



---

**Universidad de Valladolid**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA INDUSTRIAL**

TESIS DOCTORAL:

**Obtención de biobutanol a partir del residuo sólido de la industria cervecera. Estudio de alternativas y optimización de variables de proceso.**

Presentada por Pedro Enrique Plaza Lázaro  
para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:  
María Teresa García-Cubero  
Mónica Coca Sanz



## Agradecimientos

Agradezco especialmente a María Teresa García Cubero y Mónica Coca Sanz, mis tutoras, por la paciencia y la ayuda que me otorgaron durante estos años que he estado desarrollando el trabajo incluido en esta tesis. Sin su ayuda y orientación no habría sido posible llevar a buen término todo el trabajo realizado.

Agradezco también la ayuda recibida por todos los compañeros y compañeras que he tenido a lo largo de estos años en el laboratorio, de los cuales he aprendido a ser mejor investigador gracias a los conocimientos que me aportaron.

Agradezco a Jenifer todo el apoyo que me ha brindado durante la realización de esta tesis, ayudándome a continuar en los momentos difíciles y no rendirme.

Agradezco a mis padres todo su tesón y constancia para evitar que abandonase por el camino y llegar hasta donde he llegado a pesar de todas las dificultades encontradas, tanto por ellos como por mí.

Por último, agradezco al Ministerio de Economía y Competitividad por la ayuda recibida a través de los fondos recibidos por el proyecto CTQ2014-58777-R (incluidos fondos EU-FEDER). Agradecer a la Junta de Castilla y León la ayuda recibida a través de los fondos por los proyectos UIC 129, VA 010P17, CLU 2017-2109, incluyendo fondos EU-FEDER. Agradecer también a la Junta de Castilla y León por el contrato predoctoral que me ha permitido llevar cabo el trabajo recogido en esta tesis doctoral (Convocatoria: Orden de 18 de diciembre de 2017 de la Consejería de Educación; Resolución: Orden EDU/574/2018 de 28 de mayo).



# Índice

Resumen .....	11
Introducción .....	17
1.1 Biocombustibles.....	22
1.2 Biomasa.....	24
1.3 Estructura de los materiales lignocelulósicos.....	27
1.3.1 Celulosa.....	27
1.3.2 Hemicelulosa.....	27
1.3.3 Lignina .....	27
1.3.4 Estructura interna .....	28
1.3.5 Otros componentes .....	29
1.3.6 Bagazo de cerveza.....	29
1.4 Proceso de producción de biobutanol a partir de residuos lignocelulósicos.....	31
1.5 Etapa de pretratamiento .....	31
1.6 Hidrólisis enzimática .....	35
1.6.1 Enzimas .....	35
1.6.2 Hidrólisis enzimática con alta carga de sólidos .....	36
1.7 Detoxificación .....	37
1.7.1 Procesos de detoxificación .....	38
1.8 Proceso de fermentación ABE .....	40
1.8.1 <i>Clostridium beijerinckii</i> .....	42
1.9 Separación y purificación de solventes .....	44
1.9.1 Procesos de separación no integrados con la fermentación .....	45
1.9.2 Procesos integrados de fermentación y separación. ....	46
1.10 Bibliografía .....	50
Justificación, objetivos y desarrollo experimental .....	65
2.1 Justificación.....	67
2.2 Objetivos. ....	68
2.3 Desarrollo experimental. ....	69
Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by <i>Clostridium beijerinckii</i> ..	73

Efficient use of brewer's spent grain hydrolysates in ABE fermentation by <i>Clostridium beijerinckii</i> . Effect of high solid loads in the enzymatic hydrolysis.....	79
Exploring the use of high solid loadings in enzymatic hydrolysis to improve biobutanol production from brewers' spent grains.....	85
Bioprocess intensification for acetone-butanol-ethanol fermentation from brewer's spent grain: fed-batch strategies coupled with <i>in-situ</i> gas stripping .....	91
Conclusiones .....	97
Anexos.....	105
Asistencia a congresos .....	107
Publicaciones.....	108

## Índice de figuras

Figura 1.1: Evolución de las emisiones mundiales de CO <sub>2</sub> entre 1757 y 2017. (Sevilla, 2020)	19
Figura 1.2: Evolución del consumo mundial de energía entre 1993 y 2018 .....	20
Figura 1.3: Evolución del precio del petróleo entre 1960 y 2018 (Sevilla, 2020).....	21
Figura 1.4: Porcentaje de producción de biocombustibles mundial. (Global status report 2018 Ren21, 2019).....	23
Figura 1.5: Componentes de la pared celular. A- Celulosa; B- Hemicelulosa (Heldt & Piechulla, 2011); C- Compuestos de la lignina (Lourenço & Pereira, 2017). .....	28
Figura 1.6: Estructura material lignocelulósico (Yan et al, 2015).....	29
Figura 1.7: Diagrama de bloques del proceso de producción del biobutanol. ....	31
Figura 1.8: Efecto del pretratamiento en la estructura del material lignocelulósico (Zhao et al., 2012).....	32
Figura 1.9: Mecanismo de actuación de las celulasas (Oliva, 2003). ....	35
Figura 1.10: Ruta metabólica de <i>Clostridium beijerinckii</i> (Buehler & Mesbah, 2016).....	42
Figura 1.11: Técnicas de separación y consumo energético. van Wyk et al., 2018; Xue et al., 2013; Veza et al., 2021. ....	49
Figura 2.1: Objetivos principales de la tesis y correspondencia con capítulos. ....	70

## Índice de tablas

Tabla 1.1: Biocombustibles; generación, ventajas y desventajas asociadas. ....	22
Tabla 1.2: Propiedades físicas de distintos tipos de combustibles.....	24
Tabla 1.3: Suministro de energía a partir de fuentes renovables a nivel mundial. (Adaptada de World Bioenergy Association, 2019).....	25
Tabla 1.4: Composición de diversos materiales lignocelulósicos. ....	26
Tabla 1.5: Variabilidad en la composición del bagazo de cerveza.....	30
Tabla 1.6: Pretratamiento de biomasa lignocelulósica: clasificación, condiciones de operación y principales efectos. ....	33
Tabla 1.7: Ventajas y desventajas de la hidrólisis enzimática de alta carga de sólidos. ....	37
Tabla 1.8: Inhibidores: origen y efectos inhibitorios en la fermentación.....	38
Tabla 1.9: Procesos de detoxificación para la eliminación de compuestos inhibidores en hidrolizados. Principios de funcionamiento y efectos.....	39
Tabla 1.10: Cepas de microorganismos utilizadas en la fermentación ABE batch, productividades y rendimientos (Adaptada de Nanda et al., 2017).....	41
Tabla 1.11: Procesos de separación integrables con la etapa de fermentación ABE (adaptada de Staggs & Nielsen, 2015). ....	48





# Resumen

La contaminación generada por los procesos industriales y el transporte es uno de los principales problemas de la sociedad actual. El consumo de energía y las emisiones de gases de efecto invernadero crecen anualmente a pesar de los esfuerzos por parte de gobiernos y organismos reguladores para reducir este aumento. En Europa, el transporte genera anualmente el 30% de los gases de efecto invernadero, representando el CO<sub>2</sub> más del 78% de ellos. Otro de los grandes problemas es el aumento y la fluctuación del coste de las fuentes de energía, especialmente del petróleo y sus derivados. El incremento en costes y en gases contaminantes ha favorecido la recuperación de métodos de producción de combustibles renovables empleados años atrás. Uno de estos métodos es la fermentación de materia vegetal para la obtención de biocombustibles líquidos como es el butanol, obtenido mediante procesos de fermentación anaerobia, con bacterias del género *Clostridium*.

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado bagazo de cerveza como fuente de azúcares que pueden ser fermentados, para la obtención de butanol. La producción mundial anual de bagazo de cerveza se estima en 39 millones de toneladas, de las cuales 0,7 Mt/año se producen en España. Una de sus ventajas es que se encuentra disponible a lo largo del año y en gran cantidad, al contrario de los cultivos convencionales. El bagazo de cerveza es un material lignocelulósico tradicionalmente utilizado como alimento para ganado vacuno y otros rumiantes, debido a su alto contenido en carbohidratos y proteínas y su bajo coste. El alto contenido en celulosa y hemicelulosa (en torno al 50% m/m MS) lo hace atractivo para la producción de biocombustibles como hidrógeno, biogás, etanol y butanol mediante procesos de fermentación.

El elevado contenido en lignina del bagazo de cerveza (entre un 12 y un 28% m/m MS) hace necesario un proceso de pretratamiento para modificar la estructura lignocelulósica, permitiendo a las enzimas acceder a la celulosa y hemicelulosa durante el proceso de sacarificación. Una vez llevado a cabo el pretratamiento, es necesario realizar una hidrólisis enzimática para transformar las cadenas de celulosa en monosacáridos que puedan ser metabolizados por el microorganismo.

Durante la realización del Trabajo de Fin de Máster con título “Valorización de bagazo de la industria cervecera mediante su transformación en biocombustibles avanzados: biobutanol.” se determinaron las condiciones idóneas para el pretratamiento del bagazo de cerveza. Se realizaron experimentos en el intervalo comprendido entre pH 1 y 12, a 121°C, 30 minutos de reacción y 5% m/m MS de carga de sólidos. A pH 1 se alcanzaron recuperaciones de monosacáridos conjunta de pretratamiento e hidrólisis enzimática del 87,7% con un consumo de catalizador de 0,05 g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/g MS. A pH 12 se alcanzó una recuperación de monosacáridos conjunta de pretratamiento e hidrólisis enzimática del 38,4% con un consumo de catalizador de 0,03 g de NaOH/g MS. Con estos resultados se decidió establecer como condiciones de pretratamiento pH 1, 121°C y 30 minutos debido a que permite obtener unas recuperaciones de monosacáridos altas a la vez que se mantiene la producción de inhibidores en niveles bajos.

En esta Tesis Doctoral, se estudió, en primer lugar, la fermentación a partir de los líquidos obtenidos en el pretratamiento ácido a pH 1 y en la posterior hidrólisis enzimática del bagazo pretratado. Como se comentó anteriormente, se realizó el pretratamiento a pH 1, utilizando cargas de sólidos en el pretratamiento del 5 y el 15% m/m MS para determinar la influencia de este parámetro sobre la recuperación de monosacáridos y la posterior fermentación. En la hidrólisis enzimática (realizada al 10% m/m MS) se utilizó bagazo pretratado lavado y sin lavar para determinar la influencia de este proceso de detoxificación sobre la producción de butanol. El lavado del bagazo pretratado reduce la concentración de inhibidores, lo que tuvo como consecuencia la obtención de mayores concentraciones de butanol al fermentar los hidrolizados enzimáticos, observándose un aumento de la concentración de butanol de 4 g/L a 6 g/L. El líquido de pretratamiento obtenido con una carga de sólidos del 5% presentó valores bajos de monosacáridos (14 g/L aprox.), lo que dio lugar a concentraciones de butanol bajas (2,5 g/L aprox.). El líquido de pretratamiento obtenido al 15% de carga de sólidos presentó valores altos de monosacáridos (43 g/L aprox.) lo que permitió obtener concentraciones de solventes altos (7 g de butanol/L aprox.). El pretratamiento al 15% m/m MS de carga de sólidos permitió liberar grandes cantidades de azúcares tanto en los líquidos de pretratamiento como en la posterior hidrólisis enzimática dando lugar a rendimientos globales de 75 g de butanol/kg bagazo y 95 g ABE/kg bagazo. En este capítulo se obtuvieron dos conclusiones principales: que el bagazo de cerveza es un sustrato adecuado para la producción de butanol y que para la obtención de concentraciones altas de monosacáridos es necesario realizar el pretratamiento e hidrólisis enzimática con altas cargas de sólidos. Una de las consecuencias de estos procesos que usan altas carga de sólidos es la producción de compuestos inhibidores que afectan de manera negativa al proceso de fermentación.

En segundo lugar, se exploró la influencia de la carga de sólidos en la etapa de hidrólisis enzimática en la liberación de azúcares y en la producción de compuestos inhibidores además de la influencia de varios procesos de detoxificación sobre la posterior etapa de fermentación. En estos experimentos se utilizó una carga de sólidos en el pretratamiento del 15% m/m MS y una carga de sólidos en hidrólisis enzimática del 10, 15 y 20% m/m MS. La detoxificación fue llevada a cabo con óxido de calcio (overliming), carbón activo o una combinación secuencial de ambos procesos. Al fermentar los líquidos de pretratamiento, las concentraciones de butanol y ABE más altas se obtuvieron al llevar a cabo la detoxificación con carbón activo (11,5±0,1 g/L butanol, 16,2±0,2 g/L ABE, consumo de azúcares del 95,1%). Respecto a los hidrolizados enzimáticos se obtuvieron resultados diversos. Utilizando una concentración del 10% m/m MS de carga de sólidos no se observaron diferencias entre las alternativas analizadas, concluyendo que la concentración de inhibidores presentes es lo suficientemente baja como para que no sea necesario un proceso de detoxificación. Con una concentración del 15% m/m MS de carga de sólidos fue necesario detoxificar, obteniéndose los mejores resultados cuando se empleó el proceso de detoxificación secuencial (11,6±0,2 g/L butanol, 18,3±0,3 g/L ABE, consumo de azúcares del 89,6%). Finalmente, la operación con un 20% m/m MS de carga de sólidos no produjo butanol en ningún caso, indicando que la concentración de compuestos inhibidores es muy elevada, siendo necesario procesos de detoxificación más

intensos para conseguir eliminar inhibidores y producir butanol. Los mejores resultados (líquidos de pretratamiento detoxificados con carbón activo e hidrolizados enzimáticos detoxificados secuencialmente, obtenidos con una concentración de biomasa del 15% m/m MS) arrojaron una producción global de 99,9 g de butanol/kg bagazo y 146,5 g ABE/ kg bagazo, mejorando un 40% los resultados alcanzados sin llevar a cabo procesos de detoxificación.

Con los resultados obtenidos, se decidió llevar a cabo la optimización de la etapa de hidrólisis enzimática. Para ello, se realizó un diseño de experimentos considerando como principales factores la carga de sólidos (15 -30% m/m MS) y la carga de enzimas (10 -20 FPU/g MS), con el fin de maximizar la liberación de monosacáridos y minimizar la generación de compuestos fenólicos. Se llevó a cabo un pretratamiento ácido diluido previo a la hidrólisis enzimática en las condiciones previamente establecidas. El óptimo encontrado (carga de sólidos del 28,1% m/m MS y carga de enzimas de 15,4 FPU/g MS) permitió alcanzar concentraciones de 47,0 g glucosa/L, 16,8 g xilosa/L y 1,2 g fenólicos/L. Los hidrolizados enzimáticos fueron sometidos posteriormente a un proceso de fermentación sin detoxificar y después de detoxificación con carbón activo. Las concentraciones de compuestos fenólicos obtenidas fueron moderadas, con lo que en este caso no se observaron diferencias al detoxificar los hidrolizados. Se obtuvieron producciones máximas de 31,0 g butanol/kg bagazo pretratado y 46,4 g ABE/kg bagazo pretratado.

Al finalizar el proceso de fermentación se obtiene un caldo en el que el biobutanol está diluido, haciendo necesario un proceso de separación para conseguir que tenga la pureza necesaria que requiere su comercialización. Tradicionalmente se han utilizado procesos de separación basados en destilación, que consume grandes cantidades de energía. En esta tesis doctoral se ha explorado una de las alternativas que consumen menos energía y que tiene una de las mejores perspectivas de implantación a escala industrial, el uso de procesos simultáneos de fermentación y recuperación mediante gas-stripping. La recuperación de solventes mediante gas-stripping integrado con la fermentación permite reducir la concentración de butanol en el reactor y evitar la inhibición por producto, a la vez que se obtienen condensados con altas concentraciones de butanol que permiten reducir los costes de separación posteriores al proceso. Si además se añade alimentación al proceso (fermentación en modo fed-batch), se consigue aumentar el tiempo de operación, así como la producción de solventes. Para la fermentación se utilizó como sustrato el hidrolizado enzimático de bagazo de cerveza pretratado, mientras que para alimentar el reactor se utilizaron medios modelo (disoluciones de glucosa, xilosa o una mezcla de ambas) así como el líquido de pretratamiento. Los medios modelo se alimentaron mediante pulsos mientras que el líquido de pretratamiento se alimentó de forma continua con el fin de integrar todas las corrientes obtenidas en el proceso. Ambas estrategias de alimentación permitieron incrementar la concentración de solventes, en comparación con la que se obtiene en el proceso de fermentación convencional en discontinuo (6 g/L de butanol en fermentación discontinua frente a concentraciones comprendidas entre 10,2 y 13,2 g/L de butanol acumulado para los experimentos fed-batch con stripping acoplado). Los rendimientos ( $Y_{but}$  entre 0,14 y 0,2,  $Y_{ABE}$  entre 0,20 y 0,29 g/g) y productividad ( $Q_{but}$  entre 0,08 y 0,11,  $Q_{ABE}$  entre 0,12 y 0,15 g/L·h) son similares a los obtenidos en un proceso batch, no observándose mejoras en estos parámetros. Los condensados del gas-stripping presentaron concentraciones

elevadas de solventes en todos los casos, pero la alimentación continua presentó unas concentraciones más estables que la alimentación por pulsos (65 g/L de media frente a 50 g/L de media para la alimentación por pulsos de glucosa), consumiéndose prácticamente la totalidad de los monosacáridos presentes en el reactor (99,1%). Esta estrategia permite aprovechar el líquido obtenido durante el pretratamiento ácido diluido del bagazo de cerveza, mediante su co-fermentación con los hidrolizados enzimáticos, lo que ayuda a reducir los costes de capital, al disminuir el número de fermentadores necesarios.

Como conclusión general de la Tesis Doctoral se puede afirmar que el bagazo de cerveza es un sustrato idóneo para la producción de biocombustibles de segunda generación, permitiendo obtener concentraciones de butanol elevadas mediante el uso de pretratamientos e hidólisis enzimáticas con altas cargas de sólidos. El uso de procesos integrados de fermentación y separación mediante gas-stripping aumentó la concentración de butanol en los caldos, lo que permite reducir los costes energéticos de purificación del butanol.





# Capítulo 1

---

## Introducción



La contaminación provocada por la actividad humana, y en especial por los procesos industriales y el transporte es uno de los mayores problemas actuales (Bespalov et al., 2016). El uso de combustibles fósiles provoca que la emisión de gases de efecto invernadero crezca anualmente (Figura 1.1) pese a los esfuerzos de gobiernos y organismos de regulación para disminuir esta tendencia (Iftikhar et al., 2016). La emisión de gases de efecto invernadero como el CO<sub>2</sub>, comenzó a aumentar desde la revolución industrial del siglo XIX, aunque el crecimiento se disparó a partir de la segunda mitad del siglo XX, llegando a unos valores en la actualidad que superan los 35000 Mt/a.

En el continente europeo, el transporte genera anualmente el 30% de los gases de efecto invernadero, representando el CO<sub>2</sub> más del 78% de ellos (Nocera & Cavallaro, 2016).

