	0,00±0,00	21,41±1,12	8,45±0,67	0,00±0,00
HE MP2% 1,000	25,84±0,21	11,70±0,07	0,00±0,00	22,03±0,28	9,07±0,10	0,00±0,00

Tabla 23. Composición inicial y final de los medios reales sin detoxificar y tras detoxificación

Como se puede observar, para el líquido pretratado, la glucosa es consumida en su totalidad para los tres casos, por lo que aquí no hay diferencia de una a otra, pero observando los datos de la xilosa y arabinosa se ve que hay una gran diferencia. La xilosa es consumida en un 23,90% en el medio sin detoxificar, pero cuando introducimos las resinas, el consumo aumenta notablemente, siendo con un 1% de concentración, 58,66%, y para 2%, 68%. De forma análoga se comporta la arabinosa, consumiendo en la fermentación el medio sin detoxificar un 12,71%, mientras que para un 1% consume un 60,62% y para 2%, un 81,89%.

Sobre el hidrolizado enzimático, se ve que el comportamiento es parecido en cuanto a que si se compara el consumo de los azúcares, los medios al haber sido detoxificados consumen más, pero con la peculiaridad en este caso de que los consumos son mucho menores que con el líquido pretratado, como se muestra a continuación: de glucosa, el medio sin detoxificar consume un 11,16%, teniendo un 1% de resina consume un 16,85% y con un 2% un 14,74%; en cuanto a la xilosa, sin detoxificar consume un 10,10%, y al introducir las resinas, con un 1% consume 27,65% y con un 2% de concentración, 22,45%.

Al ver estos datos, se observa que en el hidrolizado sí que aumenta su consumo con la detoxificación, pero que cuando la concentración es del 2%, el consumo es menor, esto puede ser debido a que haya habido pequeños errores experimentales a la hora de llevar a cabo el proceso, o puede ser, como se ha comentado anteriormente, por la compleja matriz que presenta el medio real, haciendo que la cinética del proceso cambie.

La concentración de solventes obtenida (acetona, butanol, etanol) así como el total, se muestran en la Tabla 24 y en la Figura 36.

	Butanol (g/L)	Etanol (g/L)	Acetona (g/L)	ABE (g/L)
LP	1,35±0,14	0,35±0,02	0,00±0,00	1,70±0,16
LP MP1% 0,498g	3,18±0,68	0,32±0,04	0,93±0,11	4,42±0,83
LP MP2% 1,002g	4,53±0,09	0,22±0,05	1,11±0,04	5,87±0,18
HE	0,31±0,05	0,04±0,00	0,00±0,00	0,35±0,05
HE MP1% 0,496g	1,55±0,32	0,21±0,02	0,46±0,08	2,13±0,42
HE MP2% 1,000g	1,00±0,05	0,21±0,00	0,00±0,00	1,12±0,05

Tabla 24. Concentración de solventes tras realizar la fermentación.

Se puede comprobar viendo la Figura 36 que la cantidad de alcoholes producido por litro aumenta si el caldo de fermentación ha sido previamente detoxificado, pero no aumenta de una manera uniforme, sino que hay ocasiones en las que con el 2% disminuye la concentración de solventes. Esto para el líquido pretratado sólo ocurre con el etanol, ya que pasa de producir al 1% de concentración 0,32g/L a 0,22g/L con un 2%. En el hidrolizado enzimático ocurre para todos los alcoholes, pasando en el butanol de 1,55g/L a 1,00g/L, en el etanol se produce lo mismo para los dos porcentajes, en la acetona pasa de 0,46g/L a 0, y en ABE pasa de 2,13g/L a 1,12g/L.

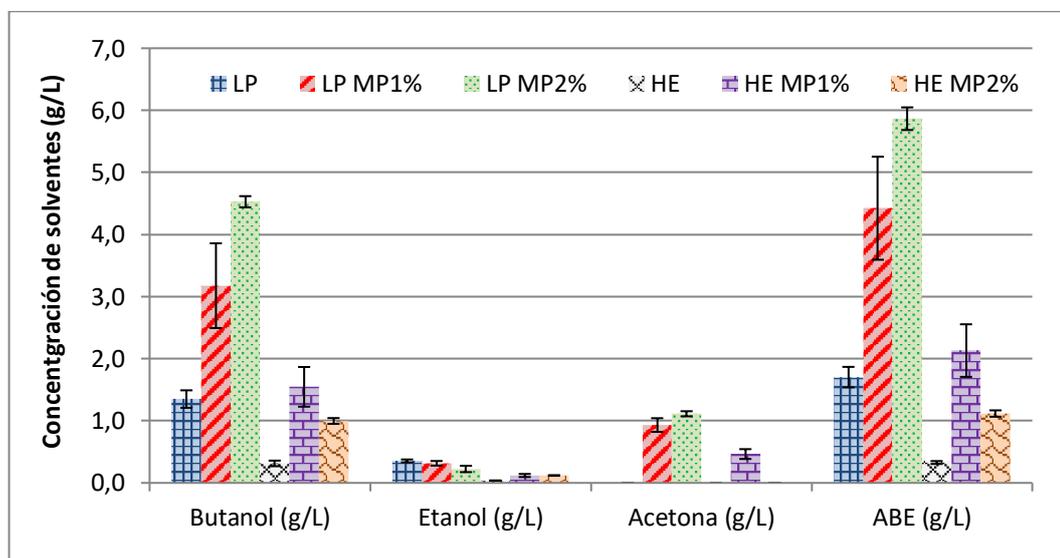


Figura 36. Concentración de solventes tras realizar la fermentación (ABE representa la concentración total de solventes: acetona+butanol+etanol)

Hay un caso en particular a destacar, que es el etanol con el líquido pretratado, ya que es el único de los experimentos realizados en el que el medio sin detoxificar produce más que tras realizar la detoxificación, produciendo 0,35g/L y después 0,32 y 0,22g/L.

Para poder ver de una manera más intuitiva a parte de la gráfica, el aumento del rendimiento en la producción de solventes, estableciendo los datos obtenidos en el medio sin detoxificar como los iniciales, se calcula en qué porcentaje aumenta tras detoxificar. Como ejemplos, se han elegido el butanol y ABE para el líquido pretratado. Para un 1% en el caso de butanol, aumenta la concentración en un 135% y para un 2%, en un 235%. Con ABE, teniendo un 1% de resina, aumenta la concentración en un 160%, y para 2%, un 245%.

Muestra	Consumo azúcares (%)	Y butanol(g/g)	Y ABE(g/g)	Prod but(g/L·h)	Prod ABE(g/L·h)
LP	32,37	0,220	0,278	0,014	0,018
LP MP1% 0,498	66,37	0,256	0,356	0,033	0,046
LP MP2% 1,002	79,04	0,306	0,396	0,047	0,061
HE	10,84	0,072	0,080	0,003	0,004
HE MP1% 0,496	20,21	0,205	0,282	0,016	0,022
HE MP2% 1,000	17,12	0,155	0,174	0,010	0,012

Tabla 25. Datos de consumo de azúcares, rendimientos ($Y_{butanol}$, Y_{ABE}) y productividad de butanol y ABE

Muestra	Consumo monosacáridos	Y butanol	Y ABE	Prod but	Prod ABE
LP MP1% 0,498	105,05%	16,15%	28,19%	135,30%	159,70%
LP MP2% 1,002	144,18%	38,82%	42,51%	235,44%	244,36%
HE MP1% 0,496	86,41%	185,49%	250,89%	393,17%	506,13%
HE MP2% 1,000	57,93%	116,61%	116,44%	217,91%	217,67%

Tabla 26. Porcentaje de aumento o disminución del consumo de monosacáridos, rendimientos y producción de butanol y ABE de los medios tras realizar la detoxificación respecto del medio sin detoxificar

Analizando la Tabla 25, se observa que para el líquido pretratado, la detoxificación sí que tiene un efecto positivo en estos parámetros estudiados, ya que todos ellos aumentan a mayor cantidad de resina utilizada para la operación, mientras que para el hidrolizado enzimático, también aumentan estos parámetros respecto del medio sin detoxificar, pero cuando se utiliza un 2% de concentración de resina, los datos que nos da son peores que los del 1%, cosa que ya ha ocurrido en los anteriores apartados, pudiéndose deber a la compleja matriz que presenta el medio en condiciones reales.

