

MASTER INVESTIGACIÓN
EN INGENIERÍA PARA EL
DESARROLLO
AGROFORESTAL

Proyecto Fin de Master

PRODUCCIÓN DE BIOBUTANOL MEDIANTE FERMENTACION ABE
A PARTIR DE SUERO LÁCTEO. (Efecto de suplementar el medio de
fermentación con nutrientes esenciales).



Universidad de Valladolid

ALUMNO: Rebeca Díez Antolínez
TUTOR: Jesús Martín Gil
MASTER INVESTIGACIÓN EN
INGENIERÍA PARA EL
DESARROLLO AGROFORESTAL



Producción de biobutanol mediante Fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) a partir de suero lácteo.

(Efecto de suplementar el medio de fermentación con nutrientes esenciales)

Resumen: Este trabajo tiene como principal objetivo mejorar el rendimiento y la productividad de la fermentación ABE en un proceso discontinuo, empleando suero bruto desproteínizado suplementado con nutrientes esenciales como sustrato y la cepa *C. beijerinckii* NCIMB 8052, como catalizador. Pruebas preliminares empleando suero bruto desproteínizado reportaron pequeñas concentraciones de solventes y bajas productividades y rendimientos. La suplementación del sustrato con concentraciones limitadas de nutrientes esenciales (extracto de levadura, cisteína y sales minerales) mejora significativamente la viabilidad de la fermentación ABE, alcanzando cantidades de solventes de 7,68 g/l de butanol y de 10,18 g/l de solventes ABE trabajando con concentraciones iniciales de lactosa de 35 g/l y de 9,07 g/l de butanol y de 12,44 g/l de ABE, cuando la concentración inicial de lactosa es de 50 g/l. Con un rendimiento máximo de 0,33 g_{ABE}/g_{lactosa} y una productividad de 0,14 g/lh de butanol en la fermentación ABE. De los datos experimentales obtenidos, se concluye que suplementar el suero bruto con bajas concentraciones de nutrientes esenciales aumenta la cantidad de solventes producidos un 78 % frente al empleo de suero bruto no suplementado.

Palabras clave: suero queso, lactosa, nutrientes suplementarios, fermentación ABE, biobutanol, *C. beijerinckii*.

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos biocatalíticos se presentan como una alternativa real para hacer frente a los nuevos retos sociales de una sociedad post-petróleo. Durante los últimos años, ha surgido un creciente interés en la producción de biocarburantes y bioproductos a partir de biomásas de origen residual debido al continuo aumento de los precios de los recursos fósiles (Naik et al., 2010). Esta tendencia, unida al aumento de la preocupación sobre los efectos del cambio climático, la inestabilidad en el suministro de combustibles fósiles, el aumento del coste de las materias primas y el desarrollo de políticas cada vez más restrictivas al uso de fuentes energéticas no renovables, está reavivando el interés en los procesos bioquímicos (Pickett et al., 2008).

Desde los años 1980s, ha habido una continua búsqueda de carburantes sustitutos de los combustibles fósiles para su empleo en forma directa o mezclados en distintas proporciones con los combustibles fósiles (Sorensen, 2008). En la actualidad, los biocarburantes más empleados son el biodiesel y el bioetanol (Jones et al., 2007). Sin embargo, el butanol está generando mucho interés para este uso, debido a las importantes ventajas que presenta frente a otros solventes (Cascone, 2008). Así, el butanol tiene un mayor contenido energético, una menor volatilidad, una menor higroscopicidad y es menos corrosivo que el etanol, que lo hacen superior al etanol como biocarburante (Lee et al., 2008). Asimismo, el butanol es un importante producto químico con múltiples aplicaciones en la producción

de solventes, resinas, plastificantes, etc. (Ezeji y Blaschek, 2007).

La fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) a escala industrial fue mundialmente empleada para la producción de acetona y butanol desde principios del siglo XX hasta los años 1960s, empleando como biocatalizador especies de la bacteria *Clostridium spp.* (Jones y Woods, 1986). A partir de este momento, el proceso fue sustituido por procesos petroquímicos, con una mayor rentabilidad económica (Lee et al., 2008). Entre los principales factores que comprometen la viabilidad económica de la fermentación bioquímica frente a los procesos petroquímicos destacan: el elevado coste de los sustratos tradicionalmente empleados (maíz y melazas), la baja concentración de butanol en el caldo de fermentación (asociada a la fuerte inhibición por producto, fundamentalmente al butanol, que sufren los microorganismos que catalizan la fermentación) (Ezeji et al. 2004), el bajo rendimiento del proceso, con un rendimiento estequiométrico máximo para butanol a partir de glucosa de 0,41 g/g (Lee et al., 2008), la baja productividad volumétrica del proceso, con valores típicos < 0,5 g/lh (García et al., 2011) y el elevado coste de los procesos de recuperación de solventes debido a la gran cantidad de solventes distintos generados y al elevado punto de ebullición del butanol (118 °C) (Ezeji et al., 2013).

Una gran variedad de especies de *Clostridium spp.* son capaces de producir acetona, butanol y etanol durante la última fase de la fermentación, bajo unas determinadas condiciones de operación, a partir de una gran variedad de sustratos (pentosas, hexosas,



mono-, di- o polisacáridos). Sin embargo, relativamente pocas especies se están utilizando a nivel industrial, destacando las especies: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutyl-aceticum* y *C. saccharobutylicum* (Durre, 1996). Tal y como reseñaron Jones y Woods (1986), en condiciones discontinuas, la fermentación ABE se desarrolla en dos etapas principales: (a) una fase denominada "acidogénesis" asocia con un rápido crecimiento celular y una secreción de los ácidos carboxílicos, acetato y butirato, además de H_2 y CO_2 y (b) una fase de transformación de los ácidos en solventes, denominada "solventogénesis".

Los principales requisitos de las materias primas para emplearse como sustratos del proceso de fermentación ABE son su abundancia y no competencia en el mercado alimentario (Raganati et al., 2013), lo que garantizará una estabilidad en los precios y en el suministro. Un sustrato interesante para emplear en la fermentación ABE es el suero lácteo debido al gran volumen generado en el sector quesero, su elevada carga contaminante, que hace imprescindible un proceso de valorización o tratamiento previo antes de su vertido y presentar una concentración de lactosa de 5,0-6,0 %, valor excesivamente bajo para la mayoría de los procesos de fermentación industriales, pero óptima para las cepas de *Clostridium spp.* (Napoli, 2009).

El suero lácteo es el principal residuo contaminante generado del proceso de producción de queso, produciéndose aproximadamente 9 toneladas de suero lácteo por cada tonelada de queso producida (Kosikowski, 1979). De acuerdo con la FAO, el suero es uno de los principales productos generados a nivel mundial, con una producción global estimada de más de 189 millones de toneladas anuales, superando las 93 millones de toneladas anualmente en la Unión Europea (OCDE-FAO, 2013). En España, la producción de suero lácteo se estima en torno a 2,9 millones de toneladas anuales (MAGRAMA, 2013). Este residuo causa importantes problemas medioambientales tales como: excesivo consumo de oxígeno, impermeabilización, eutrofización o toxicidad, debido a su elevada carga orgánica (Prazeres et al., 2012). La carga orgánica es debida fundamentalmente a la lactosa (48-60 g/l), a las proteínas (33-67 g/l) y en menor medida a la grasa (8-10 g/l), presentando unos rangos de DQO y DBO₅ entre 27-60 kg/m³ y 50-102 kg/m³, respectivamente (Ergüder et al., 2001).