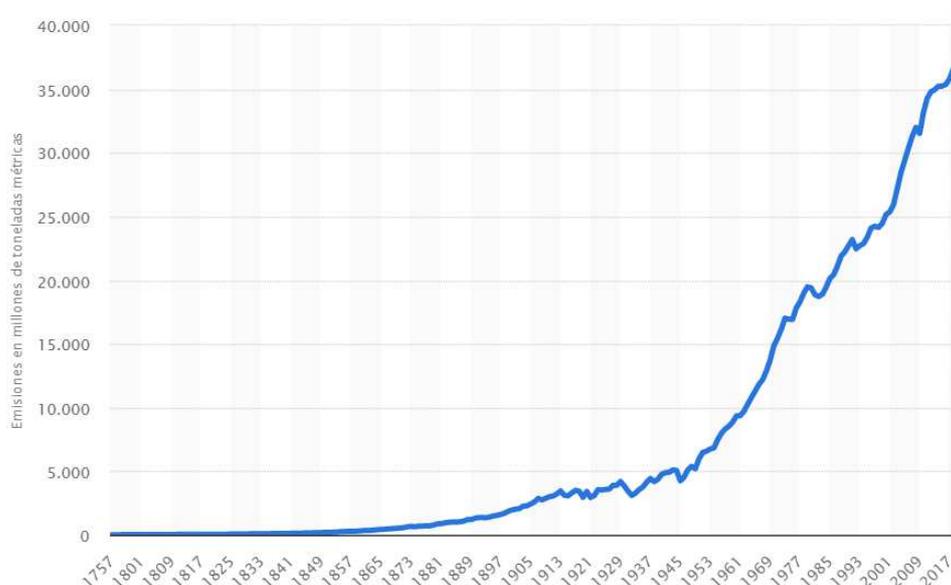


Figura 1.1: Evolución de las emisiones mundiales de CO<sub>2</sub> entre 1757 y 2017. (Sevilla, 2020)

Por otra parte, el consumo de energía sigue la misma tendencia que la emisión de gases de efecto invernadero, creciendo año tras año, especialmente la energía obtenida a partir de combustibles fósiles, representando alrededor del 85% (Figura 1.2). Entre los años 2012 y 2017 un aumento del 11,2% en el consumo de energía provocó un aumento del 12,5% en las emisiones de CO<sub>2</sub>. Como nota positiva, en los últimos años el consumo de energía procedente de fuentes renovables y no contaminantes ha aumentado hasta suponer alrededor del 10% del total a nivel mundial. En España en 2018 se generó un 38,4% de la energía a partir de fuentes renovables, siendo las más utilizadas la eólica (19%), la hidráulica (13,1%) y la solar fotovoltaica (3%) (Red Eléctrica de España, 2019).

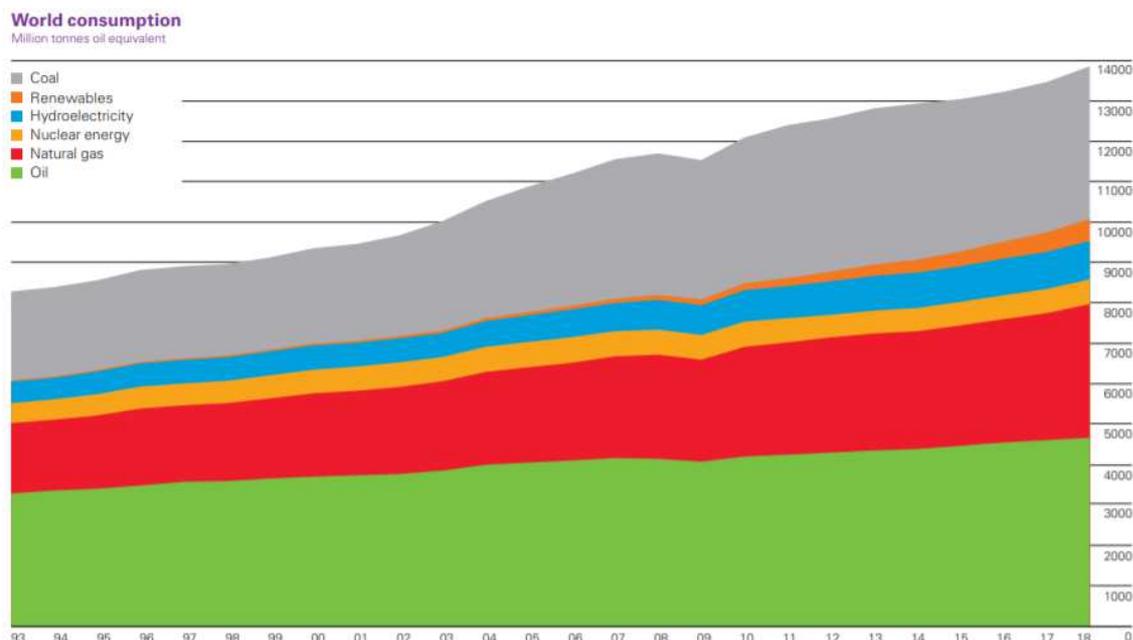


Figura 1.2: Evolución del consumo mundial de energía entre 1993 y 2018 (BP Statistical Review of World Energy, 2019).

El aumento y fluctuación del coste de las fuentes de energía, principalmente del petróleo (Figura 1.3) y sus derivados, es otro de los grandes problemas mundiales (Aguilera, 2014), ya que esto puede afectar directamente a la productividad, el stock de capital y el empleo de los países importadores de petróleo.

Un aumento del precio del petróleo puede provocar que el porcentaje de la producción que permanece en el país importador de petróleo disminuya, por lo que un aumento del precio del petróleo equivale a una reducción en la productividad de los dos factores productivos primarios. El stock de capital se puede ver también afectado por la variabilidad del precio del petróleo de manera que, a corto plazo, el aumento del coste puede llegar a provocar que plantas y maquinaria dejen de ser rentables. A largo plazo, un cambio permanente en el precio del petróleo acaba teniendo efectos sobre el nivel de equilibrio a largo plazo del stock de capital. Por último, el empleo también se ve afectado por todo lo comentado anteriormente, alterándose la oferta y demanda de trabajo, lo que da lugar a cambios en el nivel de la tasa de paro de equilibrio (Estrada & Hernández de Cos, 2009).

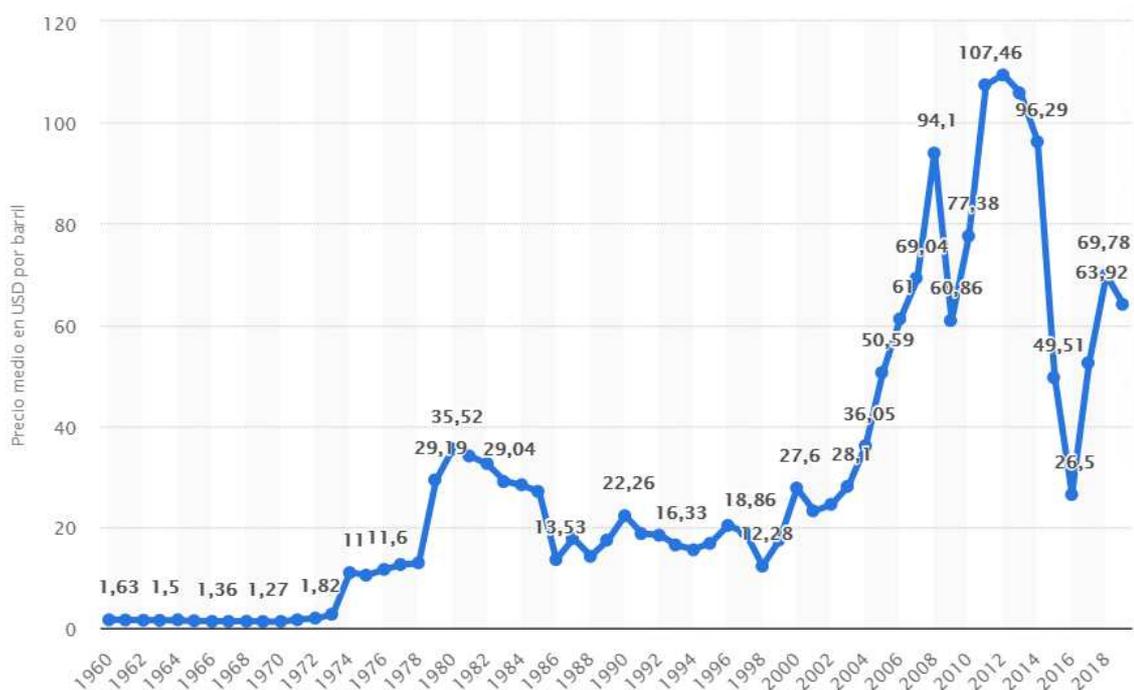


Figura 1.3: Evolución del precio del petróleo entre 1960 y 2018 (Sevilla, 2020).

Debido al incremento tanto en el coste de fuentes de energía no renovables como en las emisiones de gases contaminantes, se han aprobado diferentes disposiciones normativas, que incentivan el uso de fuentes renovables y de biocombustibles. En la Directiva 2009/28/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables y por la que se modifican y se derogan las Directivas 2001/77/CE y 2003/30/CE, se establece que para el año 2020, el porcentaje de biocarburantes producidos a partir de cereales y otros cultivos ricos en almidón, azúcares, de oleaginosas y de otros cultivos plantados en tierras agrícolas como cultivos principales con fines energéticos no podrá superar el 7% en los estados miembros.

La Directiva (UE) 2015/1513 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de septiembre de 2015 por la que se modifica la Directiva 98/70/CE, relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo y la Directiva 2009/28/CE, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables, especifica que la energía global deberá proceder en un 20% de fuentes renovables y la energía para el transporte deberá proceder en un 10% de fuentes renovables en el año 2020. Esta directiva también establece que es necesario fomentar la investigación, el desarrollo y la producción de biocarburantes avanzados que no compiten con los cultivos alimentarios y que contribuyen a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, siendo los biocarburantes avanzados aquellos producidos a partir de materias primas lignocelulósicas (residuos agrícolas, forestales o industriales), biomasa herbácea, algas y residuos.

Todo ello ha derivado en la búsqueda de nuevas materias primas renovables que no compitan con alimentación, y en la mejora y optimización de procesos a partir de los cuales poder generar energía a un bajo coste en competencia con el empleo de los combustibles fósiles. La biomasa lignocelulósica se configura, en este sentido, como una materia prima

atractiva por su composición y bajo coste para la producción de biocombustibles (Saladini et al., 2016).

## 1.1 Biocombustibles

Los biocombustibles son sustancias químicas con un alto contenido energético, generados a través de procesos biológicos o derivados de biomasa procedente de microalgas, plantas y bacterias (Rodionova et al, 2017). Pueden encontrarse en estado sólido, líquido o gaseoso (biohidrógeno, biometano, bioetanol, biobutanol, biodiésel) y, pueden ser utilizados para transporte, producción de calor o generación de electricidad. En transporte, comúnmente se mezclan con otros combustibles fósiles, en concentraciones entre el 5 y el 85% (Alves et al., 2015) dependiendo del motor, pero también pueden ser usados puros en motores modificados.

En la Tabla 1.1 se encuentran clasificados los diferentes tipos de biocombustibles, atendiendo al tipo de biomasa utilizada en su fabricación.

Tabla 1.1: Biocombustibles; generación, ventajas y desventajas asociadas.

Biocombustibles	Materia prima	Ventajas	Desventajas
Primera generación	Biomasa fácilmente fermentable	Proceso de producción simple Competitivo económicamente	Uso de productos de alimentación humana y animal Desabastecimiento de alimentos
Segunda generación	Biomasa no usada en alimentación	Uso de residuos Materias primas baratas	Proceso de producción complejo Coste de reactivos
Tercera generación	Biomasa algal	Mayores rendimientos de biomasa por ud. de superficie Limpieza de aguas residuales	Gran consumo de agua Grandes superficies
Cuarta generación	Biomasa algal modificada genéticamente	Mayores rendimientos que los combustibles 3G Limpieza de aguas residuales	Modificación genética de algas Gran consumo de agua Grandes superficies

La producción de biocombustibles de primera generación es simple y competitiva desde un punto de vista económico, pero puede generar problemas como el aumento del precio de alimentos de primera necesidad como el trigo, cebada y maíz (los principales cultivos a nivel mundial) y el cambio del uso del terreno cultivable, lo que podría tener graves consecuencias, especialmente en países en desarrollo. En el año 2019, el 93% del bioetanol de primera generación fue producido a partir de maíz, mientras que el 82% del biodiésel se obtuvo a partir de aceites vegetales (CNMC, 2020).

Los biocombustibles de segunda generación ofrecen la gran ventaja de utilizar como materia prima materiales que no se utilizan en alimentación y que muchas veces son considerados como residuos. Los procesos de obtención de biocombustibles a partir de estos materiales son más costosos que los de primera generación ya que los azúcares

potencialmente fermentables no son fácilmente accesibles por los microorganismos, debiendo hacerse un pretratamiento e hidrólisis enzimática para liberarlos.

Los biocombustibles de tercera y cuarta generación, presentan algunas ventajas frente a los otros tipos de biocombustibles, alcanzando mayores rendimientos de biomasa por unidad de superficie que los cultivos terrestres, crecen en zonas no cultivables y se pueden producir utilizando aguas residuales, limpiando estas aguas a la vez que crecen (Correa et al., 2017). Al estar generados a partir de biomasa algal, requieren grandes superficies para su producción, así como un consumo elevado de agua, lo que complica su producción en regiones sometidas a un grave estrés hídrico. A los combustibles de cuarta generación habría que añadirle las dificultades de modificar genéticamente las algas, algo que no es sencillo y tiene unos costes asociados (Abdullah et al., 2019; Tandon & Jin, 2017).

Como consecuencia de todo lo comentado anteriormente, los biocombustibles de segunda generación son una alternativa atractiva, desde el punto de vista tanto ético como técnico, utilizando materiales considerados como residuos, evitando el uso de cultivos empleados en alimentación, así como el consumo de grandes cantidades de agua.

Los biocombustibles más producidos a nivel mundial son etanol, biodiésel (metil éster de ácidos grasos o combustibles FAME) y combustibles producidos del tratamiento de grasas animales y aceites vegetales con hidrógeno (aceites vegetales hidrotratados o HVO; ácidos grasos y ésteres hidrotratados o HEFA). Alrededor del 65% de la producción de biocombustibles corresponde a etanol, un 29% a biodiesel y un 6% a combustibles HVO/HEFA, como se desprende de los datos incluidos en la Figura 1.4. El uso de biometano, aunque crece rápidamente, sólo representa menos del 1% del total (Global status report 2018 Ren21, 2019).

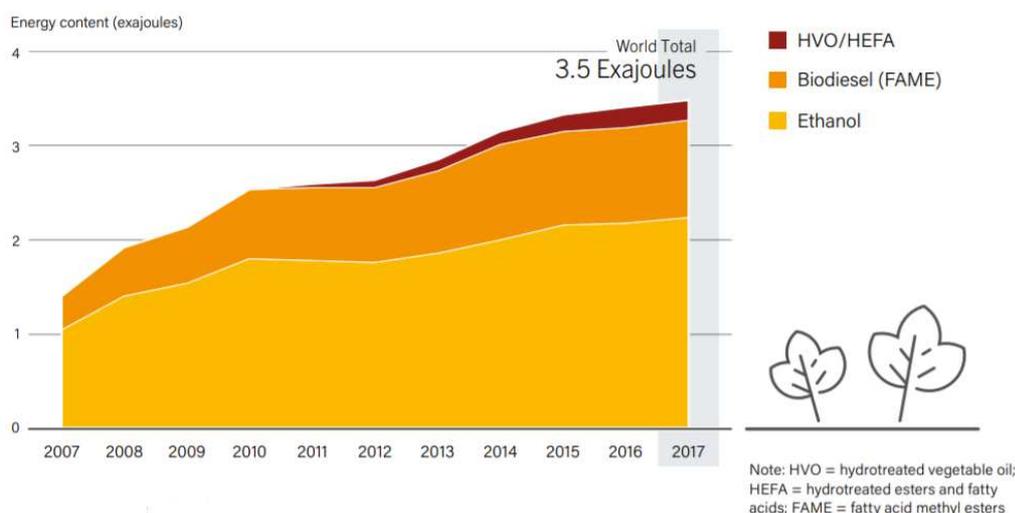


Figura 1.4: Porcentaje de producción de biocombustibles mundial. (Global status report 2018 Ren21, 2019).

Aunque los biocombustibles más empleados son los comentados anteriormente, hay otros biocombustibles en desarrollo que pueden dar unos resultados iguales o mejores, siendo uno de estos el butanol. El butanol presenta ciertas ventajas sobre el etanol, como un mayor poder energético (29,2 vs 21 MJ/L) siendo similar al de la gasolina (32 MJ/L), como se puede

observar en la Tabla 1.2. Otras ventajas son una menor corrosividad, menor volatilidad, menor miscibilidad con el agua y posibilidad de ser transportado a través de la red de tuberías existente (Bellido et al., 2014). Otra de las ventajas que posee es el poder ser utilizado en motores tipo Otto y Diesel, ya sea en su forma pura o mezclado con otros combustibles (gasolina, gasoil, hidrógeno, metanol, etanol, isopropanol, acetona) (Zhen et al, 2020). El butanol también es utilizado como producto intermedio y solvente en industrias de construcción, automotriz, textil, agroquímica y farmacéutica.

El mercado del butanol se estimó en 4180 millones de USD en 2017, con una previsión de 5580 millones de USD para el año 2022 (PRNewsWire, 2018).

Tabla 1.2: Propiedades físicas de distintos tipos de combustibles.

	Metanol	Etanol	Butanol	Biodiesel	Gasolina (E10)	Gasoil
Poder energético (MJ/L)	16	21	29,2	37,3	32	35,9
Presión de vapor (25°C, mmHg)	127,2	59,3	7,5	1,01	525,1	3,04
Miscibilidad agua	total	total	79 g/L	Insignificante	4500 ppm	Insignificante
Punto ebullición (°C)	64,7	78	118	130	33-210	139-385
Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	792	789	810	880	720	870

La producción de butanol se lleva a cabo mediante síntesis química a partir de productos obtenidos del petróleo o mediante procesos de fermentación a partir de sustratos fácilmente fermentables.

El butanol petroquímico se genera mayoritariamente a través del proceso de oxosíntesis, en el que el propileno reacciona con monóxido de carbono e hidrógeno formando una mezcla de n- e iso-butiraldehído, en ratios dependientes del catalizador y de las condiciones de operación. Posteriormente, estos dos isómeros son separados e hidrogenados para formar, como principales productos, el n- e iso-butanol (Informe anual 2013 Abengoa, 2014). Este proceso se lleva a cabo en varias fases, con temperaturas y presiones que varían entre los 80 y 200°C y 20 y 30 Mpa (Kazemi Shariat Panahi et al, 2019).

El butanol también puede obtenerse mediante transformaciones bioquímicas. El proceso de fermentación conocido como fermentación ABE (acetona-butanol-etanol), utiliza principalmente materias primas fermentables procedentes de cultivos alimentarios o residuos lignocelulósicos de bajo coste procedentes de procesos industriales y agrícolas, y emplea microorganismos del género *Clostridium*. Este proceso se comentará con mayor detalle en apartados posteriores.

## 1.2 Biomasa

La biomasa es el conjunto de la materia orgánica, de origen vegetal o animal, y los materiales que proceden de su transformación natural o artificial que pueden ser utilizables como fuente de energía. Se pueden agrupar principalmente en agrícolas y forestales, aunque también se considera como biomasa los lodos de depuradora, así como la fracción orgánica

de los residuos sólidos municipales y otros residuos producidos en procesos industriales. La biomasa puede calificarse en varios tipos (The Earth Project, 2021):

- Biomasa natural, producida en los ecosistemas, incluyendo todas las plantas terrestres como pueden ser árboles, arbustos y pastos.
- Biomasa residual, generada por la actividad humana al utilizar la biomasa natural en diversas industrias. El uso de esta biomasa tiene ventajas asociadas como la reducción de la contaminación y del espacio utilizado en vertederos, y la generación de puestos de trabajo.
- Cultivos energéticos, que son cultivos dedicados a la generación de energía. Se utilizan especies vegetales de alta productividad y elevada resistencia a sequías y enfermedades, pero que no pueden ser utilizadas para alimentación.