A pesar de estos resultados positivos para ambos medios, los obtenidos para el líquido pretratado son mucho mejores que los del hidrolizado enzimático, ya desde el medio sin detoxificar, ya que el líquido por ejemplo tiene un consumo de monosacáridos mayor, 32,37% contra 10,84%, para el rendimiento de butanol y ABE, el líquido presenta unos valores de 0,220 y 0,278 respectivamente, mientras que el hidrolizado 0,072 y 0,080, por último en cuanto a las producciones de butanol y ABE, el líquido tiene 0,014 y 0,018 y el

hidrolizado presenta 0,003 y 0,004. También se puede comparar los valores máximos para ver de una manera aún más clara la diferencia. Para ello, se coge para el líquido pretratado MP2% y para el hidrolizado enzimático, MP1%, dando estos valores: Consumo monosacáridos, 79,04% el líquido, contra un 20,21% del hidrolizado; 0,306 contra 0,205 de rendimiento de butanol, 0,396 contra 0,282 en rendimiento de ABE; 0,047 frente a 0,016 en la producción de butanol, y por último, 0,061 frente a 0,022 en la producción ABE.

Ahora, viendo la Tabla 26, se puede ver en términos de porcentaje, cuánto ha hecho mejorar la detoxificación con distintas concentraciones de resina respecto del medio sin detoxificar. Se observa que el crecimiento que presenta el hidrolizado enzimático es mucho mayor, en concreto el obtenido con el MP1%, para todos los términos estudiados salvo para el consumo de monosacáridos, que éste aumenta un 86,41%, frente al 144,18% que aumenta como máximo en el líquido pretratado con MP2%. Para los demás valores, para poder verlos en comparación son: 185,49% de aumento en el rendimiento del butanol para el hidrolizado enzimático, mientras que para el líquido pretratado aumenta un 38,82%; el hidrolizado aumenta un 250,89% para el rendimiento del ABE, mientras que el líquido aumenta un 42,51%; la producción de butanol aumenta en hidrolizado un 393,17% por un 235,44% para el líquido, y para acabar, la producción de ABE aumenta un 506,13% en el hidrolizado frente a un 244,36% del líquido.

Como se ha comprobado, en términos absolutos, el hidrolizado experimenta un crecimiento mayor, la detoxificación tiene mayor efecto sobre este medio, pero el medio sin detoxificar parte de unos valores tan bajos, que a pesar de que el líquido pretratado mejore menos en porcentaje, éste último tiene unos resultados generales mejores en todos los aspectos, dando mayores rendimientos y producciones. Por estas razones, la mejor opción de todas las que hemos estudiado para este trabajo, es el líquido pretratado detoxificado con la resina fuerte MP en un 2% de concentración.

Para poder hacerse una idea sobre la magnitud de los resultados obtenidos en este experimento, se puede comparar con otros experimentos ya realizados. Para ello, se usarán los datos recogidos en las tablas 24 y 25.

Primero se conoce que los rendimientos típicos que se pueden obtener de una fermentación ABE van de un rango de 0,15 a 0,25 g butanol /g azúcar, con una productividad de 0,5 g/h/L [31], mientras que cuando se trabaja con un pH de 4.5, el rendimiento de butanol es de 0,25g/g-glucosa [3]. En comparación con los datos obtenidos en estos experimentos, el rendimiento es más o menos similar, incluso superior en algunos casos, mientras que la productividad es mucho menor que estos típicos.

Hay estudios similares realizados con los que poder comparar estos resultados, como por ejemplo P.E. Plaza et al. (2017) [9], donde se realiza pretratamiento con ácido sulfúrico a BSG a pH1, 121°C con diferentes cargas de sólido (5-15% w/w), hidrólisis enzimática y fermentación ABE por *Clostridium beijerinckii* DSM 6422. Con la fermentación del hidrolizado, se obtuvieron concentraciones de 6,0±0,5 g/L de butanol y 7,4±1,0 g/L de ABE, cifras muy superiores a las obtenidas en nuestro experimento, mientras que la fermentación del líquido pretratado resultó en 6,6±0,8 g/L de butanol y 8,6±1,3 g/L de ABE, de nuevo mayores que nuestro experimento, pero no en tanta medida como el hidrolizado. El rendimiento de butanol en hidrolizado es de 0,22±0,02 g/g y 0,28±0,03 g/g para ABE, con productividades de 0,06±0,006 g/(L·h) de butanol y 0,08±0,007 g/L·h de ABE, y para pretratamiento líquido, rendimiento de 0,17±0,01 g/g para butanol y 0,22±0,01 g/g para ABE, y productividad de 0,07±0,004 g/L·h de butanol y 0,09±0,004 g/L·h para ABE con CaO, cifras que demuestran que para el hidrolizado sus resultados son ampliamente mejores, y que para el líquido de pretratamiento, los rendimientos son mejores que los obtenidos por él mientras que la productividad es algo menor.

Plaza, en 2017, realizó otro estudio [54], haciendo pretratamiento térmico con ácido diluido a pH1 a BSG de nuevo, a 15% de carga de sólidos, hidrólisis enzimática y fermentación con *Clostridium beijerinckii* DSM 6422. Tratando con el hidrolizado, obtiene 0,16±0,01g/g de rendimiento de butanol no lavado, y 0,22±0,02 g/g lavado, y rendimiento de ABE de 0,19±0,03 g/g sin lavar, 0,28±0,03 g/g lavado. Productividad butanol 0,04±0,003 (g/L·h) (NW), 0,06±0,006 (g/L·h) (W), para el ABE 0,06±0,009 (g/L·h) (NW), 0,08±0,007 (g/L·h) (W). En comparación con lo obtenido en nuestro experimento, los rendimientos son similares, mientras que las productividades son del orden del doble que lo nuestro. Hay otros ejemplos, que utilizan materiales lignocelulósicos con el mismo fin, como Qureshi et al. (2008) [54], (0,35g/g y 0,1 g/L·h) de ABE, con cepa superproductora de butanol (*C. beijerinckii* BA101), empleando hidrolizados enzimáticos de fibra de maíz.

En cuanto al líquido de pretratamiento, se compararán las concentraciones resultantes, Plaza obtiene esto: alcanza con el ajuste de pH con Ca(OH)₂, 6,6±0,8 g/L de butanol y 8,6±1,3 g/L de ABE, siendo más elevadas que las de otros trabajos como Maiti et al. (2016) [54], que obtuvieron 1,8 g/L de butanol (rendimiento de 0,25g/g trabajando con hidrolizados líquidos residuales de cervecera y concentraciones de 4,68g/l de butano (rendimiento de 0,27g/g) procedente de líquidos residuales de industria de almidón, empleando *C. beijerinckii* NRRL B-466. Han et al. (2013) [54], fermentaron líquidos de pretratamiento provenientes de un pretratamiento ácido de biomasa procedente de Sauce, empleando *C. beijerinckii* NCIMB 8052 y obteniendo concentraciones de 4,5g/L de butano y 8,9 g/L de ABE después de



neutralización con hidróxido de calcio hasta pH entre 6 y 8. El butanol que se ha obtenido en este experimento es similar al de Han y superior a Maiti, pero inferior al experimento más similar, el realizado por Plaza, mientras que para ABE, todas las concentraciones aquí señaladas son superiores a la nuestra.

En conclusión, los datos obtenidos son similares o peores en comparación a experimentos similares, en especial los obtenidos para el hidrolizado enzimático, que puede llegar a ser incluso 10 veces inferior que otros, pudiéndose deber a la presencia de elementos inhibidores no eliminados correctamente en la detoxificación.

5. Análisis económico

Las estimaciones del costo de capital para plantas en las que tienen lugar procesos químicos, a menudo se basan en una estimación del coste de la compra de los principales elementos necesarios para llevar a cabo el proceso, mientras que los otros costes se calculan como factores del coste del equipo. La precisión de estas estimaciones depende de en qué etapa de diseño se encuentra la planta en ese momento y de la fiabilidad de los datos que se dispongan sobre los elementos a utilizar y su coste.

Aquí es donde aparece Lang, que en el año 1948 propuso que el coste capital fijo de una planta se dé en función del coste total del equipo. De esta manera se desarrolla el método factorial de Lang, el cual obtiene una estimación de los costes que tiene la inversión en el desarrollo del proyecto de una planta nueva, utilizando una extrapolación de los equipos más importantes que se vayan a utilizar, para, gracias a este método, poder obtener el coste de una fábrica o planta como un múltiplo del valor del equipo base. Este múltiplo fue denominado factor de Lang, cuyo valor varía en función del producto final de la planta, ya sea líquido, sólido o ambos.

Este método factorial de Lang es el que se va a utilizar para realizar este análisis, para así poder saber la viabilidad que tiene este proceso de poder llevarse a cabo. Como los productos finales obtenidos en esta planta son acetona, butanol y etanol, se analizarán los gastos de adquisición y explotación del equipo junto con el gasto para la producción de estos compuestos [55].

$$C_{TM} = F_{Lang} \sum_{i=1}^n C_{pi}$$

↑
Total Module Cost

←
Purchased Cost of Major Equipment
From Preliminary PFD
(Pumps, Compressors, vessels, etc.)