Con una normativa medioambiental cada vez más restrictiva que impide el vertido directo de suero lácteo al medioambiente (Directiva UE 1996/91), la industria quesera se ha visto obligada a someter los

efluentes generados a algún tipo de tratamiento de depuración o valorización (Guimaraes et al., 2010; Prazeres et al., 2012).

El empleo de medios sintéticos a base de lactosa o subproductos obtenidos a partir de suero como el permeado o el polvo de suero acidificado ha sido estudiado por diversos autores (Maddox, 1980; Schoutens et al., 1985; Ennis y Maddox, 1987; Ennis et al., 1987; Qureshi y Maddox, 1987, 1988, 1991, 1992, 1995, 2005 y Maddox et al., 1995; Napoli et al., 2010, 2011, 2012; Ragati et al., 2013). Las referencias científicas del empleo de suero crudo son muy escasas (Lindberg y Moriera, 1982; Foda et al., 2010), con rendimientos y productividades muy inferiores a las anteriormente citadas empleando subproductos derivados del suero.

La mayoría de los estudios se han realizado en procesos discontinuos, con una productividad global del proceso inferior a la obtenida con otros sustratos, como almidón o melazas, debido a la menor digestibilidad de la lactosa frente a la glucosa. La concentración de solventes está entre 5-15 g/l, la productividad se sitúa en torno a 0,1 g/lh y los rendimientos de fermentación varían entre 0.23-0,40 $\frac{g_{\text{solventes}}}{g_{\text{sustrato}}}$ (Schoutens et al., 1985; Ennis et al., 1986, 1987; Qureshi y Maddox, 1988, 1991, 1992, 1995; 2005; Maddox et al., 1995). Sin embargo, la relación butanol/acetona al final de la fermentación trabajando con *C. acetobutylicum* es mayor que la obtenida fermentando glucosa, alcanzando relaciones 20:1 frente a las tradicionales 3:1 (Linden et al., 1986) o 10:1:1 (Maddox, 1980). Aunque los cambios metabólicos que tienen lugar para incrementar la relación butanol/acetona aún se desconocen, distintos estudios indican que la composición del suero, la temperatura de reacción o agitación juegan un importante papel en la producción de solventes (Voget et al., 1989; Welsh y Veliky, 1984).

El suero lácteo es seleccionado como sustrato debido a su nulo o bajo coste y presentar una concentración de lactosa idónea para la fermentación ABE. Emplear subproductos del suero lácteo con alta concentración de lactosa, obtenidos mediante costosos tratamientos de concentración y evaporación, no se considera que sea la mejor alternativa, ya que eleva el precio del sustrato. Por este motivo, mejorar el proceso ABE empleando suero bruto mejorará la viabilidad económica y la sostenibilidad ambiental del proceso.

2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene un doble objetivo. Por una parte, determinar unas condiciones de operación que



permitan emplear suero bruto desproteínizado como sustrato de la fermentación ABE, garantizando unas producciones y unos rendimientos similares a las obtenidas con derivados del suero lácteo. Y por otra, evaluar el efecto de la adición de nutrientes esenciales, tales como nitrógeno, sales minerales, vitaminas y aminoácidos, sobre el desarrollo de la fermentación ABE, determinando la concentración de nutrientes óptima para maximizar el rendimiento y productividad del proceso.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos

La cepa empleada es *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052, suministrada por la Colección Española de Cepas Tipo, identificada como *C. beijerinckii* 508 T (CECT, España). La cepa madre fue reactiva según las indicaciones del protocolo del suministrador y conservada por congelación a -80 °C.

Los microorganismos descongelados, se siembran sobre placas de agar y crecen en condiciones anaerobias en una estufa de cultivo a 35 °C. Se recoge una colonia de la placa de agar y se inocula en 10 ml de medio sintético, constituido por 19 g/l de Reinforced Clostridial Medium (Oxoid, Reino Unido) y 10 g/l de lactosa (Sigma Aldrich, USA) en tubos Hungate de 15 ml, sometiéndolo a un choque térmico a 80°C durante 2 minutos y un posterior enfriamiento en hielo, durante 2 minutos. Después del enfriamiento, la cepa se incuba durante 20 horas en una jarra de anaerobiosis a 37°C.

3.2. Medios de fermentación

Medio sintético

El medio sintético empleado se ha optimizado experimentalmente para la cepa 508T a partir del medio de cultivo empleado generalmente como control de la fermentación ABE, denominado P2 medio (Qureshi y Blaschek, 1999) y que contiene por cada litro de agua desionizada: 20-50 g/l de lactosa (Sigma Aldrich, USA); 5 g/l de extracto de levadura (Fluka, USA) como fuente de nitrógeno; 0,5 g/l de KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, USA), 0,5 g/l de KHPO_4 (Sigma Aldrich, USA) y 2,1 g/l de $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ (Panreac, España), como buffer; 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, USA) y 0,01 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, USA) como fuente de sales minerales y 0,5 g/l de cisteína (Sigma Aldrich, USA), como fuente de aminoácidos.

La solución de lactosa, el extracto de levadura y el buffer se esteriliza autoclavándolas durante 40 minutos a 110 °C. Las soluciones minerales y los aminoácidos se esterilizan, filtrándolos a través de un

filtro estéril de 0.2 μm y se añaden al medio de fermentación una vez que se han enfriado.

Suero lácteo crudo

El suero lácteo crudo procede de la fabricación de queso de mezcla de leche de vaca y oveja, facilitado por la empresa Quesería Entrepinares SAU (Valladolid, España).

El suero se hierve durante 30 minutos para desnaturalizar y precipitar las proteínas, para evitar su interferencia durante la fermentación (Chen y Zall, 1982; Foda et al., 2010). El suero se separa de las proteínas precipitadas mediante filtración a través de una tela de algodón. El contenido de lactosa final en el filtrado es de 4,4-4,8 %, con una concentración de sales de 0,7-1,1 %.

3.3. Aparatos y modo de operación

Todos los experimentos se realizan empleando matraces con tres bocas con fondo redondo de 250 ml, con control del pH automático dosificando una solución de NaOH (1 M), empleando buretas automáticas (Crison, España). El control de temperatura y agitación se realiza sobre una placa calefactora con agitación integrada en el carrusel de reacciones de 6*250 ml (Radleys, Reino Unido).

Las condiciones de anaerobiosis se garantizan inyectando nitrógeno industrial libre de oxígeno de bombonas de gases (Air Liquide, Francia). El volumen del medio de fermentación se fija en 200 ml y se inoculan 3 ml de inóculo, entre el 1-1,5 % del volumen total (Ennis y Maddox, 1986). Todas las fermentaciones se llevan a cabo a una temperatura de fermentación de 35 °C, un pH inicial de 6, que se mantiene controlado cuando alcanza un valor de 5,6 y una leve agitación (150 rpm). Los medios de fermentación, los biofermentadores, los instrumentos de control y cualquier material en contacto con los microorganismos, susceptibles de contaminación son autoclavados durante 60 minutos a 121 °C.