La biomasa disponible en España se estima en 88 millones de toneladas, incluyendo restos forestales y agrícolas, masas forestales sin explotar y cultivos energéticos a implantar. A estas cifras hay que añadir 12 millones de toneladas de biomasa obtenida de residuos de industrias agroforestales (Plan de Energías Renovables 2011-2020).

La energía obtenida a partir de biomasa supone alrededor del 68% del total obtenido mediante energías renovables (Tabla 1.3), resaltando su importancia en la obtención de energía limpia.

Tabla 1.3: Suministro de energía a partir de fuentes renovables a nivel mundial. (Adaptada de World Bioenergy Association, 2019)

Año	Total (EJ)	Biomasa (EJ)	Hidroeléctrica (EJ)	Solar (EJ)	Viento (EJ)	Geotérmica (EJ)	Otras (EJ)
2000	54,7	42,8	9,43	0,21	0,11	2,19	0,002
2005	59,4	45,9	10,6	0,31	0,37	2,25	0,002
2010	68,2	51,2	12,4	0,77	1,23	2,61	0,002
2015	77,7	55,1	14,1	2,27	3,02	3,24	0,004
2016	80,5	56,5	14,6	2,6	3,45	3,37	0,004
2017	81,1	55,6	14,7	3,07	4,06	3,59	0,004

La biomasa lignocelulósica es la materia más abundante en la tierra. Al año se producen 170000 millones de toneladas mundialmente, de las cuales sólo se utilizan alrededor del 5% (Zhang et al., 2017). Este material está compuesto mayoritariamente por celulosa (polímero formado por cadenas lineales de glucosa), hemicelulosa (polímero ramificado formado por monosacáridos de cinco y seis carbonos) y lignina (polímero formado por compuestos aromáticos). También está formado por otros compuestos como proteínas, grasas y almidón.

Tabla 1.4: Composición de diversos materiales lignocelulósicos.

Tipo de biomasa	Especie	Glucano (% m/m MS)	Xilano (% m/m MS)	Arabinano (% m/m MS)	LAI (% m/m MS)	LAS (% m/m MS)	Referencia
Herbácea	<i>Pennisetum híbrida</i>	36,1±1,8	18,2±0,7	n.d.	18,9±0,2	2,0±0,4	Nan et al., 2019
	<i>Spartina alterniflora</i>	29,0±0,8	17,3±0,1	n.d.	18,2±0,1	2,1±0,0	Nan et al., 2019
	<i>Silvergrass chino</i>	36,3±0,2	17,7±0,1	n.d.	19,3±0,9	2,4±0,0	Nan et al., 2019
Residuo agrícola	Paja de trigo	33,8±1,7	18,6±0,9	n.d.	17,3±1,5	3,5±0,4	Bellido et al., 2014
	Racimos de cáscaras de fruta de aceite de palma	41,2±0,3	n.d.	n.d.	28,4±0,1	3,4±0,1	Purwandari et al., 2013
	Rastrojo de maíz	40,7±1,6	22,5±0,3	n.d.	20,2±0,5	1,5±0,3	Zhu et al., 2010
Residuo agroindustrial	Pulpa de remolacha	20,3±1,9	1,7±0,03	21,8±2,1	1,9±0,3	0,03±0,01	Bellido et al., 2015
	Bagazo de cerveza	23,1±2,8	15,5±1,0	7,4±0,3	14,1±0,4	4,9±1,0	Plaza et al., 2017
	Hueso de oliva	20,9±0,2	26,0±0,1	1,3±0,0	33,9±0,4	1,7±0,1	Padilla-Rascón et al., 2020
Residuo forestal	Poda de olivo	25,8±0,05	10,9±0,4	1,3±0,1	15,0±0,4	2,4±0,03	Fernandes-Klajn et al., 2018

LAI: Lignina ácida insoluble; LAS: Lignina ácida soluble. n.d.: no disponible.

Los materiales lignocelulósicos son idóneos para la producción de biocombustibles de segunda generación. Esta biomasa representa la mayor fracción de la materia vegetal. Algunos ejemplos de este material son los residuos agrícolas y forestales, los residuos celulósicos y la mayor parte de la fracción orgánica de los residuos municipales, industriales y vegetales, tanto herbáceos como leñosos, cultivados para la producción de biocombustibles (Kumar et al., 2020).

La composición en celulosa, hemicelulosa y lignina difiere entre los distintos materiales lignocelulósicos, como se indica en la Tabla 1.4. La proporción de carbohidratos entre distintas materias primas varía notablemente (36,7% para la poda de olivo y 63,2% para el rastrojo de maíz), siendo mayor en los residuos agrícolas y en la biomasa herbácea, al no haber sido sometidos a ningún proceso como los residuos agroindustriales. La proporción de lignina también varía enormemente entre materias primas, aunque sin observarse diferencias entre distintos tipos de residuos. (1,9% para la pulpa de remolacha y 35,6% para el hueso de oliva). Estas diferencias en la composición hacen que cada material necesite un enfoque distinto en el proceso de obtención de biocombustibles.

## 1.3 Estructura de los materiales lignocelulósicos

### 1.3.1 Celulosa

La celulosa forma parte de las paredes celulares y de los tejidos estructurales de los vegetales. Está formado por unidades de D-glucosa, unidas mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1,4) (Figura 1.5). La celulosa está compuesta de regiones amorfas y cristalinas (Heldt & Piechulla, 2011). Las regiones amorfas se hidrolizan más fácilmente que las cristalinas con el uso de enzimas. La celulosa cristalina forma microfibrillas, que son conjuntos paracrystalinos de varias decenas de cadenas unidas mediante enlaces de hidrógeno a lo largo de su longitud. Estos enlaces unen firmemente las cadenas, formando una estructura en forma de reja. Esto les proporciona una gran resistencia a la tracción y a la degradación, tanto química como biológica.

### 1.3.2 Hemicelulosa

Este heteropolímero tiene un peso molecular menor que la celulosa. Su estructura es ramificada, presentando cadenas laterales cortas formadas por distintos monosacáridos (Figura 1.5). Las cadenas de hemicelulosa contienen xilanos (arabinoxilanos y 4-O-metilglucuronoxilanos), galactomananos, glucomananos y xiloglucanos ( $\beta$ -D-glucanos con cadenas laterales) (Farhat et al., 2017) que a su vez están formados por diversos monosacáridos como D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-fucosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido glucurónico y otros. La hemicelulosa cubre las microfibrillas de celulosa, aunque también son suficientemente largas para cubrir la distancia entre éstas y unir las, formando una red. La hemicelulosa une la lignina y la celulosa, aportando rigidez a la red tridimensional formada por estos tres componentes (Shen & Sun, 2021).

### 1.3.3 Lignina

La lignina es el compuesto orgánico más abundante después de la celulosa y hemicelulosa, llegando a formar entre el 20 y el 30% de los tejidos vegetales. Los alcoholes coniferílico, sinapílico y p-cumarílico son sus principales componentes (Figura 1.5). Estos monolignoles se encuentran unidos entre sí mediante enlaces de tipo éster, éter o carbono-carbono. La lignina se une covalentemente a la celulosa y al xilano. La función de la lignina es dar soporte estructural, impermeabilidad y resistencia frente a ataques microbiales y el estrés oxidativo (Santander et al., 2021).

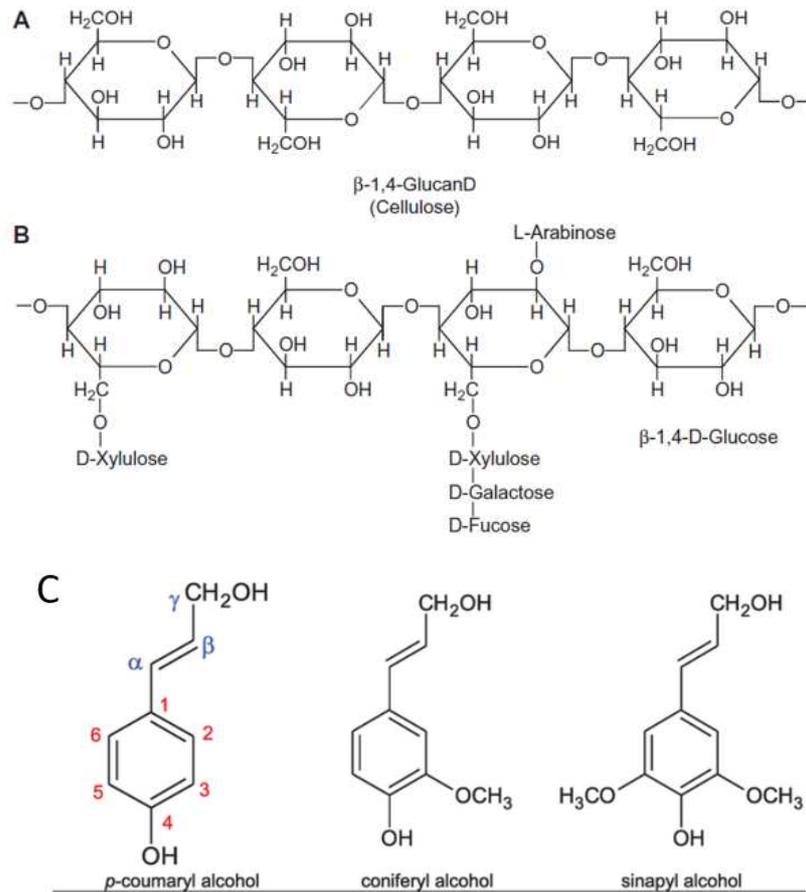


Figura 1.5: Componentes de la pared celular. A- Celulosa; B- Hemicelulosa (Heldt & Piechulla, 2011); C- Compuestos de la lignina (Lourenço & Pereira, 2017).

### 1.3.4 Estructura interna

En la actualidad no se ha encontrado un modelo definitivo de la pared celular de los materiales lignocelulósicos, especialmente en la relación entre la composición y las propiedades mecánicas. La pared celular primaria (formada después del crecimiento de la célula) está formada por celulosa (20-30%), hemicelulosa (25%), pectina (30%) y glicoproteína (5-10%), siendo permeable al agua. La pectina aporta elasticidad a la pared celular y forma la matriz en la que se encuentran insertadas las microfibrillas de celulosa junto a las glicoproteínas y la hemicelulosa (Heldt & Piechulla, 2011). Al alcanzar la célula su tamaño y forma definitivos, se forma la pared celular secundaria, formada principalmente de celulosa. Las microfibrillas de celulosa se disponen en capas para posteriormente incorporarse la lignina en la pared celular secundaria, produciendo la lignificación de la planta, que provoca la muerte de células, las cuales pasan a tener únicamente función estructural (Figura 1.6).

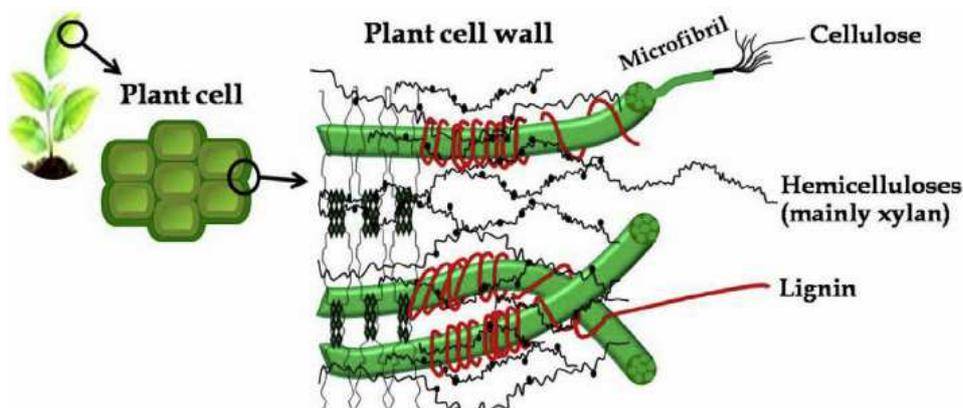


Figura 1.6: Estructura material lignocelulósico (Yan et al, 2015).

### 1.3.5 Otros componentes

Los materiales lignocelulósicos están compuestos por otros materiales de forma minoritaria, como proteínas, grasas, almidón, extractivos, cenizas (metales). Estos compuestos, aunque están presentes en bajas cantidades, son indispensables para funciones fisiológicas de gran importancia. En muchos vegetales el olor, color y gusto es determinado principalmente por los lípidos, siendo también importantes en la defensa contra patógenos. Las proteínas se encargan del crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales, además de participar en procesos de división celular, transporte en membranas y procesos de fotosíntesis entre otros. El contenido en metales es importante en procesos industriales como la combustión, pero también para la producción de pasta de papel y procesos de biorrefinería (Prinsen, 2010).

### 1.3.6 Bagazo de cerveza

El bagazo de cerveza (Brewers' spent grain, BSG) es un residuo de la industria cervecera considerado como un material de gran interés. Una de sus ventajas es su disponibilidad a lo largo del año, a bajo coste y en grandes cantidades, al contrario que los cultivos convencionales (Robertson et al., 2010). La industria de la cerveza produce importantes cantidades de residuos, suponiendo el bagazo alrededor del 85% del total (Hejna et al., 2021). Por cada 100 litros de cerveza producida se obtienen 20 kg de bagazo húmedo (Vieira et al., 2014). La producción anual de bagazo de cerveza en España fue de unos 0,762 millones de toneladas en el año 2018, siendo la producción en Europa de alrededor de 8,12 millones de toneladas (The Brewers of Europe, 2020). La producción mundial alcanzó aproximadamente 38,1 millones de toneladas en el año 2018 (The barth report, 2019).

Tradicionalmente el bagazo de cerveza ha sido empleado como alimento de ganado vacuno y otros rumiantes debido al alto contenido en carbohidratos y proteínas, así como a su bajo coste, ya sea seco o húmedo (Cook, 2011). Sin embargo, debido al alto contenido en material lignocelulósico muchas especies animales no pueden utilizarlo como alimento. Cabe destacar que, debido al alto contenido en humedad, el bagazo se degrada con facilidad en pocos días.

Este material también se ha utilizado para la producción de energía, siendo la alternativa más simple su combustión, aunque presenta ciertos problemas, ya que el bagazo debe estar seco y genera gran cantidad de sustancias contaminantes como óxidos de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) y óxidos de azufre (SO<sub>2</sub>). También se utiliza para la producción de carbón vegetal, pero las propiedades son peores que las del carbón vegetal obtenido a partir de serrín. Este carbón vegetal puede ser empleado también para capturar nitrógeno presente en aguas residuales y ser transformado posteriormente en fertilizante (Zhang & Wang, 2016).

Su alto contenido en celulosa y hemicelulosa (celulosa entre 18 y 26% m/m MS y hemicelulosa entre 17 y 28% m/m MS, Tabla 1.5) hace del bagazo de cerveza un material altamente atractivo para la producción de biocombustibles como el hidrógeno, biogás, etanol y butanol mediante procesos de fermentación. Como el resto de materiales lignocelulósicos, presenta ciertos problemas para ser hidrolizado enzimáticamente, debido a la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, la relación entre tamaño de poro y tamaño de enzima y el porcentaje de lignina del material (Mussatto et al., 2008).

Tabla 1.5: Variabilidad en la composición del bagazo de cerveza.

Glucano (% MS)	Xilano (% MS)	Arabinano (% MS)	LAI (% MS)	LAS (% MS)	LT (% MS)	Referencia
23,1 ± 2,8	15,5 ± 1,0	7,4 ± 0,3	14,1 ± 0,4	4,9 ± 1,0	19,0 ± 1,4	Plaza et al., 2017
17,9 ± 0,3	20,7 ± 0,4	8,0 ± 0,4	19,4 ± 1,2	6,4 ± 0,1	25,8 ± 1,3	López-Linares et al., 2019
18,5 ± 0,2	18,7 ± 0,2	8,3 ± 0,1	16,7 ± 0,2	5,2 ± 0,0	21,9 ± 0,2	Plaza et al., 2020
26,6 ± 0,7	11,5 ± 0,2	5,8 ± 0,3	7,7 ± 0,2	3,3 ± 0,2	11,0 ± 0,4	Pinheiro et al., 2019
23,4 ± 0,9	16,7 ± 0,4	--	--	--	24,4 ± 0,6	Wagner et al., 2021

LAI: Lignina ácida insoluble; LAS: Lignina ácida soluble; LT: Lignina total; MS: Materia seca.

Debido al alto contenido en lignina del bagazo de cerveza (entre un 12 y un 28% m/m materia seca) se hace necesario un proceso de pretratamiento para modificar la estructura interna lignocelulósica, permitiendo que las enzimas accedan a la celulosa y hemicelulosa durante el proceso de sacarificación (Corchado-Lopo et al., 2021).

## 1.4 Proceso de producción de biobutanol a partir de residuos lignocelulósicos

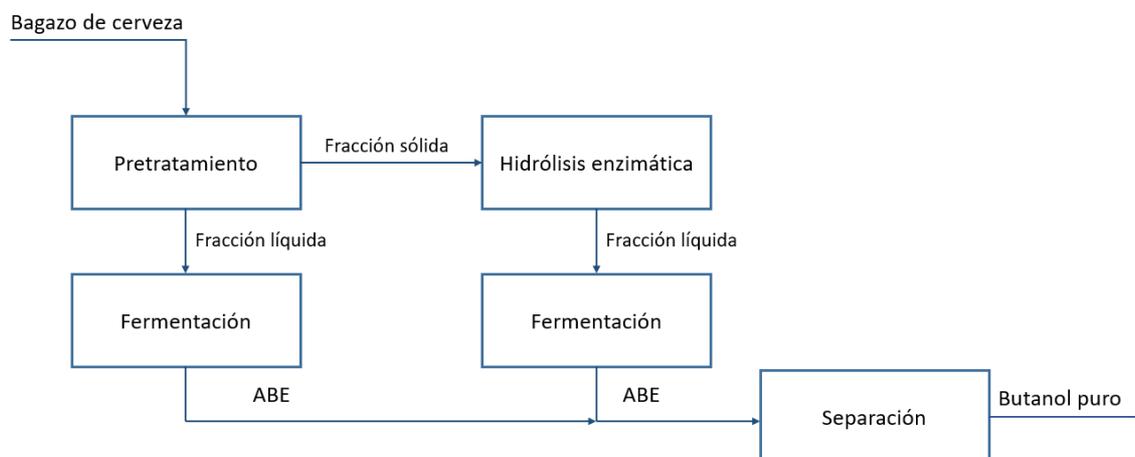


Figura 1.7: Diagrama de bloques del proceso de producción del biobutanol.

El proceso de producción de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos consta de cuatro etapas principales, como se indica en la Figura 1.7. En la primera etapa se lleva a cabo un pretratamiento del material, dando lugar a una corriente líquida y otra sólida. En función del pretratamiento utilizado se pueden obtener líquidos con suficientes carbohidratos como para poder llevar a cabo una fermentación de los azúcares. El sólido pretratado es usado para la hidrólisis enzimática, en la cual se producen monosacáridos al hidrolizar la celulosa y hemicelulosa presentes en el material. Este proceso permite obtener un líquido rico en azúcares que puede ser utilizado en la fermentación ABE. Durante la fermentación, el microorganismo consume los monosacáridos presentes en el medio, proporcionando acetona, butanol y etanol en una proporción de 3:6:1 (Bellido et al., 2014). En el proceso de fermentación ABE se obtienen concentraciones bajas de los productos de interés, lo que obliga a añadir una etapa de separación que permita obtener el biocombustible con la pureza necesaria para su comercialización.