Figura 37. Cálculo del coste total con el factor de Lang

El primero paso será calcular el coste de los equipos, utilizando la expresión: $C_e = C \cdot S^N$, siendo:

- C: Coste unitario. Al utilizarse en este caso reactores, el valor de C= 15000\$
- S: Volumen del equipo necesario en m³.
- N: Es un valor constante, que en este análisis será 0,4.

Tras conocer estos términos, hay que tener en cuenta que para obtener el volumen de cada uno de los equipos (S), hay que desarrollar el balance de

materia de este proceso, mientras que para obtener el costo en euros, hay que tener en cuenta dos valores en concreto, cuyo valor varía y hay que saberlo para el momento en el que se realiza este método: El IPC 1,264 a mayo '20, y la corrección €/\$, que a junio de 2020 es 0,88€//\$

Etapa	Carga (kg/h/carga)	V (m ³)	factor seguridad	S	C	n	Ce equipo(€)
Pretratamiento	666,67	0,67	1,2	1,00	15000	0,4	16684,80
Hidrólisis	313,64	10,05	1,2	12,00	15000	0,4	90161,99
Detoxificación HE	301,00	0,50	1,2	1,00	15000	0,4	16684,80
Fermentación HE	314,55	10,08	1,2	12,00	15000	0,4	90161,99
Detoxificación LP	365,67	0,37	1,2	0,40	15000	0,4	11564,98
Fermentación LP	382,12	12,22	1,2	14,00	15000	0,4	95896,38
						Ce total	321154,95 (€)

Este valor remarcado en amarillo es Total Purchase Cost (PCE). Ya que se ha calculado esto, se puede calcular el resto del coste de capital para la apertura de la planta con los factores dado en la figura x. Como se puede ver en la figura 38, el valor del resto de cosas se puede calcular como un múltiplo en concreto del PCE:

Item	Process type		
	Fluids	Fluids-solids	Solids
1. Major equipment, total purchase cost	PCE	PCE	PCE
f_1 Equipment erection	0.4	0.45	0.50
f_2 Piping	0.70	0.45	0.20
f_3 Instrumentation	0.20	0.15	0.10
f_4 Electrical	0.10	0.10	0.10
f_5 Buildings, process	0.15	0.10	0.05
* f_6 Utilities	0.50	0.45	0.25
* f_7 Storages	0.15	0.20	0.25
* f_8 Site development	0.05	0.05	0.05
* f_9 Ancillary buildings	0.15	0.20	0.30
2. Total physical plant cost (PPC) $PPC = PCE (1 + f_1 + \dots + f_9)$ $= PCE \times$	3.40	3.15	2.80
f_{10} Design and Engineering	0.30	0.25	0.20
f_{11} Contractor's fee	0.05	0.05	0.05
f_{12} Contingency	0.10	0.10	0.10
Fixed capital = $PPC (1 + f_{10} + f_{11} + f_{12})$ $= PPC \times$	1.45	1.40	1.35

*Omitted for minor extensions or additions to existing sites.

Figura 38. Factores para la estimación de los costes fijos de capital

Para estos primeros cálculos, es importante señalar, que el PCE es redondeado, quedando en un valor de 300000, y que, dentro de los valores de la tabla, los coeficientes son elegidos de la columna líquidos-sólidos.

Descripción del factor	Nº factor	%	Coste (€)
Montaje de equipo	f1	0,45	135000,0
Tuberías	f2	0,45	135000,0
Instrumentación	f3	0,15	45000,0
Eléctrico	f4	0,1	30000,0
Edificios, proceso	f5	0,1	30000,0
Utilidad	f6	0,45	135000,0
Almacenamiento	f7	0,2	60000,0
Desarrollo del lugar	f8	0,05	15000,0
Edificios auxiliares	f9	0,2	60000,0

Coste total 645000,0€

Junto con este valor obtenido, al sumar el PCE, como viene indicado en la figura, se podrá obtener el PPC (Total Physically Plant Cost), dándonos un total de **945000€**.

Por último, para completar la información dada por la figura 38, se tendrán que calcular 3 costes más y así obtener el Fixed Capital.

Descripción del factor	Nº factor	%	Coste (€)
Diseño e Ingeniería	f10	0,25	236250,0
Sueldo contratistas	f11	0,05	47250,0
Contingencia	f12	0,1	94500,0

Coste total 378000,0 €

Si a este valor obtenido, le sumamos el PPC, obtendremos el Coste Total de la Inversión (Fixed Capital o Total Investment Cost), también llamado como capital fijo.

$$\text{Capital fijo} = \text{PPC} + f10 + f11 + f12 = \mathbf{1323000,0 \text{ €}}$$

Para terminar este apartado, hay que sumar un término más, que es el working capital, equivalente a un 0,05% del capital fijo, que es dinero en efectivo para tener una mayor liquidez. De este modo obtendremos el coste total de inversión que se tendrá que hacer en un principio:

$$\text{Coste total de inversión} = \text{Capital fijo} + \text{Capital fijo} \cdot (1 + 0,05) = \mathbf{1389150,0 \text{ €}}$$

El siguiente apartado consiste en calcular, de una manera análoga al anterior, el coste de producción. Los factores y distintos métodos a calcular se pueden observar en la figura 39:

<i>Variable costs</i>		<i>Typical values</i>
1. Raw materials		from flow-sheets
2. Miscellaneous materials		10 per cent of item (5)
3. Utilities		from flow-sheet
4. Shipping and packaging		usually negligible
	Sub-total A
<i>Fixed costs</i>		
5. Maintenance		5–10 per cent of fixed capital
6. Operating labour		from manning estimates
7. Laboratory costs		20–23 per cent of 6
8. Supervision		20 per cent of item (6)
9. Plant overheads		50 per cent of item (6)
10. Capital charges		10 per cent of the fixed capital
11. Insurance		1 per cent of the fixed capital
12. Local taxes		2 per cent of the fixed capital
13. Royalties		1 per cent of the fixed capital
	Sub-total B
	Direct production costs A + B
13. Sales expense		20–30 per cent of the direct
14. General overheads		production cost
15. Research and development		
	Sub-total C
Annual production cost = A + B + C =	
Production cost £/kg =		$\frac{\text{Annual production cost}}{\text{Annual production rate}}$

Figura 39. Resumen de los costes de producción

Para calcular el primer grupo de costes, “Variable costs” o costes variables, antes se tiene que calcular el coste de las materias primas a utilizar.

Materias primas	carga (kg/carga)	Precio (€/kg)	Precio (€/carga)	nº cargas/día	precio (€/día)	precio (€/año)
BSG	100,00	0,02	2,00	16,00	32,00	9600,00
Enzima	404,54	2,00	809,09	0,50	404,54	121363,20
sulfúrico	7,00	0,08	0,54	16,00	8,62	2587,20
agua	559,67	0,00	1,80	16,00	28,80	8639,46
Resina HE	192,64	4,00	770,56	1,00	770,56	3082,24
Resina LP	7,31	4,00	29,25	16,00	468,05	1872,21
Total			1613,24€		1712,58 €	147144,32 €

Se ha considerado que en el pretratamiento hay 16 cargas al día. Para la hidrólisis enzimática tiene que dar cabida a 32 cargas en 48 horas, con 2 tanques para no parar la planta. Para la detoxificación HE, se considera 1 tanque con capacidad de 32 cargas, mientras que para la detoxificación LP, tiene 1 tanque con 1 carga por 1 hora. Para las dos fermentaciones, se

consideran 2 tanques de fermentación para no parar la planta, con cabida para 32 cargas.

Descripción del factor	Coste (€)
1. Materias primas	147144,3
2. Materiales varios	13230,0
3. Utilidades	135000,0
4. Envíos y embalajes	0,0
Subtotal costes variables	295374,3 (€)

El valor de las materias primas ha sido obtenido anteriormente, el valor de materiales varios es un 10% del mantenimiento, valor que se obtendrá a continuación, las utilidades han sido calculadas en el coste total de inversión, mientras que los envíos y embalajes se desprecian.