De modo periódico, se toman muestras de los bioreactores en condiciones asépticas para determinar la evolución del consumo de lactosa y la formación de metabolitos durante toda la fermentación. Las muestras son centrifugadas a 5000 rpm en una microcentrifuga refrigerada durante 5 minutos y el sobrenadante es filtrado a través de un filtro de 0,45 μm y analizado mediante cromatografía HPLC y GC.

3.4. Métodos de Análisis

Los solventes del proceso, acetona, butanol, etanol, ácido acético y ácido butírico se determinan mediante



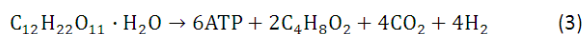
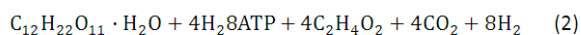
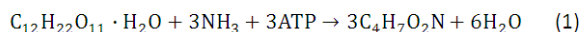
cromatografía de gases empleando un cromatógrafo de gases Agilent GC 7890 con detector FID (Agilent, USA), empleando una columna HP Innowax (Agilent, USA). La lactosa se determina mediante cromatografía líquida con un detector de índice de refracción en un HPLC Agilent LC1200 con detector de índice de refracción (Agilent, USA) utilizando agua desionizada como fase móvil en una columna Aminex HPX-87-H (Biorad, USA). Mediante HPLC, también se determina la concentración de ácido láctico, como parámetro de identificación de posibles contaminaciones microbianas.

3.5. Estequiometría del proceso

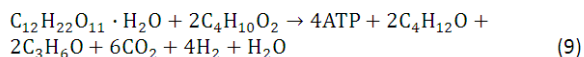
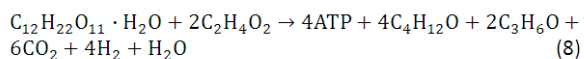
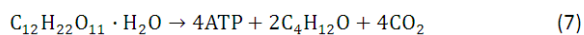
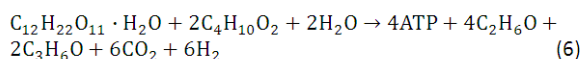
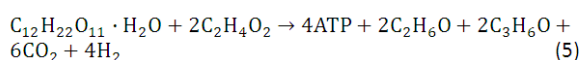
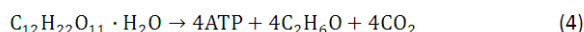
La conversión de la lactosa en compuestos ABE durante el metabolismo microbiano de algunas especies de *Clostridium spp.* es un proceso complejo. Sn embargo, las ecuaciones estequiométricas del proceso de conversión de la lactosa se pueden obtener de la suma de todas las etapas enzimáticas individuales involucradas en el proceso de producción de biomasa y metabolitos (Napoli, 2009).

Las principales reacciones que tienen lugar en el proceso son:

Fase Acidogénesis:



Fase Solventogénesis



3.6. Análisis de Datos

El comportamiento de la fermentación se establece en términos de grado de conversión de lactosa (σ_L), coeficiente de rendimiento de producción de metabolitos (i) frente a la lactosa consumida ($Y_{i/L}$), la productividad de butanol (W_B) y productividad ABE (W_{ABE}). Las fórmulas de determinación de estos parámetros son:

$$\sigma_L = \frac{(L_0 - L_1)}{L_0} \quad (10)$$

$$Y_{i/L} = \frac{C_{i1}}{(L_0 - L_1)} \quad (11)$$

$$W_B = \frac{C_{B1}}{t_R} \quad (12)$$

$$W_{ABE} = \frac{(C_{A1} + C_{B1} + C_{E1})}{t_R} \quad (13)$$

Siendo L_0 la concentración inicial de lactosa, L_1 la concentración final de lactosa, C_{i1} la concentración final del metabolito i, C_{A1} la concentración final de acetona, C_{B1} la concentración final de butanol, C_{E1} la concentración final de etanol y t_R el tiempo de residencia o tiempo de fermentación.

3.7. Diseño Experimental

El presente estudio experimental se ha realizado en dos etapas: (a) una etapa preliminar en el que se fermentó suero bruto desproteinizado a tres concentraciones de lactosa (20, 28,5 y 35 g/l), a diferentes temperaturas y pHs, para determinar las condiciones óptimas de operación. Dado que el rendimiento y la productividad del proceso en esta etapa preliminar fue muy inferior a la obtenida en los controles con medio sintético o a los datos publicados empleando productos derivados del suero lácteo como polvo o permeado de suero acidificado, se plantea una segunda etapa de experimentación para mejorar los resultados de la fermentación mediante la suplementación del suero bruto con nutrientes del medio sintético; (b) Se realiza un diseño experimental de tipo factorial con 2 factores y tres niveles. Factor 1: concentración inicial de lactosa (L_0) con los niveles 20, 35 y 50 g/l de lactosa y Factor 2: % suplementación de nutrientes medio sintético) con los niveles 35%-25%-15%, respectivamente.

En la Tabla 1, se muestran las concentraciones de nutrientes empleadas para cada nivel de ensayo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados presentados de la concentración de metabolitos (acetona, butanol, etanol, ácido acético y ácido láctico) presentada en la sección de Resultados y Discusión son valores medios con un error experimental máximo de $\pm 10\%$.

Debe indicarse que, en contraste con los procesos químicos, en los procesos biológicos se produce una gran variabilidad incluso en condiciones ambientales y de operación idénticas.

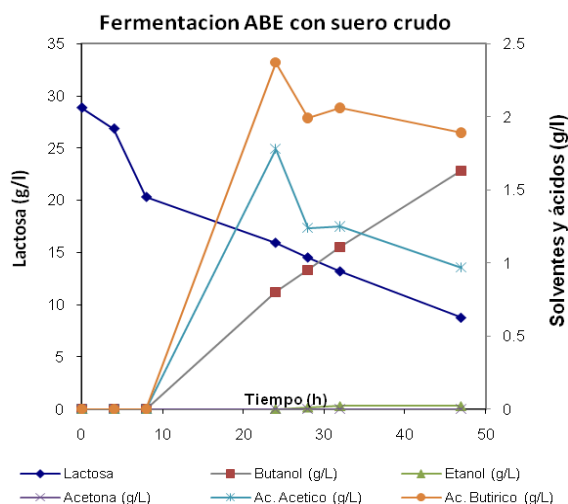
El análisis de significación estadística se realiza utilizando la ANOVA del Modelo Univariante, el test de Tukey, con el programa SPSS 15.0 (Software IBM).

Tabla 1. Concentración de los nutrientes suplementarios del suero bruto desproteinizado.