### 1.5 Etapa de pretratamiento

La compleja estructura de los materiales lignocelulósicos obliga a realizar un pretratamiento con el fin de alterar la estructura interna del material para que las enzimas puedan realizar su función. La hidrólisis enzimática se ve afectada por varios factores, siendo uno de estos la cristalinidad de la celulosa. Otros factores son el grado de polimerización y el contenido en lignina (Plaza et al., 2017). La disminución del tamaño de partícula y el aumento de la superficie disponible también afectan a la hidrólisis enzimática (Harmsen et al., 2010). La presencia de lignina también afecta al rendimiento de la etapa de hidrólisis enzimática, limitando la velocidad y el alcance de la acción de las enzimas, impidiendo la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa (Binod et al., 2019). La manera de limitar estos problemas es realizar un pretratamiento que altere la estructura interna del material lignocelulósico, facilitando la acción de las enzimas (Figura 1.8).

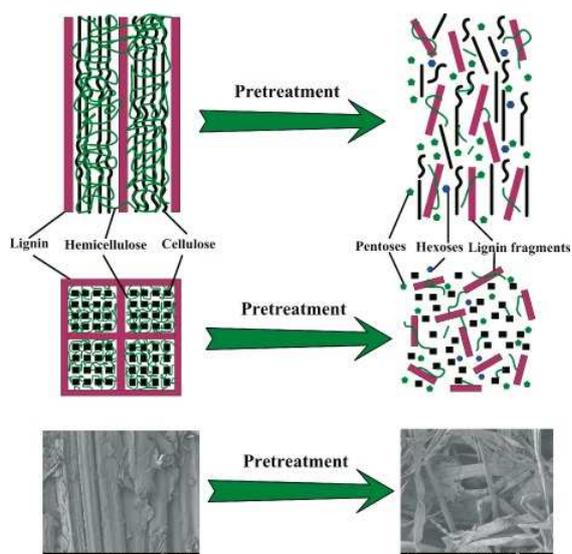


Figura 1.8: Efecto del pretratamiento en la estructura del material lignocelulósico (Zhao et al., 2012).

Los pretratamientos pueden ser de diversos tipos: físicos, físico-químicos, químicos o biológicos. En la Tabla 1.6 se resumen los principales pretratamientos reportados en la bibliografía, incluyendo las condiciones de operación y las principales ventajas e inconvenientes.

Dentro de los **pretratamientos físicos**, los de tipo mecánico son los principales y su objetivo es la reducción del tamaño de partícula del material mediante molienda para reducir la cristalinidad de la celulosa al producirse un incremento de la superficie específica y la reducción del grado de polimerización. El pretratamiento mecánico ayuda a aumentar el rendimiento de hidrólisis enzimática entre el 5 y el 25%, dependiendo de la biomasa, el tipo y tiempo de molienda (Roy et al., 2020).

Entre los pretratamientos **físico-químicos** se engloban varios tipos de pretratamiento como pueden ser la pirólisis, el pretratamiento por microondas o el pretratamiento térmico.

En la **pirólisis**, la celulosa se degrada por encima de los 300°C, formando hidrógeno, CO y carbón residual. Al terminar el proceso, el carbón se separa y queda una solución compuesta principalmente por glucosa que se puede fermentar con el fin de obtener biocombustibles. La eficacia del proceso depende de la temperatura, el tiempo de reacción, el reactor empleado, el catalizador y el material utilizado (Canilha et al., 2012).

El pretratamiento por **microondas** se basa en la interacción directa entre el material y un campo electromagnético (Canilha et al., 2012). Se puede llevar a cabo en combinación con otros para mejorar la liberación de azúcares. El factor determinante es el medio en el que se lleve a cabo, pudiendo ser desde agua, pasando por mezclas de glicol-agua o catalizadores ácidos (Li et al., 2016).

Tabla 1.6: Pretratamiento de biomasa lignocelulósica: clasificación, condiciones de operación y principales efectos.

Tipo	Pretratamiento	Fundamento	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Efectos	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Físico	Mecánico	Reducción de tamaño de partícula mediante molido			Reducción de cristalinidad de la celulosa	Aumenta rendimiento de la hidrólisis enzimática	Tamaño de partícula menor de 0,425 mm	Roy et al., 2020
					Incremento de superficie específica	Reduce el tiempo de hidrólisis		
					Reducción del grado de polimerización			
Físico-químicos	Pirólisis	El material se somete a temperaturas mayores a 300°C			Separación de glucosa del resto de componentes	Simpleza	Temperaturas altas y equipos costosos	Canilha et al., 2012
	Microondas	Interacción directa entre el material y un campo electromagnético	5-40	150-250	Dependen del catalizador usado	Tiempos cortos	Gasto de energía elevado Costes elevados	Li et al., 2016
	Térmico	El material se somete a temperaturas y presiones altas en medio acuoso	5-40	170-230	Solubilización de hemicelulosa y lignina	Equipos simples	Generación de inhibidores en condiciones severas	Xiang et al., 2021
Químico	Ácido	El material se somete a temperaturas y presiones moderadas en presencia de catalizador ácido	Atmosférica-6	40-210	Solubilización de la hemicelulosa	Pretratamiento sencillo Bajo coste de catalizadores	Generación de inhibidores Coste de equipos por corrosión	Plaza et al., 2020
	Alcalino	El material se somete a temperaturas y presiones moderadas en presencia de catalizador alcalino	Atmosférica-3	30-130	Hinchamiento del material	Baja formación de inhibidores Pretratamiento sencillo	Pérdida de azúcares	Wilkinson et al., 2014
	Oxidativos	El material se somete a temperaturas y presiones moderadas en presencia de compuestos oxidantes	Atmosférica	30-80	Elimina lignina, facilita acceso a celulosa	Equipos sencillos Bajo coste energético	Perdidas de celulosa y hemicelulosa Coste de catalizadores	Jönsson & Martin, 2016
Biológico		Microorganismos degradan la hemicelulosa y la lignina	Atmosférica	30-35	Degradación de la hemicelulosa y lignina	Equipos sencillos	Tiempos de proceso elevados	Ramachandran et al., 2020

En el pretratamiento **térmico**, el material se somete a temperaturas y presiones altas en medio acuoso. Al incrementar la temperatura, la hemicelulosa y la lignina comienzan a solubilizarse. Las temperaturas habituales se encuentran entre los 170 y los 230°C, manteniendo una presión que evite la evaporación del líquido. Los tratamientos con temperaturas que superan los 160°C son capaces de solubilizar la lignina, liberando compuestos fenólicos que tienen efectos inhibitorios en la posterior fermentación, debido a su toxicidad para los microorganismos (Nguyen et al., 2015).

Los **pretratamientos químicos** engloban todos aquellos que basan su acción en el uso de catalizadores químicos, ya sean ácidos, bases u oxidantes.

En el pretratamiento **ácido** se produce la solubilización de la hemicelulosa (Plaza et al., 2020). Se pueden llevar a cabo con ácidos diluidos (presiones entre 2 y 6 bares y temperaturas entre 120 y 160°C) o en concentración alta (presión atmosférica y temperaturas entre 40 y 100°C). Al hidrolizarse la hemicelulosa se libera principalmente xilano. Los oligómeros solubilizados durante la hidrólisis de la hemicelulosa pueden a su vez liberar más monómeros, furfural, HMF y otros productos. Al aumentar la concentración de ácido se generan inhibidores. El aumento de los inhibidores es perjudicial para los microorganismos, lo que hace que los pretratamientos ácidos diluidos sean los más empleados, debido a la menor generación de compuestos inhibidores.

Los pretratamientos **alcalinos** se llevan a cabo a presiones entre 1 y 3 bares y a temperaturas entre 30 y 130°C. Estos pretratamientos provocan reacciones de solvatación y saponificación (Wilkinson et al., 2014). Esto produce el hinchamiento del material, haciéndolo más accesible para las enzimas y microorganismos. Altas concentraciones de compuestos alcalinos pueden dar lugar al desprendimiento de grupos terminales, degradación y descomposición de los polisacáridos. Este desprendimiento supone una ventaja en posteriores procesos, aunque lleva asociada una pérdida de azúcares.

En los pretratamientos **oxidativos** se emplea un compuesto oxidante, como puede ser el peróxido alcalino a temperaturas entre 30 y 80°C y pH 11,5 o como puede ser el ozono, que se usa como agente deslignificante a presión y temperatura ambiente. La finalidad es eliminar la lignina, facilitando el acceso a la celulosa (Jönsson & Martin, 2016). Como contrapartida, el oxidante no es selectivo, produciéndose pérdidas de celulosa y hemicelulosa. Debido a la oxidación de la lignina y formación de compuestos aromáticos solubles, la probabilidad de formación de inhibidores es alta. Al igual que en el pretratamiento alcalino, es necesario lavar el material para eliminar los inhibidores formados (Chang et al., 2001).

Finalmente, en los **pretratamientos biológicos**, son microorganismos los que se encargan de degradar hemicelulosa y lignina. Los microorganismos más utilizados son hongos de pudrición parda y blanca, que degradan la lignina y hemicelulosa, así como la celulosa ligeramente. Los pardos degradan celulosa, mientras que los blancos degradan celulosa y lignina. Los hongos blancos llevan a cabo la degradación mediante enzimas como las peroxidasas y lactasas (Ramachandran et al., 2020). Se han utilizado diversos hongos de pudrición blanca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreus*) con materiales lignocelulósicos, mostrando una gran eficiencia en la delignificación, llegando a eliminar alrededor del 40% de la lignina utilizando *C. comatus* y *T. reesei* (Ma & Ruan, 2015)). Estos pretratamientos presentan las típicas ventajas de los bioprocesos, como son un aporte bajo de energía (temperatura entre 25 y 40°C, pH entre 4 y 5) (Sindhu et al., 2016), no hace falta ningún aditivo químico, lo que ayuda a evitar la generación de inhibidores que puedan afectar negativamente a la fermentación. Como desventaja tienen altos tiempos de residencia, así como importantes pérdidas de carbohidratos.

## 1.6 Hidrólisis enzimática

Después de modificar la estructura interna del material mediante el pretratamiento, se lleva a cabo la hidrólisis enzimática con la finalidad de transformar las cadenas de celulosa en monosacáridos que puedan ser metabolizados por el microorganismo.

Para que se lleve a cabo la hidrólisis enzimática es necesario el contacto físico entre las enzimas y el material. Las enzimas deben alcanzar la superficie de las partículas, difundir a través de las distintas barreras físicas (siendo la lignina la mayor de ellas), adsorberse en la superficie de la celulosa y catalizar la hidrólisis. Todas estas interacciones y reacciones son afectadas por las características físicas y químicas del material, como pueden ser la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, la porosidad y el contenido en hemicelulosa y lignina (Plaza et al., 2017).

En los materiales lignocelulósicos, la celulosa se encuentra físicamente unida a la hemicelulosa y física y químicamente a la lignina. El acceso de las enzimas a la celulosa depende de la presencia de ambas, reduciéndose la efectividad de la hidrólisis al aumentar su proporción en el material. La influencia del contenido en hemicelulosa y lignina ha sido investigada para varios materiales como el bagazo de caña, cáscaras de arroz, rastrojos de maíz, etc., observándose resultados distintos para cada uno de ellos. Como norma general, cuanto más baja sea la proporción de hemicelulosa y lignina en la biomasa, se obtendrán mejores resultados en la hidrólisis enzimática (Sun et al., 2016).

### 1.6.1 Enzimas

Las celulasas son un tipo de enzimas que se encargan de hidrolizar la celulosa. Son una mezcla de enzimas formadas por tres grupos principales (Binod et al., 2019).

- $\beta$ -1,4-endoglucanasas (EC 3.2.1.4): Atacan regiones de baja cristalinidad de la celulosa al azar. Hidrolizan enlaces  $\beta$ -1,4 generando nuevos finales de cadena no reductores. Acortan las cadenas de celulosa (Figura 1.9).
- $\beta$ -1,4-exoglucanasas (EC 3.2.1.91.): Son conocidas también como celobiohidrolasas. Degradan los extremos no reductores de las cadenas de celulosa generados por las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas, formando dímeros de celobiosa. Esta enzima actúa sobre celulosa cristalina y amorfa, así como sobre celodextrinas, pero no actúa sobre celobiosa ni sobre derivados sustituidos (Figura 1.9).
- $\beta$ -1,4-glucosidasas (EC 3.2.1.21.): Se encargan de hidrolizar la celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño, liberando monómeros de glucosa. Esta función es de gran importancia debido a que la acumulación de celobiosa en el medio inhibe la actividad de las anteriores enzimas (Figura 1.9).

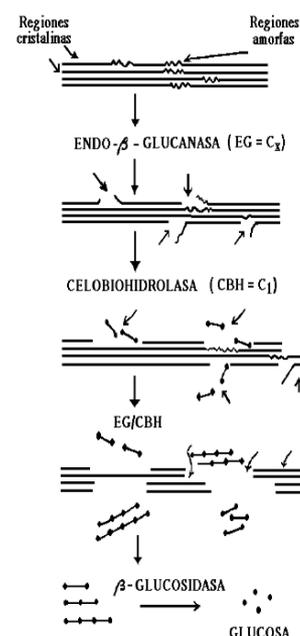


Figura 1.9: Mecanismo de actuación de las celulasas (Oliva, 2003).

Las celulasas son producidas por plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente por microorganismos como hongos y bacterias. Las producidas por los hongos de los géneros *Phanerochaete* y *Fusarium*, son las celulasas más ampliamente utilizadas y estudiadas debido a la capacidad para generarlas en gran cantidad y extracelularmente, lo que facilita su separación en los medios de cultivo, ayudando a la reducción de costes (He et al., 2021).

Para ayudar a mejorar el proceso se pueden utilizar otras enzimas que ayuden a hidrolizar la hemicelulosa (xilanasas), enzimas que ayuden a degradar la lignina (peroxidasas y lacasas) y enzimas de tipo glicosil—hidrolasas que ayuden a inducir cambios estructurales en la celulosa, provocando que las redes formadas por ésta se relajen (Binod et al, 2019).

### 1.6.2 Hidrólisis enzimática con alta carga de sólidos

En los procesos de fermentación es necesario obtener un medio con una alta concentración en monosacáridos. Para obtener estos medios es necesario llevar a cabo la etapa de hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos (Jung et al., 2017). La carga de sólidos se considera alta cuando supera el 15% m/m en masa seca según autores como Modenbach y Nokes (2012).

En la tabla 1.7 se indican las ventajas e inconvenientes del empleo de altas cargas de sólido durante la hidrólisis enzimática. Como ventaja principal, se encuentra la reducción de los costes de operación ya que se puede operar con un menor número de equipos, reduciendo, por tanto, la energía requerida para mantener la temperatura constante, así como se reduce el consumo de agua necesaria (Koppram et al., 2014). En cuanto a las desventajas, se encuentra la ausencia de agua libre en el medio cuando la carga de sólidos supera el 15% m/m, lo que provoca un aumento en la viscosidad y, por consiguiente, limitaciones en la transferencia de materia que reducen la eficiencia de la hidrólisis enzimática (Vignesh & Chandraraj, 2021). Otro factor que reduce la efectividad del proceso es la competitividad entre enzimas por los sitios disponibles en la superficie de los materiales lignocelulósicos (Várnai et al., 2013)

Aunque hay diversos factores que reducen la efectividad de la hidrólisis de alta carga como la acumulación de monosacáridos, oligómeros y ácidos orgánicos en el medio, la peor transferencia de materia y las mayores exigencias en agitación, lo que se traduce en rendimientos más bajos, este proceso continua siendo interesante debido a que se obtienen hidrolizados con altas concentraciones de monosacáridos (Vignesh & Chandraraj, 2021) y que permiten que estos hidrolizados sean utilizados en procesos de fermentación para obtener altas concentraciones de biocombustibles.

Tabla 1.7: Ventajas y desventajas de la hidrólisis enzimática de alta carga de sólidos.

Ventajas	Desventajas
Menores costes	Ausencia de agua libre en el medio
Menor número de equipos	Alta viscosidad
Reducción de energía consumida	Limitaciones en la transferencia de materia y en el agitado
Reducción del uso de agua	Reducción de la eficiencia de la hidrólisis enzimática
Altas concentraciones de monosacáridos	Competitividad por los sitios disponibles para las enzimas
	Altas concentraciones de inhibidores

Por otra parte, la eficiencia de la hidrólisis enzimática de alta carga de sólidos depende altamente del pretratamiento, las condiciones de la hidrólisis, el diseño del reactor y las enzimas utilizadas, haciendo necesaria una tecnología capaz de mezclar uniformemente y alcanzar conversiones altas a la vez que se mantienen bajos el consumo de energía y el tiempo de reacción, para evitar la desnaturalización de las enzimas (Vignesh & Chandraraj, 2021).

### 1.7 Detoxificación

Uno de los problemas del uso de materiales lignocelulósicos para la producción de biocombustibles y en concreto de biobutanol es la generación de compuestos tóxicos durante el pretratamiento e hidrólisis enzimática que inhiben la fermentación. Los compuestos que se pueden producir durante el pretratamiento pueden ser ácidos carboxílicos (ácido acético, fórmico, levulínico), compuestos fenílicos (ácido benzoico, compuestos fenólicos), furanos (furfural y HMF) y ácidos urónicos (ácidos galacturónico y glucurónico) (Jönsson & Martín, 2016).

El tipo, número y concentración de estos compuestos (Tabla 1.8) varía dependiendo de la biomasa utilizada y del pretratamiento empleado. La presencia de estos compuestos tiene una influencia altamente negativa en los procesos de fermentación, reduciendo la eficiencia y el rendimiento, debido a su toxicidad hacia los microorganismos. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos como el ácido ferúlico, el p-cumárico, el 4-hidroxibenzoico, el vanílico y la vanillina pueden causar inhibición del crecimiento de *C. beijerinckii* e inhibir la producción de butanol (Deng et al., 2019). Algunos estudios han mostrado que los hidrolizados de bagazo de cerveza contienen compuestos fenólicos, incluyendo ácidos ferúlico y p-cumárico entre otros, lo que puede afectar a la fermentación ABE (Meneses et al., 2013)

El uso de procesos con alta carga de sólidos incrementa la concentración de todo tipo de compuestos, intensificando los problemas de inhibición.

Tabla 1.8: Inhibidores: origen y efectos inhibitorios en la fermentación.

Inhibidor	Procedencia	Efecto
Furfural	Pentosas (xilosa y arabinosa)	Inhibe crecimiento celular y respiración
Hidroximetilfurfural	Hexosas (glucosa, manosa, galactosa)	Inhibe crecimiento celular y respiración
Ácido acético	Grupos acetilo de la hemicelulosa	Inhibe la actividad celular
Compuesto fenólicos	Lignina	Ruptura de la membrana celular, reducción crecimiento celular y asimilación de monosacáridos

### 1.7.1 Procesos de detoxificación

La detoxificación puede ser una etapa imprescindible en la producción de biobutanol a partir de biomasa lignocelulósica (Maiti et al., 2019). La eliminación de compuestos fenólicos presentes en el medio de fermentación es indispensable para poder llevar a cabo el proceso de fermentación de manera correcta. El proceso de detoxificación comprende técnicas como el uso de agentes reductores (Alriksson et al., 2011), detoxificación electroquímica (Lee et al., 2015b), overliming con hidróxido de calcio (Jönsson et al, 2013), surfactantes (Lee et al., 2015a), adsorción con carbón activo o resinas de intercambio iónico, y detoxificación biológica (Chandel et al, 2011). Las principales alternativas de detoxificación reportadas en bibliografía se resumen en la Tabla 1.9.