A continuación, se calculan los siguientes costes de la figura 39, los costes fijos:

Descripción del factor	Factor	Coste (€)
5. Mantenimiento	0,1 (10% FC)	132300,0
6. Mano de obra	0,05 (5% de Manning)	80000,0
7. Costes de laboratorio	0,2 (20% mano obra)	16000,0
8. Supervisión	0,2 (20% mano obra)	16000,0
9. Plan de gastos generales	0,5 (50% mano obra)	40000,0
10. Cargas de capital	0,1 (10% FC)	132300,0
11. Seguro	0,01 (1% FC)	13230,0
12. Impuestos locales	0,02 (2% FC)	26460,0
11. Derechos de autor	0,01 (1% FC)	800,0
Subtotal costes fijos		457090,0€

La suma de estos dos subtotales nos da el valor de costes directos de producción. (CDP)

$$CDP = Costes variables + Costes fijos = 752464,3€$$

Se procede al cálculo de los costes indirectos:

Descripción del factor	Factor	Coste (€)
14. Gastos de ventas	0,20 (20% CDP)	150492,9
15. Gastos generales	0,20 (20% CDP)	150492,9
16. Investigación y desarrollo	0,20 (20% CDP)	150492,9
Sub total costes indirectos		451478,6€

Por lo que, sumando este último valor con el CDP, se obtendrá el coste de producción anual (CPA).

$$CPA = CDP + Costes indirectos = \mathbf{1203942,9€}$$

Por último, ya que en este proceso si que se obtienen productos comerciales, se puede calcular cuánta cantidad de estos productos se van a obtener, y cuanto gasto corresponde por cada kg generado de estos productos. Lo primero que se debe tener en cuenta, es que se supone 300 días trabajados por año, partiendo de esto, podemos sacar las producciones de butanol y ABE en este caso:

Productos de venta	kg/año	Kg/día
Butanol	19673	2,73
ABE	24850	3,45

Ya con estos valores obtenidos, se puede sacar el precio por cada kg obtenido:

Coste de producción	
€/kg BSG	2,5082

Con todo el análisis realizado, se puede concluir que la inversión que es necesaria hacer será de un Coste Total de Inversión de 1389150€, además de otro valor, el Coste de Producción Anual, que asciende hasta los 1203942,9€.

En cuanto al precio que costaría a esta planta la producción en € por cada Kg, a priori es un valor alto que podría no hacer rentable el funcionamiento de la planta, pero lo que se va a comprobar aquí la viabilidad de añadir la etapa de detoxificación a este proceso. Para comprobar esto, lo que se ha hecho ha sido calcular de nuevo el coste de producción sin detoxificación, obteniendo un valor de 2,49€/Kg BSG, dando una diferencia de menos de 2 céntimos de euro, siendo un gasto asumible en comparación con la mejora en rendimiento y productividad que aporta la etapa de detoxificación.

Ante algunas simplificaciones efectuadas en los cálculos, se han realizado de nuevo las cuentas sin redondear los costes de equipos, obteniendo 2,61€/Kg BSG con detoxificación y 2,46€/Kg BSG sin detoxificación, diferencia entre las dos partes aún lo suficientemente pequeña como para ser asumible.

6. Conclusiones

Las principales conclusiones del trabajo realizado son las siguientes:

Con la realización de los diferentes ensayos con los medios modelo preparados, se determina que, entre los dos grupos de resinas seleccionados, las que muestran un mejor rendimiento en cuanto a eliminación de inhibidores y menor consumo de azúcares son las resinas aniónicas fuertes. Las resinas aniónicas débiles obtienen unos buenos resultados en cuanto a eliminación de inhibidores, pero la disminución en la concentración de azúcares que presentan es muy elevada, llegando a reducirse en un 19,56% de glucosa (S45 al 3%), frente a un 9,24% como máximo encontrado con las resinas fuertes. En cuanto a estas resinas fuertes, con concentraciones de 2% y 3% pueden llegar a eliminar el 100% tanto de ácido cumárico como ferúlico, pero la resina MP elimina menos azúcares que la otra resina fuerte, VP. Tras todos estos datos y comparaciones, la resina MP, en sus concentraciones de 1% y 2% es la que más se acerca a cumplir los objetivos que busca la etapa de detoxificación.

Gracias a la elección trabajando con medios modelo, se puede trabajar directamente con sólo una resina en el medio real. La primera conclusión a la que se llega a primera vista observando los resultados, es que la detoxificación en medio real no ha sido tan efectiva como cuando se realizó en medios modelo. Las razones por las que ha ocurrido esto pueden ser que al trabajar con los medios modelo, sólo se introdujeron como elementos inhibidores al ácido cumárico y al ácido ferúlico, sin embargo, el medio real contiene una gran variedad de estos elementos de carácter aniónico, provocando que la resina se sature antes, que los inhibidores queden retenidos y por lo tanto se consiga un peor rendimiento; la otra razón es que estas resinas utilizadas no son específicas para la eliminación de fenólicos, y como en el medio real hay más, dificulta el proceso.

Sobre el rendimiento de esta resina en medio real, los resultados que se obtienen son muy distintos en función del medio en que se realiza, líquido pretratado o hidrolizado enzimático. El hidrolizado ofrece unos resultados algo pobres, perdiendo más azúcares que los que se perdían en el medio modelo, haciendo que para la posterior fermentación se obtengan valores muy bajos de rendimiento y productividad de butanol y ABE. Esto puede ser debido, como se ha comentado a lo largo del trabajo por la compleja matriz que presenta, pudiendo hacer que la resina presente una mayor afinidad a la adsorción de azúcares, viéndose modificados la cinética y el equilibrio de adsorción. En general se puede concluir, que los mejores resultados se obtienen utilizando la resina fuerte MP con una concentración del 2%, siendo ésta capaz de eliminar en el líquido pretratado el 100% de vanílico, vainillina, siríngico y cumárico, 69% de 4-hidroxibenzoico, 53,8% de siringaldehído y un 32,7% de ferúlico,



obteniendo pérdidas de azúcar no demasiado elevadas, siendo el máximo un 3,2% para glucosa. Las resinas parecen cumplir su función y pueden ser una buena opción para realizar la detoxificación, pero teniendo en cuenta los resultados obtenidos aquí, para siguientes experimentos hay que elegir las y determinar sus cantidades sabiendo que, en estas concentraciones probadas, se saturan y no pueden realizar el proceso al completo, necesitando quizás una mayor concentración, pero teniendo también cuenta el azúcar eliminado.

En cuanto a los datos de producción de butanol y ABE, los mejores resultados se logran con Líquido pretratado con MP al 2%, con un rendimiento de butanol de 0,306(g/g), 0,396(g/g) de ABE y una productividad de 0,047 (g/L-h) de butanol y 0,061 (g/L-h) de ABE. En comparación con experimentos similares, debido a lo explicado anteriormente que ocurre en el medio real, los resultados sobre todo en el hidrolizado enzimático son peores que otros, pero los resultados del líquido pretratado, en cuanto a rendimiento son similares, incluso en comparación con alguno, como el 4º, son superiores, ya que obtiene 0,17 g/g de butanol y 0,22 g/g ABE. Por otro lado, en cuanto a productividad, en casi todos los casos, los resultados obtenidos son menores que los de los otros experimentos, como el 4º, que obtiene 0,07 g/L-h de butanol y 0,09 g/L-h de ABE.

Para llevar a cabo un estudio económico preliminar se ha utilizado el método factorial de Lang. Los principales resultados indican que se necesita una inversión de 1389150 €, como coste total de inversión, con un coste de producción anual de 1203942,9€. Gracias a estos datos, se puede obtener también el dato de costes de producción, siendo de 2,61€/Kg BSG, mientras que el coste en un proceso sin detoxificación y por tanto los gastos que este ocasiona, es de 2,46€/Kg BSG, precio asumible a sumar al proceso, ya que, por esa cantidad de dinero añadido, puedes obtener un mejor rendimiento y productividad de solventes, proporcionando una mayor viabilidad al proceso.