	Fuente de Nitrógeno		Buffer		Sales minerales		Aminoácidos
	Extracto levadura (g/l)		KH ₂ PO ₄ (g/l)	NH ₄ Cl (g/l)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)	Cisteína (g/l)
Medio sintético	5,00		0,500	2,100	0,20	0,0100	0,500
35 % suplementación (S1)	1,75		0,175	0,735	0,07	0,0035	0,175
25 % suplementación (S2)	1,25		0,125	0,525	0,05	0,0025	0,125
15 % suplementación (S3)	0,75		0,075	0,315	0,03	0,0015	0,075

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las pruebas preliminares realizadas empleando suero bruto desproteinizado como sustrato, bajo diversas condiciones de operación (L_0 , temperatura de fermentación y pH), los mejores resultados de fermentación se obtuvieron trabajando con una concentración inicial de lactosa de 29,5 g/l, a una temperatura de 35 °C y controlando el pH a 5,6. En estas condiciones de operación, la concentración máxima de butanol obtenida fue de 1,63 g/l, después de 47 horas. La productividad del butanol y de los solventes fue de 0,035 g/lh y 0,096 g/lh, respectivamente. Alcanzando un rendimiento de 0,081 g_{butanol}/g_{lactosa} y 0,22g_{totales}/g_{lactosa}, con un consumo de lactosa del 70,3 %. En la Figura 1, se muestra la evolución de los metabolitos a lo largo de toda la fermentación.


Figura 1. Evolución del consumo de lactosa y producción de solventes con suero bruto desproteinizado.

La concentración de butanol obtenida es 2,5 veces superior a la concentración obtenida por Foda et al. (2010), con un valor de 0,71 g/l de butanol, fermentando en discontinuo suero bruto desproteinizado y empleando *C. acetobutylicum* DSM 792 como catalizador, partiendo de una concentración de lactosa inicial de 25,7 g/l. Sin

embargo, reportaron una cantidad total de solventes de 5,65 g/l con una concentración de etanol de 4,94 g/l. La relación de solventes acetona/butanol/etanol obtenida por los autores en este trabajo es de 0:1:7, lo que difiere de modo importante de las relaciones entre solventes reportadas en bibliografía empleando lactosa como sustrato tanto para cepas de *C. acetobutylicum* como cepas de *C. beijerinckii* Siendo en todos los casos la producción de butanol muy superior a la de acetona, con una mínima producción de etanol. Estableciéndose relaciones Butanol/Acetona/Etanol de 20:1:0 (Linden et al., 1986), 10:1:1 (Maddox, 1980) o 13,1:1:4,4 (Welsh y Veliky, 1984),

En cualquier caso, los solventes ABE producidos a partir de suero bruto desproteinizado, muestran un escaso desarrollo de la fermentación, obteniéndose concentraciones muy inferiores a las publicadas a partir de derivados del suero lácteo empleando cepas salvajes. Alcanzándose concentraciones de butanol que varían entre 5,2-8,1 g/l y concentraciones de solventes entre 8,5-11,3 g/l de ABE (Welsh y Veliky, 1984; Schoutens et al., 1985; Ennis et al., 1986, 1987; Qureshi y Maddox, 1988, 1991, 1992, 1995; 2005; Maddox et al., 1995).

Con el objeto de mejorar el desarrollo de la fermentación y alcanzar los objetivos de esta investigación, se evalúa el efecto de incorporar los nutrientes suplementarios del medio P2 (Qureshi y Blaschek, 1999) en distintas concentraciones (Tabla 1) al suero bruto desproteinizado. Para poder comparar los resultados de la fermentación suplementada con distintas concentraciones de nutrientes adicionales se realizan tres controles con medio sintético, para cada una de las concentraciones de lactosa establecidas en el diseño experimental (C1, C2 y C3).

En la Tabla 2, se muestran las concentraciones medias y el coeficiente de variación de los principales metabolitos y resultados de la fermentación ABE.

**Tabla 2.** Efecto de suplementar suero bruto desproteínizado con nutrientes en la producción de solventes ABE en discontinuo empleado *C. beijerinckii* 508T.

Nº	Lactosa (g/l)	SUERO (%)	Tiempo (h)	Butanol (g/l)	Acetona (g/l)	Etanol (g/l)	Ácido acético (g/l)	Ácido butírico (g/l)	Lactosa residual (g/l)	Rendimiento butanol (g/g)	Rendimiento ABE (g/g)	Rendimiento total (g/g)	Productividad Butanol (g/lh)	Productividad total (g/lh)
1	21,37	65	49	4,23±0,03	0,47±0,10	0,19±0,10	0,50±0,03	0,99±0,03	1,30±0,10	0,24±0,02	0,27±0,02	0,36±0,02	0,09±0,03	0,13±0,03
2	21,54	75	49	4,94±0,02	0,60±0,04	0,17±0,06	0,43±0,02	0,85±0,03	1,27±0,08	0,26±0,02	0,30±0,02	0,34±0,03	0,10±0,03	0,14±0,03
3	21,56	85	49	4,08±0,01	0,84±0,04	0,17±0,01	0,59±0,04	0,88±0,02	1,22±0,10	0,21±0,04	0,26±0,04	0,34±0,04	0,08±0,01	0,14±0,01
4	35,88	65	54	7,32±0,03	1,90±0,07	0,23±0,10	0,62±0,05	0,81±0,002	2,99±0,05	0,25±0,01	0,32±0,02	0,36±0,02	0,14±0,03	0,20±0,03
5	35,92	75	54	7,68±0,05	2,31±0,01	0,20±0,02	0,44±0,06	0,61±0,10	3,40±0,10	0,25±0,05	0,33±0,04	0,34±0,05	0,10±0,04	0,17±0,04
6	35,78	85	69	6,97±0,04	2,01±0,04	0,19±0,02	1,32±0,04	1,42±0,09	4,24±0,10	0,23±0,02	0,31±0,02	0,35±0,03	0,10±0,01	0,17±0,09
7	50,87	65	68	8,77±0,08	3,31±0,07	0,27±0,02	0,40±0,04	0,40±0,04	1,86±0,09	0,18±0,03	0,25±0,03	0,28±0,02	0,13±0,05	0,20±0,08
8	50,83	75	68	9,07±0,09	3,15±0,06	0,22±0,04	0,42±0,06	0,69±0,05	3,94±0,12	0,19±0,08	0,27±0,08	0,29±0,10	0,13±0,01	0,20±0,04
9	51,07	85	68	7,14±0,10	2,51±0,09	0,18±0,03	0,91±0,07	1,08±0,06	14,27±0,09	0,20±0,07	0,27±0,02	0,33±0,07	0,11±0,10	0,17±0,09
Controles														
C1	21,60	0	48	2,16±0,03	0,07±0,001	0,06±0,001	0,54±0,05	2,77±0,08	0,60±0,41	0,11±0,03	0,12±0,02	0,28±0,04	0,03±0,03	0,08±0,03
C2	35,14	0	57	5,44±0,02	0,58±0,10	0,13±0,08	1,31±0,10	3,25±0,10	3,70±0,05	0,19±0,01	0,21±0,01	0,37±0,02	0,09±0,004	0,15±0,01
C3	51,30	0	68	4,93±0,06	1,56±0,09	0,16±0,07	0,87±0,08	1,34±0,10	4,91±0,08	0,11±0,03	0,14±0,04	0,17±0,02	0,07±0,008	0,10±0,03



De los resultados experimentales obtenidos, se concluye que suplementar suero bruto con nutrientes esenciales (extracto de levadura, cisteína, sales minerales y buffer) favorece de modo importante la producción de solventes ABE, fundamentalmente butanol, alcanzando mayores concentraciones de solventes en los ensayos que emplean suero bruto suplementado que en los controles, para todas las concentraciones de lactosa evaluadas. Se realizaron pruebas eliminando en cada experiencia uno de los nutrientes esenciales, obteniéndose un bajo desarrollo de la fermentación con una producción de solventes muy baja. Esto puede deberse a la gran cantidad de nutrientes (lípidos, sales minerales, aminoácidos, etc), aun presentes en el suero lácteo que pueden favorecer el proceso metabólico de la cepa *C. beijerinckii*508T.