El **carbón activo** presenta numerosas ventajas, como son su estructura porosa, su alta capacidad de adsorción, superficie específica (500-5000 m<sup>2</sup>/g), gran microporosidad y amplio espectro de grupos funcionales en superficie (Soleimani et al., 2015). No obstante, en la detoxificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica debe realizarse una optimización de las principales variables de operación, como son el pH, la temperatura, o el tiempo de operación. Ma et al. (2017) investigaron el efecto de la modificación de la superficie del carbón activo para la eliminación de ácido fórmico, acético, HMF y furfural, consiguiendo buenos resultados en la eliminación de furfural y HMF (81 y 89% respectivamente).

La detoxificación mediante **overliming** es uno de los tratamientos más comunes debido a su bajo coste y alta eficiencia, aunque presenta pérdidas de monosacáridos (Chi et al., 2013). Tradicionalmente se lleva a cabo mediante la adición de CaO ó Ca(OH)<sub>2</sub> hasta un pH próximo a 10, para a continuación ajustar el pH de nuevo al valor de fermentación. Se ha demostrado que es capaz de eliminar efectivamente furanos como furfural y HMF (80 y 40% respectivamente, Paniagua-García et al., 2018)

Los métodos **biológicos** consisten en el uso de enzimas o microorganismos que actúan sobre los compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados y los transforman a otros compuestos no tóxicos. Las enzimas utilizadas son del tipo lacasas o peroxidasas, procedentes de microorganismos como *Bacillus subtilis* DES-59 (Hu et al., 2018).

Tabla 1.9: Procesos de detoxificación para la eliminación de compuestos inhibidores en hidrolizados. Principios de funcionamiento y efectos.

Detoxificación	Fundamento	Condiciones de operación	Ventajas	Inconvenientes
Carbón activo	El C.A. se adiciona al hidrolizado	35-80°C y presión atmosférica	Bajo coste Sencillez de aplicación	Pérdidas de monosacáridos ligeras Baja eliminación de ácido acético
Overliming	El CaO se adiciona al hidrolizado	25-60°C y presión atmosférica	Bajo coste Sencillez de aplicación	Pérdidas de monosacáridos moderadas Baja eliminación de ácido acético
Biológico	Uso de enzimas o microorganismos que actúan sobre los compuestos tóxicos	30-35°C y presión atmosférica	Coste moderado	Baja eficiencia Dificultad moderada de implementación
Evaporación a vacío	Reduce la concentración de compuestos volátiles	50-60°C y presión baja	Sencillez del proceso	Aumenta concentración de compuestos tóxicos no volátiles
Detox electroquímica	Aplicación de potencial eléctrico en medio oxidante	Temperatura y presión ambiente	Sin pérdidas de monosacáridos	Necesidad de medio oxidante
Resinas de intercambio iónico	Uso de resinas de adsorción para eliminar los compuestos inhibidores del hidrolizado	Temperatura y presión ambiente	Estabilidad química y mecánica de las resinas Sencillez del proceso	Perdidas moderadas de monosacáridos Coste de las resinas
Extracción líquido-líquido	Eliminación de compuestos tóxicos mediante líquido extractante	Temperatura y presión ambiente	Sencillez del proceso	Dificultad para la recuperación del extractante Posible toxicidad para microorganismos

La **evaporación a vacío** es capaz de reducir la concentración de compuestos volátiles, como son el ácido acético, furfural y vanillina. Sin embargo, este método provoca el aumento de concentración de los compuestos tóxicos no volátiles, como son los compuestos fenólicos, aumentando los problemas de inhibición en procesos de fermentación. Este método suele combinarse con la extracción líquido-líquido (Roque et al., 2019).

La **detoxificación electroquímica** tiene como principal ventaja la reducida pérdida de monosacáridos. Los compuestos fenólicos forman radicales en medios oxidativos para después polimerizar mediante polimerización por radicales. Los compuestos fenólicos son transformados en radicales mediante la aplicación de un potencial de oxidación y son eliminados como polímeros después de la polimerización de radicales (Lee et al., 2015b).

## 1.8 Proceso de fermentación ABE

Durante la primera mitad del siglo XX se llevó a cabo la producción de acetona y butanol mediante distintas especies de *Clostridium*, siendo uno de los primeros procesos de fermentación desarrollados a nivel industrial, estando solo por detrás de la obtención de etanol. La aparición de la industria petroquímica durante la segunda mitad del siglo XX provocó que se dejasen de emplear los procesos de fermentación, debido a su incapacidad de competir económicamente con la obtención del butanol mediante síntesis química.

El interés en producir compuestos químicos a partir de fuentes renovables y los últimos avances en el campo biotecnológico han provocado que en los últimos años se recuperen los procesos de fermentación para la obtención de butanol y acetona (Patrascu et al., 2017). Como consecuencia, ha aumentado la investigación enfocada en obtener un mejor conocimiento de esta fermentación para desarrollar procesos más eficientes y competitivos.

En la fermentación ABE llevada cabo con cepas del género *Clostridium* se producen acetona y etanol, además de butanol. Las cepas más utilizadas son *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kujawska et al., 2015). En la tabla 1.10 se resumen los microorganismos más utilizados en la operación en discontinuo, así como las principales características del proceso de fermentación (materia prima concentración de solventes, rendimiento y productividad). Los últimos avances en ingeniería genética han permitido obtener cepas con capacidad de producir mayores concentraciones de solventes, como *C. beijerinckii* BA101.

Las proporciones en las que se producen los solventes varían debido a la cepa usada y las condiciones de fermentación, si bien es frecuente encontrar una relación acetona:butanol:etanol 3:6:1 en masa (Bellido et al., 2014).

Tabla 1.10: Cepas de microorganismos utilizadas en la fermentación ABE batch, productividades y rendimientos (Adaptada de Nanda et al., 2017).

Microorganismo	Materia prima	Concentración ABE total (g/L)	Productividad (g/L·h)	Rendimiento ABE (g/g)	Referencia
<i>C. acetobutylicum</i> 842A	Lactosa	1,4	0,77	0,15	Napoli et al., 2010
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (IFP 904)	Jugo de alcachofas de Jerusalén	19,8			Marchal et al., 1985
<i>C. acetobutylicum</i> IFP 921	Paja de trigo	17,7	0,47	0,18	Marchal et al., 1984
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1731	Patata	33,0	0,63	0,13	Grobben et al., 1993
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Papilla de patata dulce desfibrada	7,7	1,00	0,20	Badr et al., 2001
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Madera de álamo	20,1-24,6		0,31-0,34	Parekh et al., 1988
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Rastrojo de maíz	15,8		0,34	Parekh et al., 1988
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Madera de pino	17,6		0,36	Parekh et al., 1988
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Permeado de suero de leche	8,6	3,50	0,36	Qureshi & Maddox 1995
<i>C. aurantibutyricum</i>	Efluente de molino de aceite de palma	12,6			Sombrutai et al., 1996
<i>C. beijerinckii</i> B-592	Madera de pino	18,5	0,31	0,27	Nanda et al., 2014
<i>C. beijerinckii</i> B-592	Hierba Timothy	17,4	0,29	0,30	Nanda et al., 2014
<i>C. beijerinckii</i> B-592	Paja de trigo	17,9	0,30	0,28	Nanda et al., 2014
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Fibra de maíz	9,3	0,10	0,39	Qureshi et al., 2008a
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Maíz desgermada	14,3	0,30		Ezeji et al. 2007a
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Almidón de maíz licuado	26,5	0,40	0,41	Ezeji et al. 2007b
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Almidón y glucosa	9,9	0,42		Ezeji et al. 2005
<i>C. beijerinckii</i> P260	Paja de cebada	26,6	0,39	0,43	Qureshi et al., 2010a
<i>C. beijerinckii</i> P260	Paja de trigo	21,4	0,31	0,41	Qureshi et al., 2008a
<i>C. beijerinckii</i> P260	Paja de trigo	16,6	0,36		Qureshi et al., 2008b
<i>C. beijerinckii</i> P260	Rastrojo de maíz y pasto varilla (1:1)	21,1	0,21	0,43	Qureshi et al., 2010b
<i>C. beijerinckii</i> P260	Pasto varilla	14,6	0,09	0,37	Qureshi et al., 2010b
<i>C. butylicum</i> NRRL B592	Pulpa de manzana	1,1			Voget et al., 1985
<i>C. butylicum</i> TISTR 1032 & <i>B. subtilis</i> WD 161	Cassava	7,4	0,10		Tran et al., 2010
<i>C. saccharobutylicum</i> DSM 13864	Sagú	9,1	0,85	0,29	Liew et al., 2005
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> ATCC 27022	Bagazo de arroz	18,1	0,30	0,33	Soni et al., 1982
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> ATCC 27022	Paja de arroz	13,0	0,15	0,28	Soni et al., 1982
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Ácido butírico y glucosa	16,0	0,42	0,49	Tashiro et al., 2004

### 1.8.1 *Clostridium beijerinckii*

El microorganismo utilizado en este trabajo de Tesis Doctoral es *Clostridium beijerinckii*. Este microorganismo anaerobio presenta dos rutas metabólicas, una primera en la que se producen ácidos (fase acidogénica) y a continuación, una fase en la que se producen los solventes: acetona, butanol y etanol (fase solventogénica).

En la fase acidogénica, el microorganismo utiliza la fuente de carbono presente en el medio para producir ácidos (acetato y butirato). Cuando finaliza la fase acidogénica, se utilizan los ácidos producidos anteriormente y la fuente de carbono del medio para producir acetona, butanol y etanol (Figura 1.10).

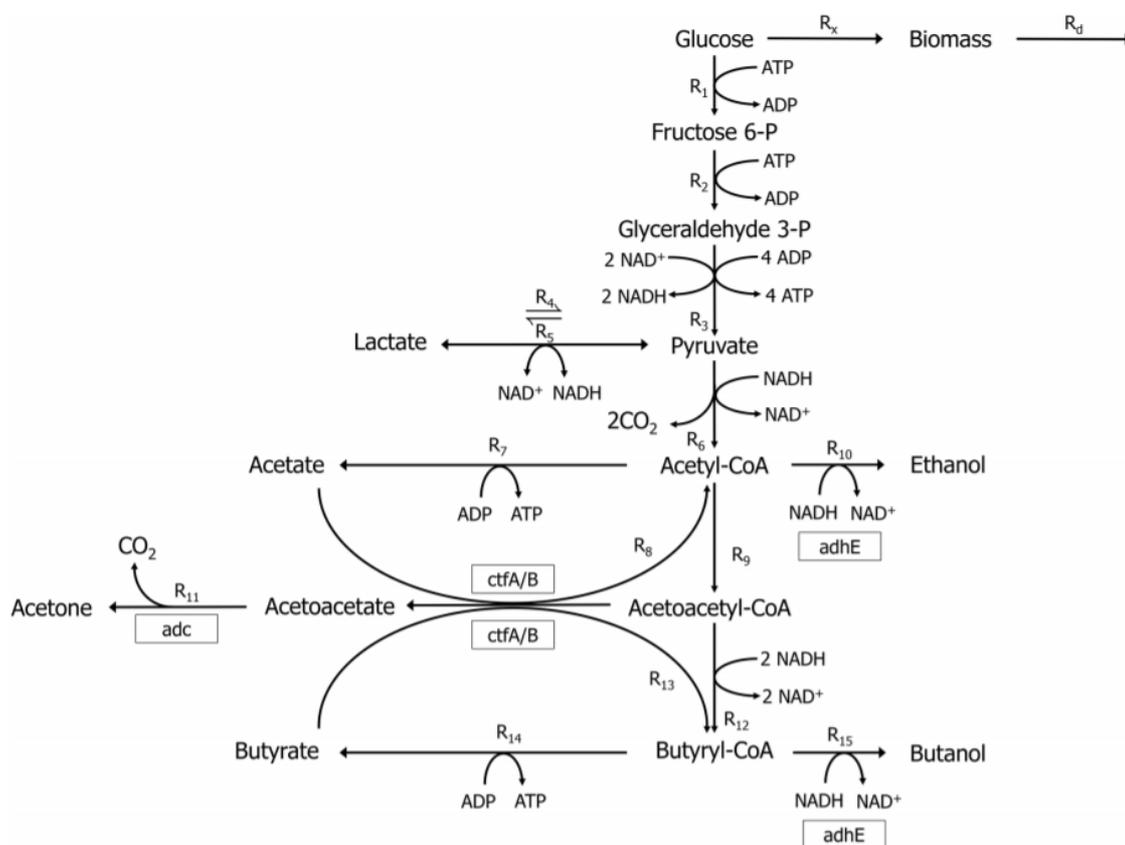


Figura 1.10: Ruta metabólica de *Clostridium beijerinckii* (Buehler & Mesbah, 2016).

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

A continuación, se enumeran los factores que modula el paso de la fase acidogénica a la solventogénica (Buehler & Mesbah, 2016).

- pH externo: Cuando el pH baja a un valor en torno a 4,5-5 comienza la fase solventogénica. Si el pH no disminuye el microorganismo solamente produce ácidos. El rango de pH en el que comienza la fase solventogénica depende de la cepa

empleada. En caso de que el pH baje excesivamente, el crecimiento y el metabolismo celular se inhiben.

- Producción de ácidos: Cuando la concentración de ácidos acético y butírico es elevada (ácido acético mayor de 5 g/L, Alves et al., 2021; ácido butírico mayor de 5 g/L, Al-Shorgani et al., 2012), se inhiben el crecimiento y el metabolismo celular. Si las concentraciones son bajas, el crecimiento se ralentiza, pero el consumo de sustrato y el metabolismo son capaces de continuar. La producción de solventes actúa como un mecanismo de detoxificación, siendo una respuesta adaptiva al efecto inhibitorio de los ácidos. El comienzo de la fase solventogénica está asociado con la bajada del pH y la acumulación de ácidos en el medio.
- pH intracelular: Estos microorganismos no son capaces de mantener constante el pH interno, pero son capaces de mantener constante un gradiente de pH con el exterior a través de la membrana celular. El gradiente se mantiene gracias a la expulsión de protones, consumiendo energía metabólica en el proceso. En caso de que no haya sustrato del que obtener energía, la célula no es capaz de mantener el gradiente de pH. El mantenimiento del gradiente de pH es crítico para el crecimiento celular y el metabolismo.
- Limitación de nutrientes: Si la concentración de carbono en el medio es baja sólo se producen ácidos, pero en cantidad insuficiente como para inducir la producción de solventes. Es necesario que la concentración de monosacáridos sea suficiente para el inicio y mantenimiento de la producción de solventes. Otro compuesto limitante es el amonio, si la concentración es baja, la glucosa no se consume y no se entra en fase solventogénica, afectando esta relación amonio:glucosa al inicio de la fase solventogénica.
- Temperatura: La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30 y 35°C. Si aumenta, baja la producción de solventes.

El problema principal de *C. beijerinckii* es la inhibición que se produce cuando los solventes alcanzan una determinada concentración (Inhibición por producto).

Cuando el microorganismo se encuentra en fase solventogénica sigue produciendo solventes hasta llegar a una concentración total entre 9 y 20 g ABE/L dependiendo de la cepa (Tabla 1.10), en la cual se alcanza la inhibición por producto. Cuando se alcanza esta concentración el metabolismo celular se detiene. Esta inhibición provoca que las concentraciones obtenidas de solventes sean bajas, siendo esta una de las principales limitaciones para la producción de solventes a nivel industrial. Dentro de los solventes producidos, el butanol es el más tóxico y el único producido en concentraciones inhibitorias durante la fermentación. La producción de solventes se detiene cuando la concentración de butanol alcanza los 8 g/L, aunque estos valores dependen del microorganismo y de la cepa utilizados (Rochón et al., 2017).

La toxicidad del butanol está ligada a la naturaleza hidrofóbica de este compuesto, que provoca la disrupción del componente fosfolípido de la membrana celular. La membrana incrementa su fluidez en presencia de butanol, lo que resulta en la desestabilización de la membrana y la interrupción de las funciones relacionadas con la membrana.

El rendimiento típico en butanol y ABE en cepas no modificadas genéticamente se sitúa en torno a 0,20 g/g y 0,30 g/g respectivamente, mientras que la productividad se mantiene en torno a 0,06 g butanol/L·h (Lu et al., 2013). Con cepas modificadas genéticamente (*C. acetobutylicum* JB200) se consigue llegar a rendimientos de ABE de 0,40 g/g y productividades de hasta 0,66 g ABE/L·h (Xue et al., 2013).

## 1.9 Separación y purificación de solventes

Una vez finalizada la etapa de fermentación se hacen necesarios los procesos de separación que recuperen los componentes de interés presentes en el caldo de fermentación. La separación del biobutanol del medio de fermentación es similar a la separación del bioetanol. Ambos medios son muy diluidos, lo que provoca que la separación consuma gran cantidad de energía, aumentando los costes de manera notable. Ambos compuestos tienen un tamaño de molécula mayor que el del agua, lo que implica que una pequeña fracción del agua puede ser separada mediante tamizado molecular. Ambos compuestos tienen un grupo funcional –OH, lo que favorece que puedan ser extraídos de mezclas acuosas utilizando compuestos como el alcohol oleico, el n-dodecanol, butilacetato y [P<sub>6,6,6,14</sub>][DCA] (trihexiltetradecilfosfonio dicianamida), entre otros (Huang et al, 2014).

Sin embargo, existen diferencias importantes entre ellos. Una de las más importantes es la mayor concentración de etanol en el medio (5-12% m/m etanol en comparación con 1-2% m/m butanol). A presión atmosférica, el etanol forma un azeótropo con el agua a un 95,5% de etanol a 78,2 °C, bastante por debajo de la temperatura de ebullición del agua, mientras que el butanol forma azeótropos a un 55,5% m/m de butanol a 93°C, lo que es un poco por debajo de la temperatura de ebullición del agua. Esto implica que la separación del butanol mediante destilación consume mucha más energía que la separación del etanol, llegando al punto de que la separación de butanol mediante destilación es energéticamente inviable, debido a que consume más energía de la que contiene el butanol recuperado. Esto provoca que se deban investigar otros métodos de separación para preconcentrar el butanol de los medios de fermentación.

El etanol es completamente miscible con el agua y los azeótropos formados son homogéneos. A diferencia de esto, el butanol a 20°C tiene un límite inferior de solubilidad en agua de 7,7% m/m y un límite superior de solubilidad de 79,9% m/m butanol, lo que implica que los azeótropos formados son heterogéneos. A consecuencia de esto, la separación del butanol se vuelve más sencilla cuando se superan los valores comentados, debido a la separación de fases. Las soluciones preconcentradas que contengan entre un 7,7 y un 79,9% de butanol se separan en dos fases, una acuosa conteniendo un 7,7% m/m de butanol y una orgánica conteniendo butanol en una proporción mayoritaria. Esto indica que alternativas de separación como el gas stripping y la pervaporación con membranas pueden ser utilizadas para llevar a cabo la recuperación in situ del producto o para concentrar los medios de fermentación por encima del 7,7% m/m de butanol (Huang et al, 2014).

En cuanto a las alternativas de recuperación, las más utilizadas para la separación de butanol y etanol son la destilación (Mariano et al., 2011), adsorción (Levario et al., 2011), gas stripping (Sethlaku et al, 2013), extracción líquido-líquido (Cháfer et al., 2020), destilación con

membranas (Kujawska et al., 2016), termopervaporación (Borisov et al., 2011), y pervaporación al vacío (Rozicka et al., 2014).

Dentro de los procesos de separación se puede distinguir entre dos grandes grupos, los que se pueden realizar de manera integrada con la fermentación y los que se realizan de forma separada.