7. Bibliografía

- [1] Dolly Kumari, Radhika Singh, (2018). "Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 90, pp. 877–891
- [2] Wagner Roberto da Silva Trindade , Rogério Gonçalves dos Santos, (2017). "Review on the characteristics of butanol, its production and use as fuel in internal combustion engines." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 69, pp. 642–651
- [3] B. Bharathirajaa, J. Jayamuthunagaib , T. Sudharsanaaa, A. Bharghavia, R. Praveenkumarc , M. Chakravarthya , D. Yuvaraja, (2017). "Biobutanol – An impending biofuel for future: A review on upstream and downstream processing techniques". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 68, pp. 788–807.
- [4] M.V. Rodionova, R.S. Poudyal, I. Tiwari, R.A. Voloshin, S.K. Zharmukhamedov, H.G. Nam, B.K. Zayadan, B.D. Bruce, H.J.M. Hou, S.I. Allakhverdiev, (2017). "Biofuel production: Challenges and opportunities". *International Journal of Hydrogen Energy* 42, pp. 8450-8461.
- [5] M. Ballesteros, P. Manzanares, (2019). "Chapter Three - Liquid Biofuels", in: C. Lago, N. Caldés, Y. Lechón (Eds.). *The Role of Bioenergy in the Emerging Bioeconomy. Resources, Technologies, Sustainability and Policy*, Elsevier Inc. pp. 113-144.
- [6] L. Pattanaik, F. Pattnaik, D. K. Saxena and S. N. Naik, (2019). "Chapter 5 – Biofuels from agricultural wastes", in: A. Basile, F. Dalena (Eds.). *Second and Third Generations of Feedstocks, The Evolution of Biofuels*. Elsevier Inc. pp. 103-142.
- [7] R. Ahorsu, F. Medina, M. Constantí, (2018). "Significance and Challenges of Biomass as a Suitable Feedstock for Bioenergy and Biochemical Production: A Review". *Energies*, 11(12), 3366, pp. 1-19.
- [8] P. Binoda, E. Gnansounoub, R. Sindhua, A. Pandeyc, (2019). "Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives". *Bioresource Technology Reports* 5, pp. 317–325.
- [9] P. E. Plaza, L. J. Gallego-Morales, M. Peñuela-Vásquez, S. Lucas, M. T. García-Cubero, M. Coca (2017). "Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*". *Bioresource Technology* 244, pp. 166–174
- [10] B. Kumara, N. Bhardwaja, K. Agrawala, V. Chaturvedib, P. Vermaa, (2020). "Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic



biomass: An emerging biorefinery concept”. Fuel Processing Technology 199 pp. 1-24.

[11] Y. Li, W. Tang, Y. Chen, J. Liu, C. F. Lee, (2019). “Potential of acetone-butanol-ethanol (ABE) as a biofuel”. Fuel 242, pp. 673–686.

[12] M.S. Congcong Lu, “Butanol Production from Lignocellulosic Feedstocks by Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation with Integrated Product Recovery”. Tesis Doctoral. Ohio State University, Estados Unidos, (2011).

[13] W. Parawira, M. Tekere, (2011). “Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review”. Critical Reviews in Biotechnology, 31(1), pp. 20–31.

[14] M. F. Ibrahim, N. Ramli, E. K. Bahrin, S. Abd-Aziz, (2017). “Cellulosic biobutanol by Clostridia: Challenges and improvements”. Renewable and Sustainable Energy Reviews 79, pp. 1241–1254.

[15] H. Zabed, J.N. Sahu, A.N. Boyce, G. Faruq, (2016). “Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches”. Renewable and Sustainable Energy Reviews 66, pp. 751–774.

[16] L. J. Jönsson, C. Martín, (2016). “Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects”. Bioresource Technology 199, pp. 103–112.

[17] L. D. Gottumukkala, K. Haigh, J. Görgens, (2017). “Trends and advances in conversion of lignocellulosic biomass to biobutanol: Microbes, bioprocesses and industrial viability”. Renewable and Sustainable Energy Reviews 76, pp. 963–973.

[18] R. Kumar, V. Strezov, H. Weldekidan, J. He, S. Singh, T. Kan, B. Dastjerdi, (2020). “Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels”. Renewable and Sustainable Energy Reviews 123, pp. 1-31.

[19] M. Barroso Casillas, «Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería,» Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, España, (2010).

[20] A. Verardi, C.G. Lopresto, A. Blas, S. Chakraborty, V. Calabrò, (2020). “Chapter 3 -Bioconversion of lignocellulosic biomass to bioethanol and biobutanol.”, in: A. Yousuf, D. Pirozzi, F. Sannino. (Eds.) Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels, Elsevier Inc. pp. 67-124.

[21] S. KUSCH, M.V. MORAR, (2009). “Integration of Lignocellulosic Biomass into Renewable Energy Generation Concepts”. ProEnvironment 2, pp. 32 – 37.



- [22] S.I. Mussatto, G. Dragone, I.C. Roberto, (2006). “Brewers’ spent grain: generation, characteristics and potential applications”. *Journal of Cereal Science* 43, pp. 1–14.
- [23] J.C. López-Linares, M.T. García-Cubero, S. Lucas, G. González-Benito, M. Coca, (2019) “Microwave assisted hydrothermal as greener pretreatment of brewer’s spent grains for biobutanol production.” *Chemical Engineering Journal* 368, pp. 1045–1055.
- [24] K. M. Lynch, E. J. Steffen, E. K. Arendt, (2016). “Brewers’ spent grain: a review with an emphasis on food and health.” *J. Inst. Brew* 122, pp. 553–568.
- [25] L. F. Guido, M. M. Moreira, (2017). “Techniques for Extraction of Brewer’s Spent Grain Polyphenols: a Review”. *Food Bioprocess Technol* 10, pp. 1192–1209.
- [26] Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España, 2017. (2018).
https://cerveceros.org/uploads/5b30d4612433a_Informe_Cervecedores_2017.pdf Fecha de consulta: 05 May 2020.
- [27] Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España 2018 (2019).
https://cerveceros.org/uploads/5d1b32241b8be_Informe%20SocioeconomicoCerveza_2018.pdf Fecha de consulta: 05 May 2020.
- [28] R.Sindhu, P. Binod, A. Pandey, S. Ankaram, Y. Duan, M.K. Awasthi, (2019). “Chapter 5 – Biofuel Production From Biomass: Toward Sustainable Development”, in: S. Kumar, R. Kumar, A. Pandey (Eds.) *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Waste Treatment Processes for Energy Generation*, Elsevier B.V. pp. 79-92.
- [29] F. Saladini, N. Patrizi, F. M. Pulselli, N. Marchettini, S. Bastianoni, (2016). “Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66, pp. 221–227.
- [30] H.Chowdhury, B. Loganathan, I. Mustary, F. Alam, S. M.A. Mobin, (2019). “Chapter 12 – Algae for biofuels: The third generation of feedstock”, in: A. Basile, F. Dalena (Eds.) *Second and Third Generation of Feedstocks. The Evolution of Biofuels*, Elsevir Inc. pp. 323-344.
- [31] Y. Wang, S.-H. Ho, H.-W. Yen, D. Nagarajan, N.-Q. Ren, S. Li, Z. Hu, D.-J. Lee, A. Kondog, J.-S. Chang, (2017). “Current advances on fermentative biobutanol production using third generation feedstock”. *Biotechnology Advances* 35, pp. 1049–1059.



- [32] J. B. Dunn, (2019). “Biofuel and bioproduct environmental sustainability análisis”. *Current Opinion in Biotechnology* 57, pp. 88–93.
- [33] M. I. Jahirul, M.G. Rasul, A. A. Chowdhury, N. Ashwath, (2012). “Biofuels Production through Biomass Pyrolysis —A Technological Review”. *Energies* 2012, 5, pp. 4952-5001.
- [34] S. Nanda, D. Golemi-Kotra, J. C. McDermott, A. K. Dalai, I. Gökalp, J. A. Kozinski, (2017). “Fermentative production of butanol: Perspectives on synthetic biology” *New Biotechnology* 37, pp. 210–221.
- [35] P. Patakova, M. Linhova, M. Rychtera, L. Paulova, K. Melzoch, (2013). “Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems” *Biotechnology Advances* 31. pp. 58–67.
- [36] R. Millati, R. Wikandari, T. Ariyanto, R. U. Putri, M. J. Taherzadeh, (2020). “Pretreatment technologies for anaerobic digestion of lignocelluloses and toxic feedstocks”. *Bioresource Technology* 304 122998, pp. 1-14.
- [37] “Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification”, (2013). <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1754-6834-6-16> Fecha de consulta: 05 April 2020.
- [38] I. S. Horváth, A. Sjöde, N. O Nilvebrant, A. Zagorodni, L.J. Jönsson, (2004). “Selection of Anion Exchangers for Detoxification of Dilute-Acid Hydrolysates from Spruce”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol. 113–116, pp. 525-538.
- [39] S. Larsson, A. Reimann, N.-O. Nilvebrant, L.J. Jönsson, (1999). “Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates of Spruce”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol. 77–79, pp. 91-103.
- [40] A. K. Chandel, S. Silvério da Silva, O. V. Singh, (2013). “Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology” *Bioenerg. Res.* 6, pp. 388–401.
- [41] T.P. Mpabanga, A. K. Chandel, S. Silvério da Silva, O. V. Singh, (2012). “Chapter 3 -Detoxification Strategies Applied to Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Xylitol Production”, In: da Silva S., Chandel A. (Eds) *Detoxification Strategies Applied to Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Xylitol Production*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 63-82.