Trabajando a una concentración inicial de lactosa de 21,5 g/l, en el control C1 se han generado 2,16 g/l de butanol y 2,29 g/L de solventes ABE, frente a los 4,23 g/l de butanol y 4,89 g/L de solventes ABE, obtenidos empleando suero suplementado al 35% (Exp. 1) o los 4,94 g/l de butanol y 5,71 g/L de solventes ABE obtenidos empleando suero suplementado al 25% (Exp. 2). A esta concentración inicial de lactosa, el mejor rendimiento se ha obtenido con una aportación de nutrientes del 25 % (Nivel 2 del Factor 2). Alcanzándose rendimientos para butanol y para solventes ABE de 0,26 g butanol/g lactosa y 0,30g ABE/g lactosa, respectivamente. Con una productividad de 0,10 g/lh de butanol y 0,14g/l de ABE, con un aprovechamiento de la lactosa en torno al 94 %, en todos los ensayos experimentales.

A una concentración inicial de lactosa de 35 g/l, se alcanzan concentraciones de butanol que varían entre los 6,97 g/l obtenidos con una suplementación del suero bruto del 15%, los 7,32 g/l cuando la suplementación es del 35% y los 7,68 %, cuando la aportación de nutrientes es del 25%. Alcanzando en este último caso, una concentración de solventes ABE de 10,2 g/l. Concentraciones un 40% superiores a las obtenidas en el control (C2), en el que sólo se alcanza una concentración de solventes ABE de 6,15 g/l. A esta concentración inicial de lactosa, los rendimientos de butanol y ABE son de 0,25 gbutanol/glactosa y 0,33 gABE/glactosa, para todas las concentraciones de suplementación frente a los rendimientos de 0,19 gbutanol/glactosa y 0,21 gABE/glactosa, alcanzados en el control. La productividad máxima obtenida ha sido de 0,10 g/lh de butanol y 0,17 g/lh de solventes ABE, con un aprovechamiento de la lactosa en torno al 90 %.

A la mayor concentración de lactosa inicial evaluada, $L_0=50$ g/l, se obtienen concentraciones de butanol que varían entre 8,77 y 9,07 g/l, con aportaciones de nutrientes del 35% y 25 %, respectivamente. Esta concentración disminuye a 7,14 g/l cuando la suplementación es del sólo 15 %. Las concentraciones ABE obtenidas han sido de 12,35 g/l, 12,44 g/l y 9,83 g/l, para aportaciones de nutrientes del 35%, 25% y 15%, respectivamente. En el caso del control (C3), se alcanza una concentración de solventes ABE de 6,65 g/l, con una concentración de butanol de 4,93 g/l, valores un 31 % inferiores a los obtenidos con el suero bruto suplementado. Los rendimientos de butanol y ABE obtenidos son de 0,18-0,20 gbutanol/glactosa y 0,25-0,27 gABE/glactosa, frente a rendimientos de 0,11 gbutanol/glactosa y 0,14 gABE/glactosa, obtenidos en el control. La productividad de la fermentación para butanol varía entre los 0,11 g/lh del medio con menor concentración de nutrientes (15%) y los 0,13 g/lh del medio con mayor suplemento de nutrientes (35%).

La cantidad de butanol y solventes ABE obtenidos empleando suero bruto suplementado para concentraciones elevadas de lactosa son ligeramente superiores a los publicados para cepas salvajes con derivados de suero lácteo procesado. Así, Ennis et al. (1986), Maddox et al. (1995) y Qureshi y Maddox (2005), reportaron concentraciones de butanol y solventes ABE que varían entre 5,2-8,1 g/l y 8,5-11,3 g/l, en procesos discontinuos, partiendo de 50 g/l de lactosa empleando la cepa *C. acetobutylicum* P262 como catalizador. Empleando la cepa *C. beijerinckii* NICB 8052, que es la cepa empleada en este trabajo, Qureshi y Blaschek (2000) obtuvieron concentraciones de butanol, acetona y etanol de 10,8 g/l, 3,2 g/l y 0,8 g/l, respectivamente, empleando 60 g/l de glucosa sintética como sustrato. Obteniendo un rendimiento ABE de la fermentación de 0,26 gABE/glactosa y una productividad ABE de 0,16 g/lh, tras 90 horas de fermentación. Por lo que se puede concluir que la suplementación del suero bruto con nutrientes esenciales, incluso a bajas concentraciones, como las estudiadas, favorece de modo importante el desarrollo de la fermentación y la producción de solventes.

En la Figura 2, se muestra la evolución de los metabolitos de fermentación a lo largo del tiempo. Representando para cada valor de concentración inicial de lactosa empleada, la evolución de los metabolitos en función de la aportación de nutrientes realizada.

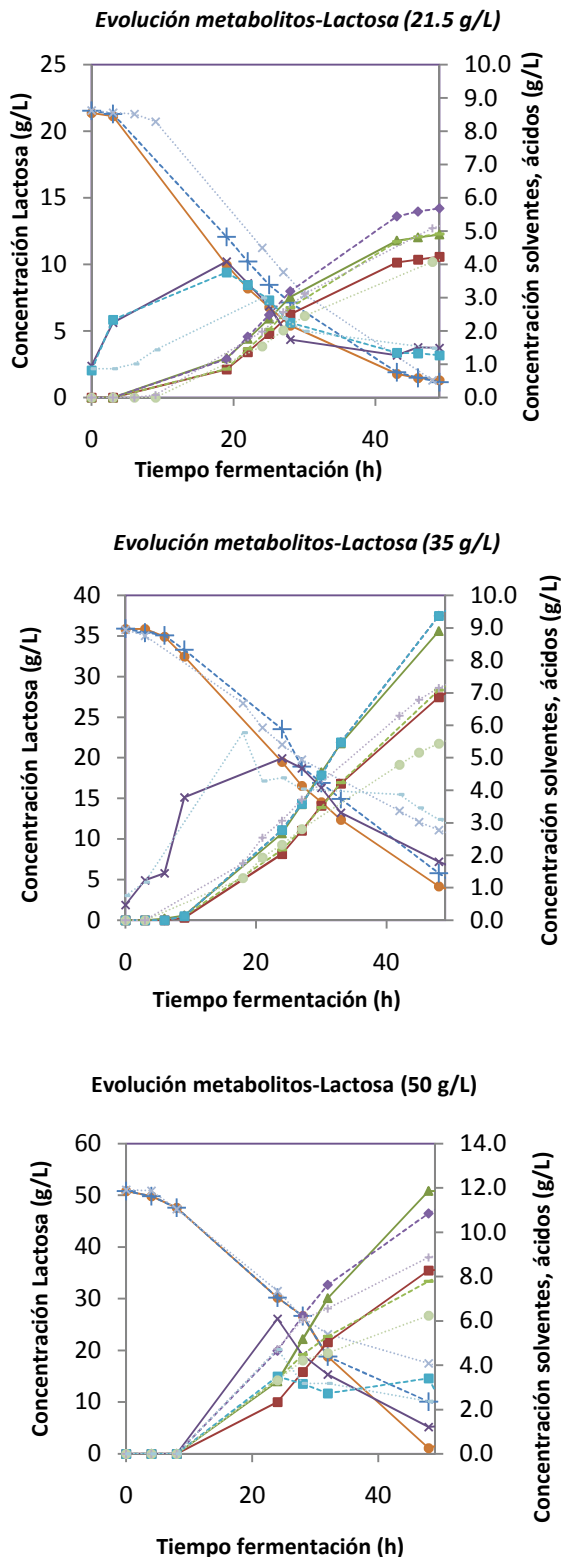


Figura 2. Evolución de la fermentación ABE. a) $L_0=21,5$ g/l, b) $L_0=35$ g/l y c) $L_0=50$ g/l. Leyenda de símbolos:

- Lactosa 65%
- Butanol 65%
- Butanol 75%
- Butanol 85%
- +— Lactosa 75%
- ▲— ABE 65%
- ▲— ABE 75%
- ▲— ABE 85%
- x— Lactosa 85%
- x— Ácidos 65%
- x— Ácidos 75%
- x— Ácidos 85%

Comparando la concentración de metabolitos producidos (acetona, butanol, etanol, ac. acético y ac. butírico), se observa que la mayor cantidad se obtiene en las experiencias con mayor concentración inicial de lactosa, debido a la propia estequiometría de las reacciones involucradas en la fermentación ABE (Napoli, 2009). Sin embargo, a medida que aumenta la concentración inicial de lactosa en el medio, aumenta el tiempo de reacción y disminuye el aprovechamiento de la lactosa. Así, el tiempo de reacción aumenta de 49 horas para concentraciones bajas de lactosa (21,5 g/l) a 54 horas a concentraciones medias de lactosa (35 g/l) o 68 horas a concentraciones más elevadas (50 g/l).

Respecto a la influencia de la concentración de nutrientes suplementarios en el suero bruto, se observa, que a una misma concentración de lactosa inicial, se obtienen concentraciones de solventes más elevadas, mejores rendimientos y mayores productividades en los ensayos en los que el suero bruto desproteínizado es suplementado con nutrientes esenciales a concentraciones medias (25%) frente a las altas (35 %) o las bajas (15%). Esto concuerda con las conclusiones obtenidas por Qureshi et al. (2004) que indicaba que el aporte de nitrógeno, sales minerales, vitaminas y aminoácidos, es esencial para la producción de solventes. Así como el empleo de soluciones buffer que controlen las variaciones de pH, especialmente de los compuestos disociados generados durante la fermentación. Sin embargo, estas aportaciones deben ser limitadas. Así, relaciones carbono/nitrógeno o fermentaciones con concentración limitada de nitrógeno, permiten obtener mayores rendimientos y productividades (Madihah, 2001).

El grado de desarrollo de las dos etapas involucradas en la reacción, tanto acidogénesis como solventogénesis, ha sido alto en todos los experimentos con suero bruto suplementado, dado que las concentraciones de solventes obtenidos y los rendimientos del proceso son elevados. La concentración de ácidos al final de la fermentación es baja, con concentraciones máximas varían entre 0,8-2,0 g/L, a excepción del experimento 6, cuyo desarrollo y rendimiento ha sido menor, presentando una concentración de ácidos de 2,72 g/l. La concentración de ácidos en los controles es superior a 2,0 g/l en todos los casos, debido a la gran cantidad de ácido butírico no transformado. Sin embargo, la cantidad final de ácidos obtenidos es muy inferior a la obtenida por Qureshi y Blaschek (2000), lo que indica

nuevamente un mejor desarrollo de la fermentación empleando suero bruto suplementado que derivados concentrados del permeado de suero acidificado.

La relación entre solventes al final de la fermentación varía en función de la concentración inicial de lactosa en el medio de fermentación. Así, la concentración de acetona aumenta a medida que se incrementa la concentración de lactosa inicial. La generación de etanol es muy baja en todos los casos, no superando valores de 0,25 g/l. Para concentraciones de lactosa bajas ($L_0 = 20$ g/l), la relación ABE es de 1:8:0,3, pasando a 1:3,5:0,1 con concentraciones de lactosa de 28,5 g/L, y de 1:2,8:0,1, cuando la concentración de lactosa aumenta hasta 35 g/L. Estos valores son similares a los reportados en bibliografía (Qureshi y Blaschek, 2000; Ennis et al., 1986; Maddox et al., 1995; Qureshi y Maddox, 1995). Sin embargo, los valores son inferiores a los publicados por Maddox (1980) que reportaban relaciones butanol-acetona de 20:1, trabajando con *C. acetobutylicum* NCIB 2954. Si bien, autores como Welsh y Veliky (1984) indican que factores como la agitación o el autoclave del suero lácteo influyen de modo importante en la relación de solventes obtenida.

En las Figura 3 y 4, se muestra una comparativa de los rendimientos de producción y la productividad de butanol, ABE y total (incluyendo solventes y ácidos) para cada uno de los ensayos realizados, y para los controles del proceso.

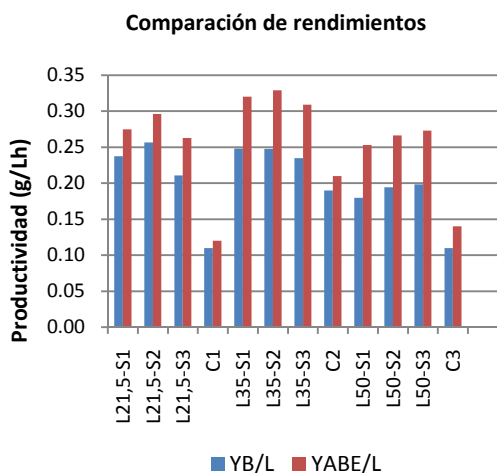


Figura 3. Comparación de los rendimientos de a) butanol y b) ABE.

Como ya se ha indicado, los rendimientos de fermentación han sido elevados para todos los experimentos empleando como sustrato suero bruto desproteinizado suplementado con nutrientes esenciales. Alcanzando los

experimentos 2, 4 y 5 los mayores rendimientos, con valores de 0,26 g butanol/g lactosa y 0,25 g butanol/g lactosa, respectivamente, frente a los rendimientos de los controles que varían entre 0,11 y 0,19 g butanol/g lactosa. Los rendimientos de solventes ABE también son elevados, con valores medios entre 0,26 y 0,32 g ABE/g lactosa. Los rendimientos más elevados se han obtenido en los ensayos 4 y 5, trabajando con concentraciones iniciales de lactosa de 35 g/l, con suplementaciones de nutrientes del 35% y 25%, respectivamente. Estos rendimientos son similares a los publicados por otros autores con derivados concentrados de suero lácteo (Qureshi y Blaschek, 2000; Ennis et al., 1986; Maddox et al., 1995; Qureshi y Maddox, 1995).