#### 1.9.1 Procesos de separación no integrados con la fermentación

La **destilación** es una de las técnicas mejor conocidas en la que la separación se produce debido a la diferencia de volatilidad de los componentes de la mezcla. Cuando la temperatura de una mezcla de componentes con volatilidades distintas aumenta hasta su temperatura de ebullición, la composición del vapor formado será diferente de la composición del líquido. La mezcla acuosa de acetona-butanol-etanol es un sistema complejo en el que se pueden formar mezclas azeotrópicas durante la destilación. El proceso convencional de destilación para la recuperación de los productos de la fermentación ABE ha sido descrito por autores como Chen et al. (2019a), estando comprendido el equipo de separación por hasta cinco columnas de destilación hasta obtener una corriente compuesta por n-butanol con una pureza del 99,7%.

En la **adsorción**, los compuestos presentes en una mezcla líquida o gaseosa se adsorben sobre la superficie de un sólido según su afinidad (Fu et al., 2021). Aunque los adsorbentes utilizados tienen una gran selectividad hacia el butanol, hay varios problemas para la recuperación por adsorción durante la fermentación ABE. Uno de los problemas es la desorción de compuestos orgánicos que se hayan adsorbido previamente en el adsorbente. A esto se añade la posibilidad de que las bacterias se adhieran al adsorbente, disminuyendo la eficiencia de la adsorción, especialmente cuando el adsorbente es reciclado (Kujawska et al. 2015). Este proceso tiene un gasto de energía de hasta 33 MJ/kg de butanol (Xue et al., 2013, Figura 5)

La **destilación con membranas** es un proceso en el que se utiliza una membrana hidrofóbica microporosa para separar soluciones acuosas a distintas temperaturas. Es un proceso similar a la destilación convencional, requiriendo el calentamiento de la corriente de entrada para conseguir llegar al punto de ebullición. La destilación con membranas se basa en el equilibrio líquido/gas (Khayet, 2011). La diferencia de temperatura entre ambas caras de la membrana da lugar a diferencias en la presión de vapor. Gracias a esto, las moléculas en estado gaseoso son transportadas a través de la membrana de la zona de mayor presión de vapor a la zona de menor presión de vapor. Las membranas utilizadas no pueden humedecerse y solo los gases deben poder difundir por los poros de la membrana (Kujawska et al., 2016). La mayoría de las membranas utilizadas están fabricadas con polímeros altamente hidrofóbicos, como el fluoruro de polivinilideno (PVDF), politetrafluoroetileno (PTFE), polietileno (PE) y polipropileno (PP) (Kujawska et al., 2015).

La **ósmosis inversa** es una tecnología que utiliza membranas comúnmente utilizadas en la desalinización de aguas para producción de agua potable (Pérez-González et al., 2011). En la ósmosis inversa se utilizan membranas semipermeables que separan la corriente de alimentación en dos corrientes, un permeado (agua purificada) y un concentrado (solución

con los compuestos retenidos). Para este proceso se utilizan membranas de poliamida con buenos resultados (ratio de rechazo  $\leq 85\%$ ) (Kujawska et al., 2015).

### 1.9.2 Procesos integrados de fermentación y separación.

Algunos métodos de separación de los enumerados anteriormente permiten ser acoplados al proceso de fermentación, evitando así los problemas de inhibición por producto presentes en la fermentación ABE, permitiendo estrategias de alimentación fed-batch, aumentando el tiempo del proceso, así como la producción de solventes. Algunos autores probaron acoplar la fermentación con procesos de pervaporación, lo que permitió mejorar la productividad de ABE, aunque en operaciones de larga duración en el tiempo, las membranas microporosas pueden presentar problemas de colmatación de los poros por los microorganismos. Esta estrategia ha sido estudiada por varios autores (Vane et al., 2013; Qureshi et al, 2014) con diferentes variaciones. Otra alternativa es el uso de gas stripping acoplado al proceso de fermentación. Este proceso ha sido investigado por otros autores (Xue et al, 2014; Rochón et al., 2017; Chen et al, 2014), alcanzando concentraciones y es uno de los más atractivos debido a la simplicidad del proceso, que evita problemas presentes en otras tecnologías, como pueden ser el ensuciamiento de membranas y el alto coste energético.

Los métodos integrados deben cumplir ciertos requisitos (Staggs & Nielsen, 2015):

- Minimizar los costes de energía y materiales
- No afectar negativamente a los microorganismos
- Tener una alta afinidad y selectividad que permita operar con concentraciones bajas.
- Que los reactivos utilizados permitan recuperar el butanol y su reutilización con el menor coste energético posible.
- Robustez de los materiales que evite pérdidas de rendimiento por inhibición, ensuciamiento y degradación.
- Que sean fáciles de implementar.

En la tabla 1.11 se puede observar un listado de procesos que se pueden integrar con la fermentación, así como las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Existen multitud de procesos que se pueden utilizar para la recuperación in situ del butanol, evitando los problemas de inhibición por producto, así como reduciendo las necesidades energéticas en posteriores procesos de separación.

La **separación por gas stripping** permite eliminar compuestos volátiles de manera selectiva del medio de fermentación ABE (Sethlaku et al., 2013). En este proceso se introduce gas en el fermentador para arrastrar los componentes volátiles, que más tarde son condensados y recuperados en un condensador. Esta técnica depende totalmente de la volatilidad de la acetona, butanol y etanol. Rochón et al., (2017) apuntaron que el uso del gas stripping acoplado a un proceso de fermentación ABE permite evitar la inhibición por producto, mejorando tanto la producción de solventes como el rendimiento de la fermentación. Esta mejora se debe a que este proceso no elimina los productos intermedios de la fermentación. El gas stripping es capaz de eliminar el butanol del medio, evitando la

inhibición por producto sin tener ningún efecto negativo sobre el microorganismo, llegando a obtener concentraciones totales de solventes de 31,8 g/L para 98 g/L de azúcares iniciales utilizando *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (Rochón et al., 2017).

La **extracción líquido-líquido** es un proceso utilizado para extraer un componente de una mezcla de líquidos mediante el uso de otro líquido (Grisales Díaz & Olivar-Tost, 2017). La extracción líquido-líquido es un proceso que necesita de una intensiva investigación para encontrar compuestos que permitan extraer el butanol del medio sin intoxicar al microorganismo. Utilizando esta tecnología en combinación con *Clostridium acetobutylicum* B5313 se consiguen producciones de hasta 25,3 g de solventes/L (Bankar et al., 2012).

La **pervaporación** emplea membranas para separar mezclas de componentes líquidos. El transporte a través de la membrana ocurre debido a la diferencia de potencial químico entre las caras de la membrana (Wijmans y Baker, 1995). Esta diferencia puede ser creada mediante diferencia de temperatura (termopervaporación-TPV), aplicación de un gas de arrastre en el lado del permeado (pervaporación con gas de arrastre-SGPV) y una diferencia de presión entre ambas caras de la membrana (pervaporación a vacío-VPV). Gracias a esta tecnología se pueden llegar a concentraciones de 125 g/L de solventes con *Clostridium* sp. strain CT7 (Chen et al. 2019b).

La **perstracción** es un proceso de extracción líquido-líquido en la que una membrana separa las dos fases (Kujawska et al., 2015). La perstracción consiste en la extracción de compuestos orgánicos de mezclas acuosas con la ayuda de membranas. Las membranas utilizadas son membranas de microfiltración hidrofóbicas, que ayudan a que haya una gran área de contacto entre ambos líquidos. Además, evitan que se mezclen las dos fases, lo que implica que no hay que separar la mezcla del producto utilizado para la extracción, lo que ayuda a disminuir los costes. La membrana también permite que se puedan ajustar los flujos de ambas fases independientemente, facilitando la tarea de optimizar el proceso. Esto permite poner en contacto pequeñas cantidades de extractante con grandes cantidades del líquido a tratar (Emis, 2020). Gracias a este proceso se pueden llegar a obtener concentraciones de hasta 73 g/L de butanol utilizando *C. acetobutylicum* ABE 1401 (Zhang et al., 2021).

Tabla 1.11: Procesos de separación integrables con la etapa de fermentación ABE (adaptada de Staggs & Nielsen, 2015).

Fundamento	Tecnología	Ventajas	Desventajas
Solventes	Adición directa	Fácil de implementar Máximo contacto entre fases	Alto coste de materiales Recuperación de fase limitada Toxicidad del solvente Consumo de energía requerido para la dispersión de fases
	Extractor externo	Mejor control sobre condiciones de operación Modularidad	Costes de material, equipo y energía altos Recuperación de fase limitada Toxicidad del solvente
	Perstracción	Reducción de toxicidad de solventes Mayor selección de solventes Recuperación de fase óptima	Difusión de solvente en el medio Restricciones de transferencia de masa
Adsorbentes	Adición directa	Fácil de implementar Máximo contacto entre fases Alta biocompatibilidad Bajo consumo de energía	Alto coste de materiales Alta carga de adsorbente Recuperación de fase dificultosa
	Lecho fijo	Diseño modular Condiciones de separación eficientes Alta biocompatibilidad Bajo consumo de energía	Alta presión de operación Prefiltrado para eliminación de células
	Lecho fluidizado	Diseño modular Baja presión de operación No requiere prefiltrado Alta biocompatibilidad Bajo consumo de energía	Restricciones de flujo Columnas de grandes dimensiones
Gas	Gas stripping	Fácil de implementar biocompatibilidad máxima Bajos costes de equipo y operación	Eliminación de agua significativa Bajo factor de separación Uso de gas inertizante
	Stripping a vacío	Fácil de implementar Biocompatibilidad máxima	Eliminación de agua significativa Bajo factor de separación Costes de equipo y energía altos
	Pervaporación	Diseño modular Factor de separación alto Alta biocompatibilidad Bajo consumo de energía	Pérdidas de rendimiento por ensuciamiento de membrana. Altos costes de equipo

Estos procesos de fermentación y separación tienen un consumo energético asociado que afecta en gran medida a la viabilidad de la obtención del biobutanol (Figura 1.11). La separación tradicionalmente se ha llevado a cabo mediante destilación, pero el consumo energético es demasiado elevado como para ser viable (79,5 MJ/kg de butanol; van Wyk et al., 2018). Posteriormente se desarrollaron otros procesos de separación que consiguieron reducir notablemente el gasto energético, como son la adsorción (hasta 33 MJ/kg de butanol; Xue et al., 2013), el gas-stripping (entre 14 y 31 MJ/kg de butanol; Xue et al., 2013), la extracción líquido-líquido (entre 8 y 9 MJ/kg de butanol; Xue et al., 2013), la pervaporación (hasta 145 MJ/kg de butanol; Xue et al., 2013) y la perstracción (entre 7 y 9 MJ/kg de butanol (Xue et al., 2013). La combinación de algunos de estos métodos permite reducir más el gasto energético, llegando a consumos muy reducidos como en el caso de gas-stripping de dos etapas (3.7 MJ/kg butanol; Veza et al. 2021)

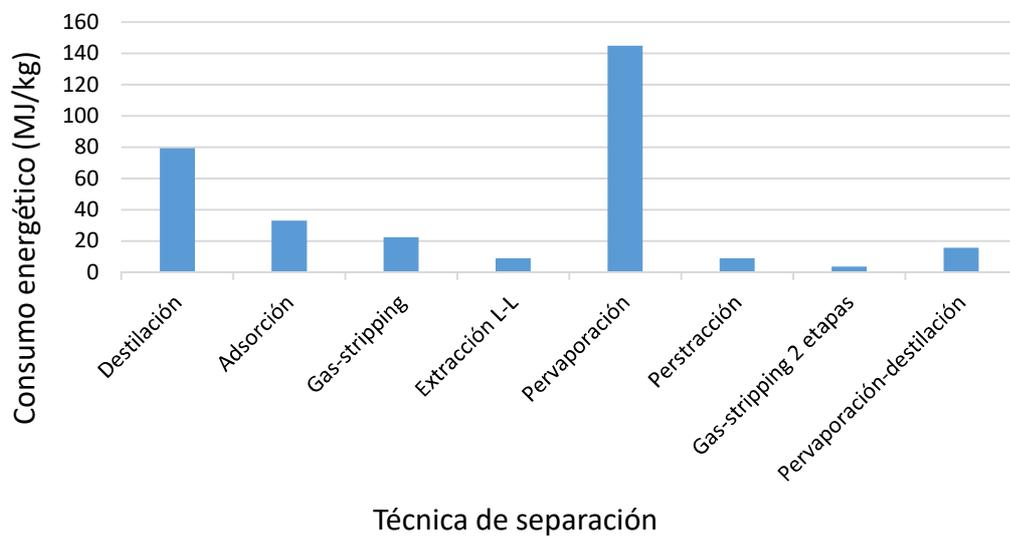


Figura 1.11: Técnicas de separación y consumo energético. van Wyk et al., 2018; Xue et al., 2013; Veza et al., 2021.

## 1.10 Bibliografía

- Abdullah, B., Muhammad, S.A.F.S., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K.A., Mahmood, A.N., Aziz, Md.M.A., 2019. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 107, 37–50.
- Abengoa, 2014. Informe anual 2013. [http://www.abengoa.es/export/sites/abengoa\\_corp/resources/pdf/gobierno\\_corporativo/informes\\_anuales/2013/Tomo1/2013\\_Tomo1\\_IA\\_8.pdf](http://www.abengoa.es/export/sites/abengoa_corp/resources/pdf/gobierno_corporativo/informes_anuales/2013/Tomo1/2013_Tomo1_IA_8.pdf). Fecha de consulta 14 de junio de 2021
- Aguilera, R.F., 2014. Production costs of global conventional and unconventional petroleum. *Energ. Policy* 64, 134-140.
- Alriksson, B., Cavka, A., Jönsson, L.J., 2011. Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents. *Bioresour. Technol.* 102, 1254-1263.
- Alves, A.A., Laviola, B.G., Formighieri, E.F., Carels, N., 2015. Perennial plants for biofuel production: bridging genomics and field research. *Biotechnol. J.* 10, 505-507.
- Alves, R.F., Zetty-Arenas, A.M., Demirci, H., Dias, O., Rocha, I., Basso, T.O., Freitas, S., 2021. Enhancing acetic acid and 5-hydroxymethyl furfural tolerance of *C. saccharoperbutylacetonicum* through adaptive laboratory evolution. *Process. Biochem.* 101, 179-198.
- Al-Shorgani, N.K.N., Ali, E., Kalil, M.S., Yusoff, W.M.W., 2012. Bioconversion of Butyric Acid to Butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) in a Limited Nutrient Medium. *Bioenergy Res.* 5, 287-293.
- Badr, H.R., Toledo, R., Hamdy, M.K., 2001. Continuous acetone ethanol butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass Bioenergy* 20, 119-132.
- Banat, F.A., Al-Shannag, M., 2000. Recovery of dilute acetone–butanol–ethanol (ABE) solvents from aqueous solutions via membrane distillation. *Bioprocess Eng.* 23, 643–649.
- Bankar, S.B., Survase, S.A., Singhal, R.S., Granström, T., 2012. Continuous two stage acetone–butanol–ethanol fermentation with integrated solvent removal using *Clostridium acetobutylicum* B 5313. *Bioresour. Technol.* 106, 110-116.
- Bellido, C., Infante, C., Coca, M., González-Benito, G., Lucas, S., García-Cubero, M.T., 2015. Efficient acetone–butanol–ethanol production by *Clostridium beijerinckii* from sugar beet pulp. *Bioresour. Technol.* 190, 332–338.
- Bellido, C., Loureiro Pinto, M., Coca, M., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2014. Acetone–butanol–ethanol (ABE) production by *Clostridium beijerinckii* from wheat straw hydrolysates: Efficient use of penta and hexa carbohydrates. *Bioresour. Technol.* 167, 198-205.
- Berk, Z., 2009. Chapter 12— Adsorption and ion exchange. In: Berk, Z. *Food process engineering and technology*. San Diego: Academic Press. 279–294.

- Bespalov, V.I., Gurova, O.S., Samarskaya, N.S., 2016. Main Principles of the Atmospheric Air Ecological Monitoring Organization for Urban Environment Mobile Pollution Sources. *Procedia Eng.* 150, 2019-2024.
- Binod, P., Gnansounou, E., Sindhu, R., Pandey, A., 2019. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. *Bioresour. Technol. Reports* 5, 317-325.
- Borisov, I.L., Volkov, V.V., Kirsh, V.A., Roldugin, V.I., 2011. Simulation of the temperature-driven pervaporation of dilute 1-butanol aqueous mixtures through a PTMSP membrane in a cross-flow module. *Pet. Chem.* 51, 542–554.
- BP Statistical Review of World Energy, 2019. <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2019-full-report.pdf>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Buehler, E.A., Mesbah, A., 2016. Kinetic Study of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation in Continuous Culture. *PLoS ONE* 11(8): e0158243. doi:10.1371/journal.pone.0158243
- Canilha, L., Chandel, A., dos Santos, T., Fernandes, F., da Costa, W., das Graças, M., Sivério, S., 2012. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *J. Biomed. Biotechnol.* 7, 1-15.
- Cao, Y., Tan, H., 2002. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydr. Res.* 337, 1291-1296.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M., 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 849-864.
- Cháfer, A., de la Torre, J., Loras, S., Montón, J.B., 2018. Study of liquid–liquid extraction of ethanol + water azeotropic mixtures using two imidazolium-based ionic liquids. *J. Chem. Thermodyn.* 118, 92-99
- Chandel, A.K., da Silva, S.S., Singh, O.V., 2011. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. *Biofuel Production-Recent Development and Prospects*, ed by Dos Santos Bernardes, MA. InTech Eds, Luxembourg, 225-246.
- Chang, V.S., Holtzapfle, M.T., 2000. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84, 5-37.
- Chang, V.S., Nagwani, M., Kim, C., Holtzapfle, T., 2001. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 94, 1-28.
- Chen, Y., Ren, H.F., Liu, D., Zhao, T., Shi, X.C., Cheng, H., 2014. Enhancement of n-butanol production by insitu butanol removal using permeating-heating-gas stripping in acetone–butanol–ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* 164, 276–84.
- Chen, H., Cai, D., Chen, C., Zhang, C., Wang, J., Qin, P., 2019a. Techno-economic analysis of acetone-butanol-ethanol distillation sequences feeding the biphasic condensate after in situ gas stripping separation. *Sep. Purif. Technol.* 219, 241-248.
- Chen, T., Xua, F., Zhang, W., Zhou, J., Dong, W., Jianga, Y., Lua, J., Fang, Y, Jiang, M., Xin, F., 2019b. High butanol production from glycerol by using *Clostridium* sp. strain CT7 integrated with membrane assisted pervaporation. *Bioresour. Technol.* 288, 121530.