- [42] X.Guo, A. Cavka, L.J Jönsson, F. Hong, (2013). “Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production”. *Microbial Cell Factories* 2013, 12:93. pp 1-14.
- [43] R. Kaur, R. Dayal Tyagi, X. Zhang, (2020). “Review on pulp and paper activated sludge pretreatment, inhibitory effects and detoxification strategies for biovalorization”. *Environmental Research* 182 109094, pp. 1-14.
- [44] M. U. Monir, A. Yousuf, A. Abd Aziz, (2020). “Chapter 6 – Syngas fermentation to bioethanol”, in: A. Yousuf, D. Pirozzi, F. Sannino (Eds.) *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*. Elsevier Inc. Academic Press pp. 195-216
- [45] H. M. Húngaro, M. Y.R. Caturla, C. N. Horita, M. M. Furtado, A. S. Sant'Ana, (2016). “Blown pack spoilage in vacuum-packaged meat: A review on clostridia as causative agents, sources, detection methods, contributing factors and mitigation strategies”. *Trends in Food Science & Technology* 52, pp. 123-138.
- [46] C. Ren, Z. Wen, Y. Xu, W. Jiang, Y. Gu, (2016). “Clostridia: a flexible microbial platform for the production of alcohols”. *Current Opinion in Chemical Biology* 35, pp. 65–72.
- [47] Y. Yang, X. Nie, Y. Jiang, C. Yang, Y. Gu, W. Jiang, (2018). “Metabolic regulation in solventogenic clostridia: regulators, mechanisms and engineering” *Biotechnology Advances* 36, pp. 905–914.
- [48] M. Xu, J. Zhao, L. Yu, S.T. Yang, (2017). “Comparative genomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* for understanding the mutations contributing to enhanced butanol tolerance and production”. *Journal of Biotechnology* 263, pp. 36–44.
- [49] B. C. Fonseca, J. Bortolucci, T. Marques da Silva, V. Fabiano dos Passos, P. Fagundes de Gouvêa, T. M. Dinamarco, V. Reginatto, (2020). “Butyric acid as sole product from xylose fermentation by a nonsolventogenic *Clostridium beijerinckii* strain under controlled pH and nutritional conditions”. *Bioresource Technology Reports* 10, pp. 1-10.
- [50] P. Patakova, J. Kolek, K. Sedlar, P. Koscova, B. Branska, K. Kupkova, L. Paulova, I. Provaznik, (2018). “Comparative analysis of high butanol tolerance and production in clostridia” *Biotechnology Advances* 36, pp. 721–738.
- [51] Daza Montaña, C. (2009). Process design and evaluation of butanol production from lignocellulosic biomass. Finland. https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:41049479 Fecha de consulta: 03 July 2020



[52] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., (2008). "Determination of ash in biomass." National Renewable Energy Laboratory. Golden, Color. (Jan, Rep. No. TP-510-42622).

[53] Ozturk, B., Parkinson, C., Gonzalez-Miquel, M., (2018). "Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents." Sep. Purif. Technol. 206, pp. 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.05.052>

[54] P.E. Plaza Lázaro, "Valorización del bagazo de la industria cervecera mediante su transformación en biocombustibles avanzados: biobutanol." Trabajo de Fin de Máster. Universidad de Valladolid, 2017.

[55] G. Towler, R. Sinnott, (2013). "Chapter 7 - Capital Cost Estimating", in: G. Towler, R. Sinnott (Eds.) Chemical Engineering Design, 2nd Edition, Butterworth-Heinemann, Elsevier Ltd. pp. 307-354.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Jaime Aguado García
Grado en Tecnologías Industriales

8. Anexos



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Jaime Aguado García
Grado en Tecnologías Industriales

Lewatit® VPOC 1074 is a food grade, macroporous, strongly basic (type I) anion exchange resin based on a crosslinked polyacrylate. It is bead-shaped and has a special bead size distribution for use in the following processes:

- Co-current system
- Counter-current systems (Lewatit® WS system / fluidized bed)
- Counter-current systems (Lewatit® VWS system / compound fluidized bed)

In its chloride form, the **Lewatit® VPOC 1074** is suitable for the decolorization of:

- syrups from sugar production, especially cane sugar
- solutions of organic products, e. g. glycerin, amino acids

The macroporous structure and balanced resin matrix of **Lewatit® VPOC 1074** facilitate the kinetics of adsorption and desorption. Substances adsorbed, e. g. high-molecular hydrophilic anionic organic substances and colorants from sugar solutions, can be desorbed easily by regeneration with a neutral or alkaline sodium chloride solution.

Lewatit® VPOC 1074 is therefore highly recommended for use wherever complete and rapid removal of a relatively high concentration of organic substances is required. Use in combination with other Lewatit® adsorber resins such as **Lewatit® S 6368 A** allows simultaneous fine polishing.

If using **Lewatit® VPOC 1074** to treat potable water and the aqueous solutions listed above, special care should be given to the initial cycles of the new resin. Please refer to the recommended start-up conditions available on request.

The special properties of this product can only be fully utilized if the technology and process used correspond to the current state-of-the-art. Further advice in this matter can be obtained from Lanxess, Business Unit Liquid Purification Technologies.

Common Description

Delivery form	Cl ⁻
Functional group	Quaternary ammonium Type 1
Matrix	Acrylic

Structure	Macroporous
Appearance	White, opaque

Specified Data

Uniformity coefficient		max.	1.8
Mean bead size	d50	mm	0.40-1.60
Effective size	d10	mm	0.50-0.60
Total capacity (delivery form)		min. eq/L	0.85

Typical Physical and Chemical Properties

Bulk density for shipment	(+/- 5%)	g/L	720
Density		approx. g/mL	1.06
Water retention (delivery form)		approx. weight %	66-72
Volume change (Cl ⁻ -OH ⁻)		max. approx. %	20
Stability pH range			0-14
Stability temperature range		°C	1-75 (Cl)
Storage time (after delivery)		max. years	3
Storage temperature range		°C	-20 - +40

Operation

Operating temperature		max. °C	75 (Cl)
Operating pH range	during exhaustion		0-12
Bed depth for single column		min. mm	800
Back wash bed expansion per m/h (20°C)		%	10
Specific pressure loss kPa*h/m ² (15°C)		kPa*h/m ² (15°C)	1.1
Max. pressure loss during operation		kPa	250
Specific flow rate		max. BV/h	5

Regeneration

NaCl regeneration	concentration	approx. wt. %	10
NaCl regeneration	quantity co-current	min. g/L resin	200

PRODUCT INFORMATION
LEWATIT® VP OC 1074



NaCl regeneration	quantity counter-current	min. g/L resin	200
NaOH regeneration	concentration	approx. wt. %	2-6
NaOH regeneration	quantity co-current	min. g/L resin	100
NaOH regeneration	quantity counter-current	min. g/L resin	70
NaCl/NaOH regeneration	concentration	approx. wt. %	10/1-2
NaCl/NaOH regeneration	quantity co-current	min. g/L resin	200/20
NaCl/NaOH regeneration	quantity counter-current	min. g/L resin	200/20
Regeneration contact time		min. minutes	20
Slow rinse at regeneration flow rate		min. BV	2
Fast rinse at service flow rate		min. BV	2

Additional Information & Regulations

Safety precautions

Strong oxidants, e.g. nitric acid, can cause violent reactions if they come into contact with ion exchange resins.

Toxicity

The safety data sheet must be observed. It contains additional data on product description, transport, storage, handling, safety and ecology.

Disposal

In the European Community ion exchange resins have to be disposed, according to the European waste nomenclature which can be accessed on the internet-site of the European Union.

Storage

It is recommended to store ion exchange resins at temperatures above the freezing point of water under roof in dry conditions without exposure to direct sunlight. If resin should become frozen, it should not be mechanically handled and left to thaw out gradually at ambient temperature. It must be completely thawed before handling or use. No attempt should be made to accelerate the thawing process.

Packaging

The experience has shown that the packaging stability for reliable resin containment is limited to 24 months under the storage conditions described above. It is therefore recommended to use the product within this time frame; otherwise the packaging condition should be checked regularly.

PRODUCT INFORMATION LEWATIT® VP OC 1074



This information and our technical advice – whether verbal, in writing or by way of trials – are given in good faith but without warranty, and this also applies where proprietary rights of third parties are involved. Our advice does not release you from the obligation to check its validity and to test our products as to their suitability for the intended processes and uses. The application, use and processing of our products and the products manufactured by you on the basis of our technical advice are beyond our control and, therefore, entirely your own responsibility. Our products are sold in accordance with the current version of our General Conditions of Sale and Delivery.

LANXESS Deutschland GmbH

Liquid Purification Technologies
Kennedyplatz 1
50569 Koeln Germany

+49-221-8885-0
lewatit@lanxess.com

www.lanxess.com www.lpt.lanxess.com

PRODUCT INFORMATION

LEWATIT® MonoPlus MP 500



Lewatit® MonoPlus MP 500 is a strongly basic, macroporous anion exchange resin (type I) with beads of uniform size (monodisperse) based on a styrene-divinylbenzene copolymer, designed for all demineralization applications.