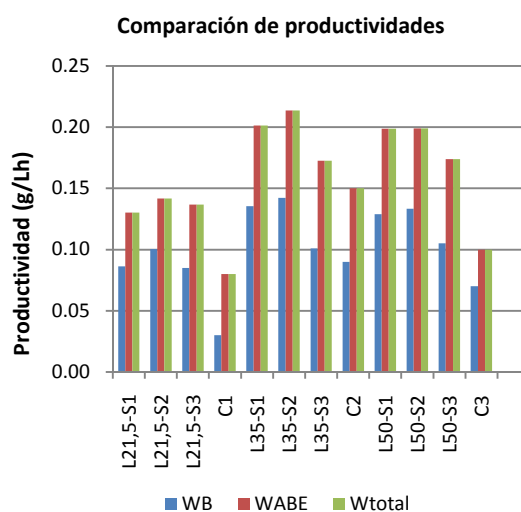


Figura 4. Comparación de la productividad de a) butanol, b) ABE y c) total.

En cuanto a la productividad, los valores más elevados se obtienen en las experiencias 4, 7 y 8, con valores de productividad en discontinuo para butanol de 0,13-0,14 g/lh y total de 0,20 g/lh. La experiencia 6, ha requerido un tiempo de reacción 15 horas superior a las fermentaciones con la misma concentración de lactosa inicial ($L_0 = 35$ g/l), lo que hace que disminuya significativamente su productividad para una cantidad de productos similar. De los resultados obtenidos se concluye que la concentración de nutrientes añadidos parece no influir en la productividad del proceso.

Dado que las concentraciones de solventes no superan las concentraciones de 20 g/L, establecidas como valores límite a partir de las cuales se produce la inhibición por producto del microorganismo *Clostridium spp.* (Maddox, 1989), se puede considerar que las fermentaciones finalizan por la degeneración vital de los microorganismos.

Finalmente y dado que desde un punto de vista económico, la fermentación ABE mejoraría empleando concentraciones de lactosa más elevadas, se realiza una comparación del grado de aprovechamiento de la lactosa para cada uno de los experimentos realizados, así como para los controles del proceso (Figura 5), con el objeto de determinar si se requiere una mayor concentración de lactosa inicial en el medio.

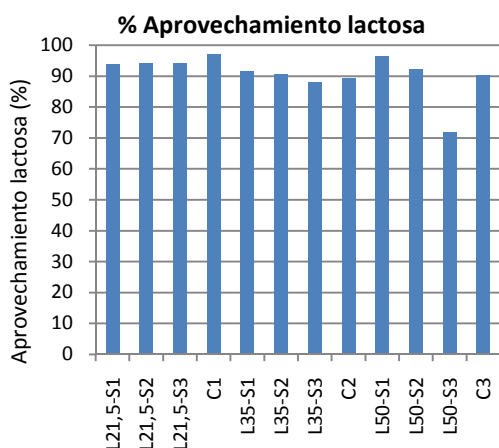


Figura 5. Comparación del grado de aprovechamiento de la lactosa.

El aprovechamiento de la lactosa ha sido muy elevada en todos los experimentos, superándose el 88 % de aprovechamiento en todos los ensayos menos en el experimento 9, en el que el porcentaje de aprovechamiento ha sido del 72 %, con una concentración de lactosa residual de 14,27 g/l. Estos resultados se corresponden con lo reportado por Qureshi y Maddox (2005), que indican que hasta concentraciones de 50-60 g/l de lactosa, la fermentación ABE se desarrolla adecuadamente. A concentraciones más elevadas, la fermentación se ralentiza de modo importante, debido a la elevada concentración de sales presentes en el medio asociada a una alta concentración de lactosa (Maddox et al., 1995), disminuyendo la productividad a 0.05 g/lh, cuando se trabaja con concentraciones de lactosa de 100 g/l. Por lo que el empleo de medios con mayor concentración de lactosa no favorece la fermentación ABE, por lo que para aumentar la viabilidad del proceso es necesario plantear sistemas continuo de alimentación y recuperación de solventes para que mejore el rendimiento y productividad del proceso (Qureshi y Maddox, 1995, 2005).

5. CONCLUSIONES

La suplementación de suero bruto desproteinizado con bajas concentraciones de todos los nutrientes

esenciales empleados en este estudio (extracto de levadura, cisteínas, sales minerales y medio buffer) aumenta la viabilidad de la fermentación ABE hasta cantidades de butanol y solventes ABE de 7,68 g/l y 10,18 g/l, respectivamente, cuando se trabaja con concentraciones iniciales de lactosa de 35 g/L. Si se aumenta la concentración inicial hasta 50 g/L, la cantidad de solventes aumenta hasta 9,07 g/l de butanol y 12,44 g/l de ABE. Aumentando la cantidad de butanol producido un 78 %, respecto al empleo de suero bruto no suplementado y en al menos un 29 % respecto a los controles con medio sintético.

El mejor rendimiento y productividad de la fermentación ABE en discontinuo con *C. beijerinckii* 508 T empleando suero bruto suplementado como sustrato, ha sido de 0,33 g_{ABE}/g_{lactosa}, con 0,14 g/lh de butanol, trabajando con sustratos con una concentración inicial de lactosa de 35 g/l y una concentración de nutrientes suplementarios del 25 %. Valores superiores a los obtenidos por la misma cepa empleando glucosa sintética como sustrato, empleando mayores tiempos de reacción. Por lo que, la adición de estos nutrientes contribuye a disminuir la velocidad de reacción y aumenta el aprovechamiento de la lactosa.

Del estudio se concluye que el suero bruto desproteinizado y enriquecido con bajas concentraciones de nutrientes es una materia prima viable para su empleo como sustrato en la fermentación ABE, tanto desde un punto de vista económico como de sostenibilidad ambiental. Al obtenerse concentraciones de solventes y rendimientos similares a los obtenidos con otros sustratos ricos en glucosa y de mayor coste (melazas o cereales) se reduce el coste del proceso, a la vez se valoriza un residuo agroalimentario altamente contaminante.

En procesos discontinuos, mejorar el proceso de fermentación ABE será complicado, por lo que en próximos trabajos será necesario plantear sistemas de operación en continuo (con inmovilización bacteriana), empleando como sustrato el suero bruto suplementado con nutrientes esenciales.

Agradecimientos

Se quiere agradecer al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) la posibilidad de realizar este trabajo de investigación, financiando todas las actividades realizadas en el mismo. Asimismo, se quiere agradecer a todo el personal del Centro de Biocombustibles y Bioproductos su contribución para el desarrollo de este trabajo.