- Chi, Z., Rover, M., Jun, E., Deaton, M., Johnston, P., Brown, R.C., Wen, Z., Jarboe, L.R., 2013. Overliming detoxification of pyrolytic sugar syrup for direct fermentation of levoglucosan to ethanol. *Bioresour. Technol.* 150, 220-227.
- Cho, D.H., Lee, Y.J., Um, Y., Sang, B.I., Kim, Y.H., 2009. Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. *App. Microbiol. and Biotechnol.* 83, 1035–1043.
- CNMC, 2020. Estadística de biocarburantes. <https://www.cnmc.es/estadistica/estadistica-de-biocarburantes>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Cook, D., 2011. Brewers' grains: Opportunities abound. *Brewers' Guardian.* 60-63.
- Corchado-Lopo, C., Martínez-Avila, O., Marti, E., Llimós, J., Busquets, A.M., Kucera, D., Obruca, S., Llenas, L., Ponsá, S., 2021. Brewer's spent grain as a no-cost substrate for polyhydroxyalkanoates production: Assessment of pretreatment strategies and different bacterial strains. *New Biotechnol.* 62, 60-67.
- Correa, D.F., Beyer, H.L., Possingham, H.P., Thomas-Hall, S.R., Schenk, P.M., 2017. Biodiversity impacts of bioenergy production: Microalgae vs. first. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 74, 1131–1146.
- Costa, J.M., Moreira, A.R., 1983. Growth inhibition for kinetics of the acetone-butanol fermentation. *Foundations of biochemical engineering, kinetics and thermodynamics in biological systems*, 501-512.
- Dahnum, D., Tasumb, S.O., Triwahyunia, E., Nurdinb, M., Abimanyua, H., 2015. Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. *Energy Procedia* 68, 107-116.
- Delgenés, J.P., Penaud, V., Moletta, R., 2002. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes Chapter 8. *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. IWA Publishing, 201-228.
- Deng, F., Cheong, D-Y., Aita, G.M., 2019. Optimization of activated carbon detoxification of dilute ammonia pretreated energy cane bagasse enzymatic hydrolysate by response surface methodology. *Ind. Crop. Prods.* 115, 166-173.
- Eckert, G., Schugerl, K., 1987. Continuous acetone-butanol production with direct product removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 221–228.
- Emis, 2020. <https://emis.vito.be/en/bat/tools-overview/sheets/pertraction>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Estrada, A., Hernández de Cos, P., 2009. El precio del petróleo y su efecto sobre el producto potencial. Documentos Ocasionales N.º 0902. Banco de España. <https://www.bde.es/f/webbde/SES/Secciones/Publicaciones/PublicacionesSeridas/DocumentosOcasionales/09/Fic/do0902.pdf>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Evans, P.J., Wang, H.Y., 1988. Enhancement of butanol formation by *Clostridium acetobutylicum* in the presence of decanol-oleyl alcohol mixed extractants. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1662–1667.

- Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2005. Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *J. Biotechnol.* 115, 179-187.
- Ezeji, T., Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2007a. Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii*. *Process Biochem.* 42, 34-39.
- Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2007b. Production of acetone butanol (AB) from liquefied corn starch, a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 771-777.
- Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., Ayoub, A., 2017. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Ind. Crop. Prod.* 107, 370-377.
- Fernandes-Klajn, F., Romero-García, J.M., Díaz, M.J., Castro, E., 2018. Comparison of fermentation strategies for ethanol production from olive tree pruning biomass. *Ind. Crop. Prod.* 122, 98-106.
- Fu, L., Li, J., Wang, G., Luan, Y., Dai, W., 2021. Adsorption behavior of organic pollutants on microplastics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 217, 112207.
- Gregg, D.J., Saddler, J.N., 1996. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnol. Bioeng.* 51, 375-383.
- Grisales Díaz, V.H., Olivar-Tost, G., 2017. Stability Study of a Hybrid Reactor with Liquid-Liquid Extraction for ABE Production. *Comput. Aided Chem. Eng.* 40, 1105-1110.
- Grobben, N.G., Eggink, G., Cuperus, F.P., Huizing, H.J., 1993. Production of acetone, butanol and ethanol (ABE) from potato wastes: fermentation with integrated membrane extraction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 494-498.
- Gupta, R., Gautam, S., Shukla, R., Kuhad, R.C., 2017. Study of charcoal detoxification of acid hydrolysate from corncob and its fermentation to xylitol. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 4573–4582.
- Harmsen, P.F.H., Huijgen, W.J.J., Bermúdez López, L.M., Bakker, R.R.C., 2010. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. Technical report.
- He, J., Qiu, Y., Ji, X., Liu, X., Qiu, Z., Xu, J., Xia, J., 2021. A novel strategy for producing cellulase from *Trichoderma reesei* with ultrasound-assisted fermentation using spent mushroom substrate. *Process. Biochem.* 104, 110-116.
- Heldt, H.W., Piechulla, B., 2011. *Plant biochemistry*. Elsevier, Göttingen and Rostock.
- Hejna A., Barczewski, M., Skorczewska, K., Szulc, J., Chmielnicki, B., Korol, J., Formela, K., 2021. Sustainable upcycling of brewers' spent grain by thermo-mechanical treatment in twin-screw extruder. *J. Clean. Prod.* 285, 124839.
- Hu, B-B., Li, M-Y., Wang, Y-T., Zhu, M-J., 2018. Enhanced biohydrogen production from dilute acid pretreated sugarcane bagasse by detoxification and fermentation strategy. *Int. J. Hydrogen. Energ.* 43, 19366-19374.

- Huang, H.-J., Ramaswamy, S., Liu, Y., 2014. Separation and purification of biobutanol during bioconversion of biomass. *Sep. Purif. Technol.* 132, 513-540
- Iftikhar, Y., Weijun, H., Zhaohua, W., 2016. Energy and CO<sub>2</sub> emissions efficiency of major economies: A nonparametric analysis. *J. Clean Prod.* 134, 779-787.
- Jones, D.T., Woods, D.R., 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiol. Rev.* 50, 484-524.
- Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Biores. Technol.* 199, 103–112.
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* 6, 16-26.
- Kazemi Shariat Panahi, H., Dehghani, M., Kinder, J.E., Ezeji, T.C., 2019. A review on green liquid fuels for the transportation sector: a prospect of microbial solutions to climate change. *Biofuel Res. J.* 23, 995-1024.
- Khayet, M., 2011. Membranes and theoretical modeling of membrane distillation: a review. *Adv Colloid Interface Sci* 164, 56–88.
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B. & Ahring, B., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 66, 10–26.
- Kujawska, A., Kujawski, J., Bryjak, M., Kujawski, W., 2015. ABE fermentation products recovery methods—A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 48, 648–661.
- Kujawska, A., Kujawski, J., Bryjak, M., Kujawski, W., 2016. Removal of volatile organic compounds from aqueous solutions applying thermally driven membrane processes. 2. Air gap membrane distillation. *J. Membr. Sci.* 499, 245-256.
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., Verma, P., 2020. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Process Technol.* 199, 106244
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol. Prog.* 25, 302-314.
- Lee, K.M., Kim, K.Y., Choi, O., Woo, H.M., Kim, Y., Han, S.O., Sang, B.I., Um, Y., 2015a. In situ detoxification on lignocellulosic hydrolysate using a surfactant for butyric acid production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC25755. *Process Biochem.* 50, 630-635.
- Lee, K.M., Min, K., Choi, O., Kim, K.Y., Woo, H.M., Kim, Y., Han, S.O., Um, Y., 2015b. Electrochemical detoxification of phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysate for *Clostridium* fermentation. *Bioresour. Technol.* 187, 228-234.
- Levario, T.J., Dai, M.Z., Yuan, W., Vogt, B.D., Nielsen, D.R., 2012. Rapid adsorption of alcohol biofuels by high surface area mesoporous carbons. *Microporous Mesoporous Mater* 148, 107–114.
- Li, H., Qu, Y., Yang, Y., Chang, S., Xu, J., 2016. Microwave irradiation – A green and efficient way to pretreat biomass. *Review. Biores. Technol.* 199, 24-41.

- Liew, S.T., Arbakariya, A., Rosfarizan, M., Raha, A.R., 2005. Production of solvent (acetone–butanol–ethanol) in continuous fermentation by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 using gelatinised Sago starch as a carbon source. *Malays. J. Microbiol.* 2, 42-45.
- Liu, C., Wyman, C.E., 2003. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 5409–5416.
- López-Linares, J.C., García-Cubero, M.T., Lucas, S., González-Benito, G., Coca, M., 2019. Microwave assisted hydrothermal as greener pretreatment of brewer's spent grains for biobutanol production. *Chem. Eng. J.* 368, 1045-1055
- Lourenço, A., Pereira, H., 2017. Compositional Variability of Lignin in Biomass. <https://www.intechopen.com/books/lignin-trends-and-applications/compositional-variability-of-lignin-in-biomass>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Lu, C., Dong, J., Yang, S., 2013. Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation–gas stripping process. *Bioresour. Technol.* 143, 467–475.
- Luyben W.L., 2008. Control of the heterogeneous azeotropic n-butanol/water distillation system. *Energy Fuels* 22, 4249–4258.
- Ma, H., Ji, X., Tian, Z., Fang, G., Yang, G., 2017. Adsorption removal of inhibiting compounds by modified activated carbon. *J. Energy Nat. Resour.* 6 (2), 24–30.
- Ma, K., Ruan, Z., 2015. Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous biodelignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. *Bioresour. Technol.* 175, 586-593.
- Maiti S, Sarma SJ, Brar SK, Bihan YL, Drogui P, Buelna G, Verma M., 2016. Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. *Food Bioproducts Processing* 98, 217-226.
- Marchal, R., Blanchet, D., Vandecasteele, J.P., 1985. Industrial optimization of acetone–butanol fermentation: a study of the utilization of Jerusalem artichokes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 92-98.
- Marchal, R., Rebeller, M., Vandecasteele, J.P., 1984. Direct bioconversion of alkali-pretreated straw using simultaneous enzymatic hydrolysis and acetone butanol production. *Biotechnol. Lett.* 6, 523-528.
- Mariano, A.P., Keshtkar, M.J., Atala, D.I.P, Mauger, F., Maciel, M.R.W., Maciel, R., 2011. Energy requirements for butanol recovery using the flash fermentation technology. *Energy Fuels* 25, 2347-2355.
- Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O., 2000. Effects of Ca(OH)<sub>2</sub> treatments ('overliming') on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 526-536.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014. Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España. Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones, Madrid.
- Muller, M, Pons, M.N., 1991. Coupling of gas membrane smooth pervaporation and alcoholic fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52, 343–358.

- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F., Roberto, I.C., 2008. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 124-129.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour. Technol.* 93, 1–10.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2006. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 268-274.
- Nan, Y., Yang, M., Xin, D., Li, K., Kuittinen, S., Pappinen, A., Zhang, J. 2019. Acetone-butanol-ethanol solvents improved enzymatic hydrolysis of pretreated energy grass. *Fuel* 245, 406-412.
- Nanda, S., Dalai, A.K., Kozinski, J.A., 2014. Butanol and ethanol production from lignocellulosic feedstock: biomass pretreatment and bioconversion. *Energy Sci. Eng.* 2, 138-148.
- Nanda, S., Golemi-Kotrab, D., McDermott, J.C., Dalaic, A.K., Gökalpd, I., Kozinskia, J.A., 2017. Fermentative production of butanol: Perspectives on synthetic biology. *New Biotech.* 37, 210-221.
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M.E., Marzocchella, A., Salatino, P., 2010. Production of butanol in a continuous packed bed reactor of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 603–608.
- Nguyen, N., Fargues, C., Guiga, W., Lameloise, M.L., 2015. Assessing nanofiltration and reverse osmosis for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *J. Membrane Sci.* 487, 40-50.
- Nocera, S., Cavallaro, F., 2016. The competitiveness of alternative transport fuels for CO<sub>2</sub> emissions. *Transport Policy* 50, 1-14.
- Oliva, J.M., 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión de vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis Doctoral, Madrid, España.
- Oudshoorn, A., van der Wielen, L.A.M., Straathof, A.J.J., 2009. Assessment of options for selective 1-butanol recovery from aqueous solution. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 7325–36.
- Padilla-Rascón, C., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Manzanares, P., 2020. Valorisation of olive stone by-product for sugar production using a sequential acid/steam explosion pretreatment. *Ind. Crop. Prod.* 148, 112279.
- Palmowski, L., Muller, J., 1999. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. In: II International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste, Barcelona, 137-144.
- Paniagua-García, A.I., Hijosa-Valsero, M., Díez-Antolínez, R., Sánchez, M.E., Coca, M., 2018. Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: The case of *Panicum virgatum*. *Biomass Bioenerg.* 116, 131-139.
- Parekh, S.R., Parekh, R.S., Wayman, M., 1988. Ethanol and butanol production by fermentation of enzymatically saccharified SO<sub>2</sub>-prehydrolysed lignocellulosics. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 660-668.

- Patrascu, I., Bîldea, C.S., Kiss, A.A., 2017. Eco-efficient butanol separation in the ABE fermentation process. *Sep. Purif. Technol.* 177, 49-61.
- Pérez-González, A, Urtiaga, A.M., Ibanez, R., Ortiz, I., 2012. State of the art and review on the treatment technologies of water reverse osmosis concentrates. *Water Res.* 46, 267–283.
- Pinheiro, T., Coelho, E., Romani, A., Domingues, L., 2019. Intensifying ethanol production from brewer's spent grain waste: Use of whole slurry at high solid loadings. *New Biotechnol.* 53, 1-8.
- Plaza, P.E., Gallego-Morales, L.J., Peñuela-Vásquez, M., Lucas, S., García-Cubero, M.T., Coca, M., 2017. Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*. *Bioresour. Technol.* 244, 166-174.
- Plan de Energías Renovables 2011-2020. Ministerio de Industria, Turismo y Comercio.
- Prinsen, P., 2010. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Trabajo de fin de Máster, Universidad de Sevilla.
- PRNewsWire, 2018. <https://www.prnewswire.com/news-releases/n-butanol-report-2018-2022-global-5-58-bn-market-driven-by-growing-construction-industry-in-emerging-economies-300652807.html>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Purwandari, F.A., Sanjaya, A.P., Millati, R., Cahyanto, M.N., Horváth, I.S., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2013. Pretreatment of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) by N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO) for biogas production: Structural changes and digestion improvement. *Biores. Technol.* 128, 461-466.
- Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2000. Butanol Production Using *Clostridium beijerinckii* BA101 Hyper-Butanol Producing Mutant Strain and Recovery by Pervaporation. *Appl. Biochem.* 84-86, 225-235.
- Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2001. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renewable Energy* 22, 557–64.
- Qureshi, N., Ezeji, T.C., Ebener, J, Dien, B.S., Cotta, M.A., Blaschek, H.P., 2008a. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresour. Technol.* 99, 5915-5922.
- 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. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 185-189.
- Qureshi, N. Maddox, S. 2005 Reduction in Butanol Inhibition by Perstraction: Utilization of Concentrated Lactose/Whey Permeate by *Clostridium acetobutylicum* to Enhance Butanol Fermentation Economics. *Food Bioprod. Process.* 83, 43-52.
- Qureshi, N., Saha, B.C., Cotta, M.A., 2008b. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: part II – fed-batch fermentation. *Biomass Bioenergy* 32, 176-183.

- Qureshi, N., Saha, B.C., Dien, B., Hector, R.E., Cotta, M.A., 2010a. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: part I – use of barley straw hydrolysate. *Biomass Bioenergy* 4, 559-565.
- Qureshi, N., Saha, B.C., Hector, R.E., Dien, B., Hughes, S., et al., 2010b. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: part II – use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass Bioenergy* 34, 566-571.
- Qureshi, N., Saha, B.C., Hector, R.E., Hughes, S.R., Cotta, M.A., 2008c. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: part I—batch fermentation. *Biomass Bioenergy* 32, 168-175.
- Ramachandran, V., Ismail, F.S., Noor, M.J.M.M., Akhir, F.N.M.D., Othman, N., Zakaria, Z., Hara, H., 2020. Extraction and intensive conversion of lignocellulose from oil palm solid waste into lignin monomer by the combination of hydrothermal pretreatment and biological treatment. *Bioresour. Technol. Rep.* 11, 100456.
- Red Eléctrica de España, 2019. Las energías renovables en el sistema eléctrico español. [https://www.ree.es/sites/default/files/11\\_PUBLICACIONES/Documentos/Renovables-2018.pdf](https://www.ree.es/sites/default/files/11_PUBLICACIONES/Documentos/Renovables-2018.pdf). Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Ren21, 2019. Global status report 2018. [https://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/GSR2018\\_Full-Report\\_English.pdf](https://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/GSR2018_Full-Report_English.pdf). Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Robertson, J.A., l'Anson, K.J.A., Treimo, J., Faulds, Brocklehurst, C.B.T.F., Eijsink, V.G.H., Waldron, K.W., 2010. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 890–896
- Rodionova, M.V., Poudyal, R.S., Tiwari, I., Voloshin, R.A., Zharmukhamedov, S.K., Nam, H.G., Zayadan, B.K., Bruce, B.D., Hou, H.J.M., Allakhverdiev, S.I., 2017. Biofuel production: Challenges and opportunities. *Int. J. Hydrogen Energ.* 42, 8450-8461.
- Roffler, S., Blanch, H.W., Wilke, C.R., 1987. Extractive fermentation of acetone and butanol—process design and economic evaluation. *Biotechnol Prog.* 3, 131–141.
- Roque, L.R., Morgado, G.P., Nascimento, V.M., Ienczak, J.L., Rabelo, S.C., 2019. Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. *Fuel* 242, 775-787.
- Roy, R., Rahman, Md S., Raynie, D.E., 2020. Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* 3, 100035.
- Rozicka, A., Niemisto, J., Keiski, R.L., Kujawski, W., 2014. Apparent and intrinsic properties of comercial PDMS based membranes in pervaporative removal of acetone, butanol and etanol from binary aqueous mixtures. *J. Membr. Sci.* 453, 108–118.
- Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F.M., Marchettini, N., Bastianoni, S., 2016. Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 66, 221-227.
- Santander, P., Butter, B., Oyarce, E., Yáñez, M., Xiao, L-P., Sánchez, J., 2021. Lignin-based adsorbent materials for metal ion removal from wastewater: A Review. *Ind. Crop. Prod.* 167, 113510.

- Setlhaku M, Heitmann S, Gorak A, Wichmann R., 2013. Investigation of gas stripping and pervaporation for improved feasibility of two-stage butanol production process. *Bioresour. Technol.* 136, 102-108.
- Sevilla, B., 2020. <https://es.statista.com/estadisticas/635382/emisiones-historcias-de-co2-globales/>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Sevilla, B., 2020. <https://es.statista.com/estadisticas/635114/precio-medio-del-crudo-fijado-por-la-opec/>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Shen, X., Sun, R., 2021. Recent advances in lignocellulose prior-fractionation for biomaterials, biochemicals, and bioenergy. *Carbohydr. Polym.* 261, 117884.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresour. Technol.* 199, 76-82.
- Soleimani, M., Tabil, L., Niu, C., 2015. Adsorptive isotherms and the removal of microbial inhibitors in a bio-based hydrolysate for xylitol production. *Chem. Eng. Commun.* 202, 787-798.
- Sombrutai, W., Takagi, M., Yoshida, T., 1996. Acetone-butanol fermentation by *Clostridium aurantibutyricum* ATCC 17777 from a model medium for palm oil mill effluent. *J. Ferment. Bioeng.* 81, 543-547.
- Soni, B.K., Das, K., Ghose, T.K., 1982. Bioconversion of agro-wastes into acetone butanol. *Biotechnol. Lett.* 4, 19-22.
- Staggs, K.W., Nielsen, D.R., 2015. Improving n-butanol production in batch and semi-continuous processes through integrated product recovery. *Process Biochem.* 50, 1487-1498.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R., 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* 199, 49-58.
- Tandon, P., Jin, Q., 2017. Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 80, 1089-1099.
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Yoshino, S., 2004. High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fedbatch culture with pH-stat continuous butyric acid and glucose feeding method. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 263-268.
- The Brewers of Europe, 2019. Key facts and figures. <https://brewersofeurope.org/site/countries/key-facts-figures.php>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- The Barth report, 2019. [https://www.barthhaas.com/fileadmin/user\\_upload/news/2019-07-23/barthreport20182019en.pdf](https://www.barthhaas.com/fileadmin/user_upload/news/2019-07-23/barthreport20182019en.pdf). Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- The Earth Project, 2021. <https://theearthproject.com/biomass-energy-types/>. Fecha de consulta 14 de junio de 2021
- Tomaszewska, M., 2000. Membrane distillation—examples of applications in technology and environmental protection. *Pol. J. Environ. Stud.* 9, 27–36.