The monodisperse beads have high chemical and osmotic stability. The extremely high monodispersity (uniformity coefficient: max. 1.1) and very low fines content of max. 0.1 % (< 0.315 mm) result in particularly low pressure losses compared with standard resins. Due to its special macroporous structure **Lewatit® MonoPlus MP 500** stands for effective adsorption and desorption of naturally occurring organic substances.

Lewatit® MonoPlus MP 500 is especially applicable for:

- » demineralization of water for industrial steam generation, e.g. Lewatit® WS System, Lewatit® Liftbed System or Lewatit® Rinsebed System
- » polishing using the Lewatit® Multistep System or a conventional mixed bed arrangement in combination with **Lewatit® MonoPlus SP 112** or **Lewatit® MonoPlus SP 112 H**
- » condensate polishing in combination with **Lewatit® MonoPlus SP 112 H**

Lewatit® MonoPlus MP 500 adds special features to the resin bed:

- » high flow rates during regeneration and loading
- » good utilization of the total capacity
- » low rinse water requirement
- » homogeneous throughput of regenerants, water and solutions, resulting in a homogeneous operating zone
- » virtually linear pressure drop gradient across the entire bed depth, allowing operation with higher bed depths
- » good separation of the components in mixed bed applications

The special properties of this product can only be fully utilized if the technology and process used correspond to the current state-of-the-art. Further advice in this matter can be obtained from Lanxess, Business Unit Ion Exchange Resins.

General Description

Ionic form as shipped	Cl ⁻
Functional group	quaternary amine, type I
Matrix	crosslinked polystyrene
Structure	macroporous
Appearance	beige, opaque

Physical and Chemical Properties

		metric units	
Uniformity coefficient*		max.	1.1
Mean bead size*		mm	0.62 (+/- 0.05)
Share of beads in the range*	Mean bead size +/- 0,06 mm	vol. %	> 90
Bulk density	(+/- 5 %)	g/l	640
Density		approx. g/ml	1.06
Water retention		wt. %	60 - 65
Total capacity*		min. eq/l	1.1
Volume change	Cl ⁻ --> OH ⁻	max. vol. %	22
Stability	at pH-range		0 - 14
Storability	of the product	max. years	2
Storability	temperature range	°C	-20 - 40

* Specification values subjected to continuous monitoring.

Recommended Operating Conditions*

		metric units	
Operating temperature		max. °C	70
Operating pH-range			0 - 12
Bed depth		min. mm	800
Specific pressure loss	(15 °C)	approx. kPa*h/m ²	0.8
Pressure loss		max. kPa	300
Linear velocity	exhaustion	max. m/h	60 ***
Linear velocity	backwash (20 °C)	approx. m/h	5
Bed expansion	(20 °C, per m/h)	approx. vol. %	18
Freeboard	backwash (extern / intern)	vol. %	100
Regenerant			NaOH
Counter current regeneration	level	approx. g/l	50
WS-System	concentration	approx. wt. %	2 - 4
Linear velocity	regeneration	approx. m/h	5
Linear velocity	rinsing	approx. m/h	5
Rinse water requirement	slow / fast	approx. BV	2.5
Co current regeneration	level	approx. g/l	100
Co current regeneration	concentration	approx. wt. %	3 - 5
Linear velocity	regeneration	approx. m/h	5
Linear velocity	rinsing	approx. m/h	5
Rinse water requirement	slow / fast	approx. BV	8
Mixed bed operation			
Bed depth		min. mm	500
Regenerant	level	approx. g/l	100
Regenerant	concentration	approx. wt. %	2 - 6

* The recommended operating conditions refer to the use of the product under normal operating conditions. It is based on tests in pilot plants and data obtained from industrial applications. However, additional data are needed to calculate the resin volumes required for ion exchange units. These are to be found in our Technical Information Sheets.

*** 100m/h for polishing

Additional Information & Regulations

Safety precautions

Strong oxidants, e.g. nitric acid, can cause violent reactions if they come into contact with ion exchange resins.

Toxicity

The safety data sheet must be observed. It contains additional data on product description, transport, storage, handling, safety and ecology.

Disposal

In the European Community ion exchange resins have to be disposed, according to the European waste nomenclature which can be accessed on the internet-site of the European Union.

Storage

It is recommended to store ion exchange resins at temperatures above the freezing point of water under roof in dry conditions without exposure to direct sunlight. If resin should become frozen, it should not be mechanically handled and left to thaw out gradually at ambient temperature. It must be completely thawed before handling or use. No attempt should be made to accelerate the thawing process.

The manner in which you use and the purpose to which you put and utilize our products, technical assistance and information (whether verbal, written or by way of production evaluations), including any suggested formulations and recommendations are beyond our control. Therefore, it is imperative that you test our products, technical assistance and information to determine to your own satisfaction whether they are suitable for your intended uses and applications. This application-specific analysis must at least include testing to determine suitability from a technical as well as health, safety, and environmental standpoint. Such testing has not necessarily been done by us. Unless we otherwise agree in writing, all products are sold strictly pursuant to the terms of our standard conditions of sale. All information and technical assistance is given without warranty or guarantee and is subject to change without notice. It is expressly understood and agreed that you assume and hereby expressly release us from all liability, in tort, contract or otherwise, incurred in connection with the use of our products, technical assistance, and information. Any statement or recommendation not contained herein is unauthorized and shall not bind us. Nothing herein shall be construed as a recommendation to use any product in conflict with patents covering any material or its use. No license is implied or in fact granted under the claims of any patent.

Edition: 2006-06-12
Previous Edition: 2005-10-19

Lewatit® A 365 is a premium food grade, gel type, weak base anion exchange resin based on a polyacrylate polymer. **Lewatit® A 365** is designed to offer exceptional high operating capacity, good physical stability and excellent resistance to mechanical osmotic shock. The acrylic matrix of **Lewatit® A 365** offers rapid kinetics for common anions, including larger, more bulky, anions like sulfate. **Lewatit® A 365** is fully regenerable with NaOH and other weak bases. As **Lewatit® A 365** is a true weak base resin, the regenerant consumption is close to stoichiometric. **Lewatit® A 365** is recommended for applications including demineralisation of high TDS waters, selective sulfate removal, purification of aqueous solutions, including decolorisation applications and once-through cartridge applications.

Lewatit® A 365 is supplied in a heterodispersed particle size distribution as spherical beads in the fully swollen moist free base form. **Lewatit® A 365** is prepared with a minimum amount of fines (-50 mesh particles) resulting in low pressure losses during service.

The special properties of this product can only be fully utilized if the technology and process used correspond to the current state-of-the-art. Further advice in this matter can be obtained from Lanxess, Business Unit Ion Exchange Resins.

General Description

Ionic form as shipped	Free base
Functional group	Polyamine
Matrix	Acrylate / DVB
Structure	Gel
Appearance	Yellow-white, opaque

Physical and Chemical Properties

	metric units	
Total capacity*	min. eq/l	3.4
Uniformity Coefficient*	max.	1.7
Effective size	mm	> 0,4
Bulk density (+/- 5 %)	g/l	730
Density	approx. g/ml	1.13
Water retention	wt. %	44 - 51
Volume change FB --> Cl ⁻	max. vol. %	16
Stability at pH-range		0 - 14
Stability temperature range	°C	1 - 70
Storability of the product	max. years	2
Storability temperature range	°C	-20 - +40

* Specification values subjected to continuous monitoring.

Recommended Operating Conditions*

		metric units	
Operating temperature		max. °C	60
Operating pH-range			0 - 9
Bed depth		min. mm	800
Pressure drop		max. kPa	200
Linear velocity	exhaustion	max. m/h	5 - 40
Freeboard	backwash (extern / intern)	vol. %	80 - 100
Regenerant			NaOH
Linear velocity	regeneration	approx. m/h	1 - 10
Volumetric flow rate	exhaustion	BV/h	4 - 30
Regenerant	level	approx. g/l	80 - 160
Regenerant	concentration	approx. wt. %	3 - 5
Linear velocity	rinse, slow / fast	m/h	1 - 10 / 5 - 60
Volumetric flow rate	regeneration	BV/h	1.5 - 4
Volumetric flow rate	rinse, slow / fast	approx. BV/h	1.5 - 4 / 8 - 30
Rinse water requirement	slow / fast	approx. BV	1 - 2,5 / 3 - 8

* The recommended operating conditions refer to the use of the product under normal operating conditions. It is based on tests in pilot plants and data obtained from industrial applications. However, additional data are needed to calculate the resin volumes required for ion exchange units. These data are to be found in our Technical Information Sheets.