Referencias

- Cascone, R. 2008. Biobutanol – a replacement for bioethanol? *Chemical Engineering Progress*, **104**, S4–S9.
- Chen, H.C., Zall, R.R. 1982. Continuous fermentation of whey into alcohol using an attached film expanded bed reactor process. *Process Biochemistry*, **17**, 20–25.
- Dürre, P., Bahl, H. 1996. Microbial Production of Acetone/Butanol/Isopropanol, in *Biotechnology: Products of Primary Metabolism*, Volume 6, Second Edition (eds H.-J. Rehm and G. Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527620883.ch6
- Ennis, B.M., Maddox, I.S. 1987. The effect of pH and lactose concentration on solvent production from whey permeates using *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 329–334.
- Ennis, B.M., Marshall, C.T., Maddox, I.S., Paterson, A.H.J. 1986. Continuous product recovery by in-situ gas stripping/condensation during solvent production from whey permeates using *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Letters*, **8**, 725–730.
- Ennis, B.M., Gutierrez, N.A., Maddox, I.S. 1986. The acetone–butanol–ethanol fermentation: a current assessment. *Process Biochemistry*, **21**, 131–147.
- Ennis, B.M., Maddox I.S. 1986. Use of *Clostridium acetobutylicum* P262 for production of solvents from whey permeates. *Biotechnology Letters*, **7**, 503–508.
- Ergüder, T.H., Tezel, U., Güven, E., Demirer, G.N. 2001. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Management*, **21** (7), 643–650.
- Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2013. Microbial production of a biofuel (acetone-butanol-ethanol) in a continuous bioreactor: impact of bleed and simultaneous product removal. *Bioprocess Biosystem Engineering*, **36**, 109–116.
- Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2004. Butanol fermentation research: Upstream and downstream manipulations. *Chemical Record*, **4** (5), 305–314.
- Foda, M., Dong, H., Li, Y. 2010. Study the suitability of cheese whey for bio-Butanol production by clostridia. *Journal of American Science*, **6** (8), 39–46.
- García, V., Pakkila, J., Ojamo, H., Muurinen, E., Keiski, R.L. 2011. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency?. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15**, 964–980.
- Guimaraes, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L. 2010. Research review paper: fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnological Advances*, **28** (3), 375–384.
- Jones, D.T., Woods, D.R. 1986. Acetone–butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, **50**, 484–524.
- Jones, R.A., Tezel, F.H., Thibault, J., Tolan, J.S. 2007. Bio-ethanol production to be blended with gasoline: Improvements in energy use by adsorption. *International Journal of Energy Research*, **31** (15), 1517–1531.
- Kosikowski, F.V. 1979. Whey utilization and whey products. *Journal of dairy Science*, **62**, 1149–1160.
- Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J., Jun, K.S. 2008. Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, **101**, 209–228.
- Linden, J.C., Moreira, A.R., Lenz, T.G. 1986. Acetone and butanol. In *Comprehensive biotechnology. The principles of biotechnology: engineering consideration*. Second Edition (Eds. Cooney C.L. and Humphrey A.E.), Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- Maddox, I.S., Qureshi, N., Roberts, T.K. 1995. Production of acetone–butanol–ethanol from concentrated substrates using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation–product removal process. *Process Biochemistry*, **30**, 209–215.
- Maddox, I.S. 1989. The acetone–butanol–ethanol fermentation: recent progress in technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **7**, 189–220.
- Maddox, I.S. 1980. Production of n–butanol from whey filtrate using *Clostridium acetobutylicum* NCIB 2951. *Biotechnology Letters*, **2**, 493–498.
- Madihah, M.S., Ariff, A.B., Sahaid, K.M., Suraini, A.A., Karim M.I.A. 2001. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**, 567–576.
- Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente (MAGRAMA). 2013. *Estadística Láctea Anual*. Madrid: Magrama [sitio web] [Consulta: 01 agosto 2013]. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/estadistica-industrias-lacteas/estadistica-lactea-anual/default.aspx>
- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., Dalai, A.K. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Review*, **14**, 578–597.
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M.E., Marzocchella, A., Salatino, P. 2012. Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*- Assessment of energetic and products yields of the acidogenesis. *Enzyme and Microbial Technology*, **50**, 165–172.
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M.E., Marzocchella, A., Salatino, P. 2011. Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*- Assessment of acidogenesis kinetics. *Bioresource Technology*, **102**, 1608–1614.
- Napoli, F., Olivieri, G., Marzocchella, A., Russo, M.E., Salatino, P. 2010. Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a continuous packed bed reactor. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, **37**, 603–608.
- Napoli, F. 2009. Development of an integrated process for butanol production. Dottorato in Scienze Biotechnologiche-XXII ciclo Indirizzo Biotechnologie Industriali. University of Napoli Federico II.
- Organisation for Economic Co-operation and Development *Food and Agriculture Organization* of the United Nations. 2013. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2013–2022 Database*, [sitio web] [Consulta: 01 agosto 2013]. Disponible en: <http://http://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?QueryId=48183&v=0000&vf=0&i=&il=&lang=en/>
- Pickett, J., Anderson, D., Bowles, D., Bridgwater, T., Jarvis, P., Mortimer, N., Poliakov, M., Woods, J. 2008. Sustainable biofuels: prospects and challenges. London: The Royal Society. ISBN 978 0 85403 662 2.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. 2012. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, **110**, 48–68.
- Qureshi, N., Maddox, I.S. 2005. Reduction in butanol inhibition by perstraction: Utilization of concentrated lactose/whey permeate by *Clostridium acetobutylicum* to enhance butanol fermentation economics. *Food and Bioprocess Processing*, **83**, 43–52.
- Qureshi, N., Lai, L.L., Balschek, H.P. 2004. Scale-up of a high productivity continuous biofilm reactor to produce butanol by absorbed cells of *Clostridium beijerinckii*. *Transcription IChemE, Part C, Food and Bioproduct Processing*, **82**, 164–173.
- Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2000. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renewable Energy*, **22**, 557–564.
- Qureshi, N., Blaschek, H.P. 1999. Butanol recovery from model solution/fermentation broth by pervaporation: evaluation of membrane performance. *Biomass and Bioenergy*, **17**, 175–184.



- Qureshi, N., Blaschek, H.P. 1999. Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) by a hyper–producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and recovery by pervaporation. *Biotechnology Progress*, **15**, 594–602.
- Qureshi, N., Maddox, I.S. 1995. Continuous production of acetone–butanol–ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid–liquid extraction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**, 185–189.
- Qureshi, N., Maddox, I.S. 1992. Application of novel technology to the ABE fermentation process: An economic analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **34** (35), 441–448.
- Qureshi, N., Maddox, I.S. 1991. Integration of continuous production and recovery of solvents from whey permeate: use of immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* in fluidized bed bioreactor coupled with gas stripping. *Bioprocess Engineering*, **6**, 63–69.
- Qureshi, N., Maddox, I.S. 1988. Reactor design for ABE fermentation using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. *Bioprocess Engineering*, **3**, 69–72.
- Qureshi, N., Maddox, I.S. 1987. Continuous solvent production from whey permeate using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. *Enzyme Microbial Technology*, **9**, 668–671.
- Raganati, F., Olivieri, G., Procentese, A., Russo, M.E., Salatino, P., Marzocchella, A. 2013. Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. *Bioresource Technology*, **138**, 259–265.
- Schoutens, G.H., Nieuwenhuizen, M.C.H., Kossen, N.W.F. 1985. Continuous butanol production from whey permeates with immobilized *Clostridium beijerinckii* LMD 27.6. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **21**, 282–286.
- Sorensen, B. 2008. A sustainable energy future: Construction of demand and renewable energy supply scenarios. *International Journal of Energy Research*, **32**, 436–470.
- Voget, C.E., Mignone, C.F., Ertola, R. J. 1989. Influence of temperature on solvents production from whey. *Biotechnology Letters*, **7**, 607–610.
- Welsh, F.W., Veliky, I.A. 1984. Production of acetone butanol from acid whey. *Biotechnology Letters*, **6**, 61–64.