Additional Information & Regulations

Safety precautions

Strong oxidants, e.g. nitric acid, can cause violent reactions if they come into contact with ion exchange resins.

Toxicity

The safety data sheet must be observed. It contains additional data on product description, transport, storage, handling, safety and ecology.

Disposal

In the European Community ion exchange resins have to be disposed, according to the European waste nomenclature which can be accessed on the internet-site of the European Union.

Storage

It is recommended to store ion exchange resins at temperatures above the freezing point of water under roof in dry conditions without exposure to direct sunlight. If resin should become frozen, it should not be mechanically handled and left to thaw out gradually at ambient temperature. It must be completely thawed before handling or use. No attempt should be made to accelerate the thawing process.

This information and our technical advice – whether verbal, in writing or by way of trials – are given in good faith but without warranty, and this also applies where proprietary rights of third parties are involved. Our advice does not release you from the obligation to check its validity and to test our products as to their suitability for the intended processes and uses. The application, use and processing of our products and the products manufactured by you on the basis of our technical advice are beyond our control and, therefore, entirely your own responsibility. Our products are sold in accordance with the current version of our General Conditions of Sale and Delivery.

Lewatit® S 4528 is a Food grade, weak basic macroporous anion exchange resin (tertiary and very low level of quaternary amino groups) based on polystyrene. It is bead-shaped and has a special bead size distribution for use in the following processes:

- » Lewatit® WS system (fluidized bed)
- » Lewatit® VWS system (compound fluidized bed)
- » Standard co current regenerated system

Lewatit® S 4528 is suitable in the free base form for:

- » acid removal and simultaneous decolorization of solutions of organic products such as sugar, gelatine, glycerin, grape must, whey, fruit concentrates, etc.

Its macroporous structure ensures very good adsorption of both acid and organic substances (e.g. colorants). These are desorbed by regeneration with caustic soda solution. On account of its low basicity, **Lewatit® S 4528** can be used in the treatment of products sensitive to alkali. The partial isomerisation resulting from contact with the ion exchange resin (e.g. conversion of glucose to fructose and mannose) is negligible.

When using **Lewatit® S 4528** to treat potable water and the aqueous solutions listed above, special care should be given to the initial cycles of the new resin. Please refer to the recommended start-up conditions available on request.

The special properties of this product can only be fully utilized if the technology and process used correspond to the current state-of-the-art. Further advice in this matter can be obtained from Lanxess, Business Unit Ion Exchange Resins.

General Description

Ionic form as shipped	free base
Functional group	tertiary amine
Matrix	crosslinked polystyrene
Structure	macroporous
Appearance	beige, opaque

Physical and Chemical Properties

		metric units	
Uniformity Coefficient*		max.	1.6
Bead size*	> 90 %	mm	0.4 - 1.2 5
Effective size*		mm	0.5 (+/- 0.0) 5 5
Bulk density	(+/- 5 %)	g/l	620
Density		approx. g/ml	1.02
Water retention		wt. %	46 - 52
Total capacity*		min. eq/l	1.7
Volume change	free base --> Cl ⁻	max. vol. %	45
Stability	at pH-range		0 - 14
Storability	of the product	max. years	2
Storability	temperature range	°C	-20 - 40

* Specification values subjected to continuous monitoring.

Recommended Operating Conditions*

		metric units	
Operating temperature		max. °C	80
Operating pH-range			0 - 8
Bed depth		min. mm	800
Specific pressure drop	(15 °C)	approx. kPa*h/m ²	1.1
Pressure drop		max. kPa	250
Linear velocity	operation	max. m/h	-
Linear velocity	backwash (20 °C)	approx. m/h	2 - 3
Bed expansion	(20 °C, per m/h)	approx. vol. %	30
Freeboard	backwash (extern / intern)	vol. %	80 - 100
Regenerant			NaOH
Counter current regeneration	level	approx. g/l	50 - 80
Counter current regeneration	concentration	wt. %	2 - 4
Co current regeneration	level	approx. g/l	50 - 80
Co current regeneration	concentration	approx. wt. %	2 - 4
Linear velocity	regeneration	approx. m/h	5
Linear velocity	rinsing	approx. m/h	5 - 8
Rinse water requirement	slow / fast	approx. BV	6

* The recommended operating conditions refer to the use of the product under normal operating conditions. It is based on tests in pilot plants and data obtained from industrial applications. However, additional data are needed to calculate the resin volumes required for ion exchange units. These data are to be found in our Technical Information Sheets.

Additional Information & Regulations

Safety precautions

Strong oxidants, e.g. nitric acid, can cause violent reactions if they come into contact with ion exchange resins.

Toxicity

The safety data sheet must be observed. It contains additional data on product description, transport, storage, handling, safety and ecology.

Disposal

In the European Community ion exchange resins have to be disposed, according to the European waste nomenclature which can be accessed on the internet-site of the European Union.

Storage

It is recommended to store ion exchange resins at temperatures above the freezing point of water under roof in dry conditions without exposure to direct sunlight. If resin should become frozen, it should not be mechanically handled and left to thaw out gradually at ambient temperature. It must be completely thawed before handling or use. No attempt should be made to accelerate the thawing process.

This information and our technical advice – whether verbal, in writing or by way of trials – are given in good faith but without warranty, and this also applies where proprietary rights of third parties are involved. Our advice does not release you from the obligation to check its validity and to test our products as to their suitability for the intended processes and uses. The application, use and processing of our products and the products manufactured by you on the basis of our technical advice are beyond our control and, therefore, entirely your own responsibility. Our products are sold in accordance with the current version of our General Conditions of Sale and Delivery.

BC pretratado
(recup. Sólido 90 kg/100 kg BC)
29,28 g glucano
12,24 g xilano
0,57 g arabinano
49,49 g LAT
28,04 g proteína
1,85 g cenizas

HE sin detoxificar
33,08 g/L glucosa
15 g/L xilosa
1,32 g/L fenólicos

HE detoxificado a)
29,57 g/L glucosa
13,30 g/L xilosa
1,25 g/L fenólicos

HE detoxificado b)
30,05 g/L glucosa
13,45 g/L xilosa
1,19 g/L fenólicos

BC = 135 g
24,53 g glucano
24,49 g xilano
9,11 g arabinano
35,73 g LAT
37,95 g proteína
2,64 g cenizas

H2SO4 1M
(0,067g/gMS)

Pretratamiento
Ácido diluido 15%MS,
pH 1, 121°C, 30 min

Líquido pretratamiento:
4,06 g/L glucosa; 2,1kg/100kg BC glucano
8,42 g/L xilosa; 4,2kg/100kg BC xilano
9,50g/Larabinosa;4,7kg/100kgBC arabinan
0,34 g/L Ac Acético
0,035 g/L HMF
0,041 g/L Furfural
1,70 g/L fenólicos

15 FPU/gMS CTec2

Hidrólisis enzimática
15%MS, pH 4,8, 55°C,
48h, 80 rpm

BC agotado

HE sin detoxificar

Detoxificación

- a) Resinas intercambio iónico MP 1% w/v, 35°C, 24h
- b) Resinas intercambio iónico MP 2% w/v, 35°C, 24h

HE detoxificado

Fermentación; Inóculo
10%; 35°C, pH 5,5, 96h

ABE
Sin detoxificar: 2,336 g BuOH/Kg BC; 2,59 g ABE/Kg BC
a) 11,49 g BuOH/Kg BC; 15,81 g ABE/Kg BC
b) 7,39 g BuOH/Kg BC; 8,3 g ABE/Kg BC

Líquido pretratamiento (LP)
Detoxificado

Detoxificación

- a) Resinas intercambio iónico MP 1% w/v, 35°C, 24h
- b) Resinas intercambio iónico MP 2% w/v, 35°C, 24h

Fermentación; Inóculo
10%, 35°C, pH 5,5, 96h

ABE
Sin detoxificar: 9,99 g BuOH/Kg BC; 12,62 g ABE/Kg BC
a) 23,57 g BuOH/kg BC; 32,78 g ABE/Kg BC
b) 33,596 g BuOH/Kg BC; 43,47 g ABE/Kg BC

LP detoxificado a)
4,01 g/L glucosa
8,33 g/L xilosa
9,28 g/L arabinosa
0,34 g/L Ac Acético
0,0346 g/L HMF
0,0382 g/L furfural
1,57 g/L fenólicos

LP detoxificado b)
3,93 g/L glucosa
8,21 g/L xilosa
9,35 g/L arabinosa
0,34 g/L Ac Acético
0,0345 g/L HMF
0,0380 g/L furfural
1,54 g/L fenólicos