- Tengborg, C., Stenberg, K., Galbe, M., Zacchi, G., Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 1998. Comparison of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70, 3-15.
- Tran, H.T.M., Cheirsilp, B., Hodgson, B., Umsakul, K., 2010. Potential use of *Bacillus subtilis* in a co-culture with *Clostridium butylicum* for acetone–butanol–ethanol production from cassava starch. *Biochem. Eng. J.* 48, 260-267.
- van Wyk, S., van der Ham, A.G.J., Kersten, S.R.A., 2018. Pervaporative separation and intensification of downstream recovery of acetone-butanol-ethanol (ABE). *Chem. Eng. Process.* 130, 148-159.
- Veza, I., Said, M.F.M., Latiff, Z.A., 2021. Recent advances in butanol production by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. *Biomass Bioenerg.* 144, 105919.
- Vieira, E., M. Rocha, M.A.M., Coelho, E., Pinhoa, O., Saraiva, J.A., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Coimbra, M.A., 2014. Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Ind. Crop. Prod.* 52, 136-143.
- Vignesh, N., Chandraraj, K., 2021. Improved high solids loading enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton microdust by surfactant addition and optimization of pretreatment. *Process. Biochem.* 106, 60-69.
- Voget, C.E., Mignone, C.F., Ertola, R.J., 1985. Butanol production from apple pomace. *Biotechnol. Lett.* 7, 43-46.
- Wagner, E., Pería, M.E., Ortiz, G.E., Rojas, N.L., Ghiringhelli, P.D., 2021. Valorization of brewer's spent grain by different strategies of structural destabilization and enzymatic saccharification. *Ind. Crop. Prod.* 163, 113329.
- Wijmans, J.G., Baker, R.W., 1995. The solution–diffusion model—a review. *J. Membr. Sci.* 107, 1–21.
- Wilkinson, S., Smart, K.A., Cook, D.J., 2014. Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production. *Ind. Crops. Prod.* 62, 219-227.
- World Bioenergy Association, 2019. WBA Global Bioenergy Statistics 2019. [https://worldbioenergy.org/uploads/191129%20WBA%20GBS%202019\\_HQ.pdf](https://worldbioenergy.org/uploads/191129%20WBA%20GBS%202019_HQ.pdf). Fecha de consulta 14 de junio de 2021.
- Wyman, C.E., 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.* 50, 3-16.
- Wyman, C., 1996. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor and Francis, Washington, DC, USA.
- Xiang, C., Tian, D., Hu, J., Huang, M., Shen, F., Zhang, Y., Yang, G., Zeng, Y., Deng, S., 2021. Why can hydrothermally pretreating lignocellulose in low severities improve anaerobic digestion performances? *Sci. Total. Environ.* 752, 141929.
- Xue, C., Du, G.Q., Sun, J.X., Chen, L.J., Gao, S.S., Yu, M.L., 2014. Characterization of gas stripping and its integration with acetone–butanol–ethanol fermentation for high-efficient butanol production and recovery. *Biochem. Eng. J.* 83, 55–61.

- Xue, C., Zhao, X-Q., Liu, C-G., Chen, L-J., Bai, F-W., 2013. Prospective and development of butanol as an advanced biofuel. *Biotechnol. Adv.* 31, 1575-1584.
- Yan, K., Yang, Y., Chai, J., Lu, Y., 2015. Catalytic reactions of gamma-valerolactone: A platform to fuels and value-added chemicals. *Appl. Catal. B-Environ.* 179, 292-304.
- Yu, Y., Christopher, L.P., 2017. Detoxification of hemicellulose-rich poplar hydrolysate by polymeric resins for improved ethanol fermentability. *Fuel* 203, 187-196.
- Zhang, J., Wang, Q., 2016. Sustainable mechanisms of biochar derived from brewers' spent grain and sewage sludge for ammonia nitrogen capture. *J. Clean. Prod.* 112, 3927-3934.
- Zhang, Y., Xia, C., Lu, M., Tu, M., 2018. Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. *Biotechnol. Biofuels.* 11, 178.
- Zhang, C., Si, Z., Chen, B., Chen, C., Chen, H., Ren, W., Cheng, S., Li, S., Cai, D., Qin, P., 2021. Co-generation of acetone-butanol-ethanol and lipids by a sequential fermentation using *Clostridia acetobutylicum* and *Rhodotorula glutinis*, spaced-out by an ex-situ pervaporation step. *J. Clean. Prod.* 285, 124902.
- Zhang, Z., Song, J., Han, B., 2017. Catalytic Transformation of Lignocellulose into Chemicals and Fuel Products in Ionic Liquids. *Chem. Rev.* 117, 6834-6880.
- Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6, 561-579.
- Zhen, X., Wang, Y., Liu, D., 2020. Bio-butanol as a new generation of clean alternative fuel for SI (spark ignition) and CI (compression ignition) engines. *Renew. Energy* 147, 2494-2521.
- Zhu, J., Wan, C., Li, Y., 2010. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. *Bioresour. Technol.* 101, 7523-7528.







# Capítulo 2

---

Justificación, objetivos y desarrollo experimental



## 2.1 Justificación

Las necesidades energéticas de la población mundial aumentan año tras año, generando grandes cantidades de contaminación, especialmente CO<sub>2</sub>, que es uno de los principales gases de efecto invernadero. Con el fin de solucionar los problemas de contaminación, en los últimos años ha aumentado la investigación en la obtención de biocombustibles para reducir el uso de combustibles fósiles. La producción de biocombustibles se puede realizar a partir de diversas materias primas vegetales, aunque se está dando prioridad al uso de materias primas que no son utilizadas para alimentación humana o animal para evitar el incremento de costes o de uso de los terrenos agrícolas.

Dentro de estas materias primas vegetales que han sido consideradas como residuos tradicionalmente, se encuentra el bagazo de cerveza, que gracias a su alto contenido en carbohidratos y proteínas ha sido utilizado comúnmente en alimentación de animales rumiantes. Este alto contenido en carbohidratos es lo que le hace especialmente atractivo para la producción de biocombustibles a través de procesos de fermentación. Debido a su alto contenido en lignina, es necesario llevar a cabo un pretratamiento que facilite la posterior hidrólisis enzimática para obtener hidrolizados ricos en azúcares fermentables. Tanto el pretratamiento como la hidrólisis enzimática necesitan una optimización que permita producir elevadas concentraciones de monosacáridos al menor coste posible para su uso en posteriores procesos de fermentación.

En los procesos de fermentación se pueden producir combustibles tanto gaseosos como líquidos, aunque estos últimos han sido los más producidos debido a su posibilidad de sustituir a la gasolina y gasoil, ya sea mezclándose con estos o sustituyéndoles totalmente. El biocombustible líquido más producido es el etanol, aunque la producción de butanol por métodos biológicos ha aumentado en interés, debido a sus mejores características, como un mayor poder energético, menor corrosividad, menor volatilidad, menor miscibilidad con el agua y posibilidad de ser transportado a través de redes ya existentes de tuberías. El butanol es producido por microorganismos de la familia *Clostridium*, como pueden ser *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* o *C. saccharoperbutylacetonicum*. Estos microorganismos son capaces de producir butanol a partir de diversos tipos de monosacáridos, lo cual les hace idóneos para la fermentación de hidrolizados obtenidos a partir de residuos vegetales que pueden contener mezclas de glucosa, xilosa y arabinosa, entre otros.

El principal problema de estos procesos de fermentación es la toxicidad del butanol que provoca que, en concentraciones bajas, el microorganismo se inhiba y detenga su metabolismo. Hay varias maneras de solventar este problema, como pueden ser la ingeniería genética aplicada a mejora de los microorganismos o los procesos de separación integrados con la fermentación.

El butanol producido a partir de residuos vegetales mediante procesos de fermentación es una alternativa a los combustibles fósiles. Sin embargo, queda un largo camino por recorrer para optimizar las diversas etapas del proceso de producción (pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y separación) y que pueda ser competitivo frente a la producción de butanol mediante la vía petroquímica.

## 2.2 Objetivos.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la optimización del proceso de obtención de biobutanol a partir de un residuo lignocelulósico de origen agroalimentario, como es el bagazo de cerveza. Para ello, se analizarán las diferentes etapas que componen el proceso global (pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y separación) con el fin de optimizar la producción de biobutanol. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la idoneidad del uso de bagazo de cerveza para la obtención de biobutanol, así como la influencia de la carga de sólidos en las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática con el fin de maximizar la producción de solventes utilizando *Clostridium beijerinckii* DSM 6422.
2. Establecer, si es necesario, estrategias de detoxificación de los hidrolizados enzimáticos obtenidos en un reactor de alta carga de sólidos, para seleccionar la alternativa que permita eliminar inhibidores con las menores pérdidas posibles de monosacáridos y conseguir concentraciones adecuadas de solventes en el proceso de fermentación ABE.
3. Analizar y optimizar el proceso de hidrólisis enzimática empleando un reactor de alta carga que permita operar con altas concentraciones de bagazo pretratado, de manera que se liberen concentraciones de monosacáridos elevadas que permitan obtener altas concentraciones de butanol en el posterior proceso de fermentación ABE.
4. Estudiar la eficacia de procesos integrados de fermentación/separación *in situ* mediante gas-stripping que permitan superar las limitaciones del microorganismo debido a inhibición por producto y aumentar la concentración y producción de butanol apoyándose en estrategias de alimentación fed-batch con el fin de reducir los costes de purificación de butanol.

## 2.3 Desarrollo experimental.

Con el fin de alcanzar los objetivos generales y específicos propuestos (Figura 2.1), se planificó la Tesis Doctoral en cuatro apartados que se describen a continuación:

### Artículo 1 (Capítulo 3)

En el primer artículo se estudió el proceso de fermentación ABE a partir de las condiciones de pretratamiento seleccionadas en el Trabajo de Fin de Máster. Se realizaron experimentos con diversas cargas de sólidos en el pretratamiento y se analizó la influencia de esta variable sobre la liberación de monosacáridos y compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación ABE. Se fermentaron los líquidos de pretratamiento e hidrolizados enzimáticos producidos a partir de bagazo de cerveza, para producir butanol utilizando como microorganismo *C. beijerinckii*.

### Artículo 2 (Capítulo 4)

En el segundo artículo se llevaron a cabo experimentos con diversas cargas de sólidos en las etapas de pretratamiento (15% m/m MS) e hidrólisis enzimática (10, 15 y 20% m/m MS) para determinar la liberación de monosacáridos y de inhibidores, en especial de compuestos fenólicos. Se realizaron experimentos de detoxificación con carbón activo y con óxido de calcio (overliming) con el fin de eliminar los inhibidores (furanos, ácido acético y compuestos fenólicos) y cuantificar pérdidas de monosacáridos durante el proceso de detoxificación y seleccionar el más adecuado con el objetivo de maximizar la producción de butanol.

### Artículo 3 (Capítulo 5)

En el tercer artículo se planificó un diseño de experimentos mediante un software estadístico con el fin de optimizar la concentración de sólidos y la carga de enzimas en la hidrólisis enzimática de forma que se pudiera maximizar la recuperación de monosacáridos y minimizar la liberación de compuestos inhibidores de la fermentación ABE, en concreto compuestos fenólicos. Se realizaron ensayos de fermentación con los hidrolizados enzimáticos obtenidos para analizar su fermentabilidad y la influencia de la carga de sólidos sobre la producción de butanol.

### Artículo 4 (Capítulo 6)

En el cuarto artículo se estudió la integración de los procesos de fermentación y separación de manera simultánea con el fin de mejorar la producción de solventes por parte del microorganismo, obtener una corriente concentrada en butanol y reducir de esta manera, los costes de purificación del butanol. Para ello, se utilizaron líquidos de pretratamiento e hidrolizados enzimáticos obtenidos a partir de bagazo de cerveza en las condiciones establecidas en los capítulos anteriores. El uso de líquidos de pretratamiento en alimentación en continuo al biorreactor permite la integración de todos los hidrolizados generados durante el proceso de sacarificación del bagazo de cerveza. Se acopló al fermentador un sistema de gas-stripping para recuperar el butanol del medio de cultivo mediante arrastre con gas. Se estudiaron estrategias de alimentación fed-batch por pulsos con disoluciones modelo de

monosacáridos concentrados y alimentación continua con líquidos de pretratamiento para aumentar la producción de butanol y determinar la estrategia de alimentación más adecuada.

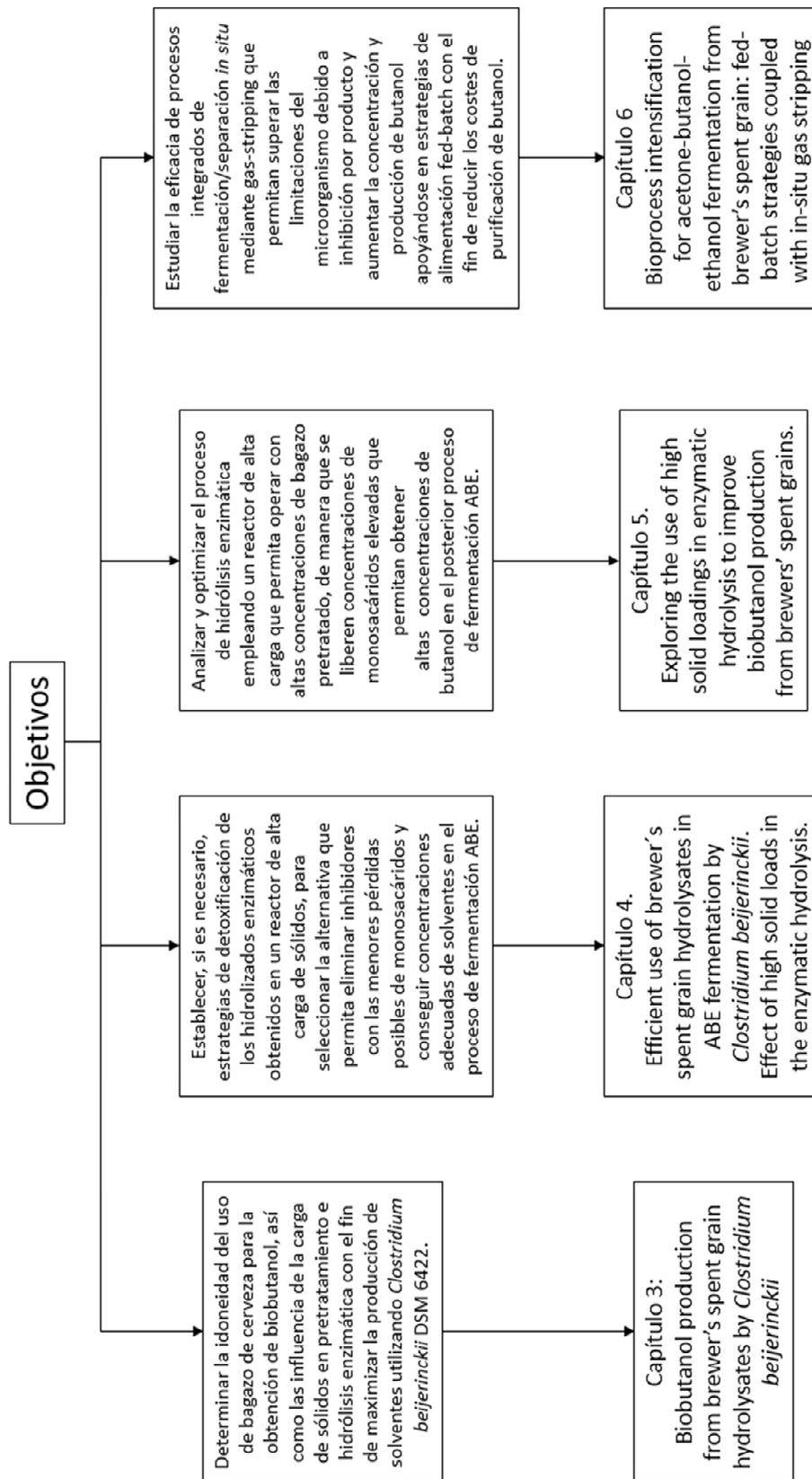


Figura 2.1: Objetivos principales de la tesis y correspondencia con capítulos.





# Capítulo 3

---

Biobutanol production from  
brewer's spent grain hydrolysates  
by *Clostridium beijerinckii*



Pedro E Plaza, Luis Javier Gallego-Morales, Mariana Peñuela-Vásquez, Susana Lucas, M Teresa García-Cubero, Mónica Coca. Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*. *Bioresource Technology* 244, (2017), 166-174.

<https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.139>







# Capítulo 4.

---

Efficient use of brewer's spent grain hydrolysates in ABE fermentation by *Clostridium beijerinckii*. Effect of high solid loads in the enzymatic hydrolysis.



Pedro E. Plaza, Mónica Coca, Susana Lucas Yagüe, Marina Fernández-Delgado, Juan Carlos López Linares, M. Teresa García-Cubero. Efficient use of brewer's spent grain hydrolysates in ABE fermentation by *Clostridium beijerinckii*. Effect of high solid loads in the enzymatic hydrolysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 95 (2020), 2393-2402.

DOI:10.1002/jctb.6421







# Capítulo 5

---

Exploring the use of high solid loadings in enzymatic hydrolysis to improve biobutanol production from brewers' spent grains.



Pedro E. Plaza, Mónica Coca, Susana Lucas Yagüe, Marina Fernández-Delgado, Juan Carlos López Linares, M. Teresa García-Cubero. Exploring the use of high solid loadings in enzymatic hydrolysis to improve biobutanol production from brewers' spent grains. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 99, Issue 12, (2021), 2607-2618.

<https://doi.org/10.1002/cjce.24150>

*Exploring the use of high solid loadings in enzymatic hydrolysis to improve biobutanol production from brewers' spent grains.*

---





# Capítulo 6

---

Bioprocess intensification for  
acetone-butanol-ethanol  
fermentation from brewer's spent  
grain: fed-batch strategies coupled  
with *in-situ* gas stripping



Pedro E. Plaza, Mónica Coca Susana Lucas Yagüe, Gloria Gutiérrez, Eloísa Rochón, M. Teresa García-Cubero. Bioprocess intensification for acetone-butanol-ethanol fermentation from brewer's spent grain: fed-batch strategies coupled with *in-situ* gas stripping. *Biomass and Bioenergy* 156 (2022).

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106327>







# Capítulo 7

---

## Conclusiones



En esta Tesis Doctoral se han analizado las diferentes etapas que componen la producción de biobutanol de segunda generación a partir de bagazo de cerveza. En la etapa de pretratamiento se investigó la influencia de la carga de sólidos sobre la liberación de monosacáridos. Respecto a la etapa de hidrólisis enzimática, se ha analizado la influencia de la carga de sólidos sobre la liberación de monosacáridos e inhibidores (ácidos orgánicos, furanos y compuestos fenólicos). Asimismo, se evaluaron diferentes procesos de detoxificación para la eliminación de dichos inhibidores y se optimizó la carga de sólidos y enzimas con el fin de maximizar la liberación de monosacáridos y minimizar la producción de compuestos fenólicos. Respecto a la etapa de fermentación, se ha determinado si los hidrolizados producidos a partir de bagazo de cerveza son adecuados para la producción de biobutanol utilizando *C. beijerinckii* DSM 6422. Por último, se ha analizado la producción de butanol mediante procesos fed-batch con gas-stripping acoplado, lo que permite recuperar el butanol del medio de fermentación a la vez que se va produciendo.

Del tercer capítulo se extraen las siguientes conclusiones:

- Las concentraciones de monosacáridos obtenidas en los líquidos de pretratamiento aumentaron al incrementarse la carga de sólidos (16.3 g/L para carga de sólidos del 5% m/m MS frente a 47 g/L para carga de sólidos del 15% m/m MS), lo que provocó que se obtuviera una concentración de butanol mayor (3,0 g butanol/L para carga de sólidos del 5% m/m MS frente a 6,5 g butanol/L para carga de sólidos del 15% m/m MS). Esto indica que es más adecuado llevar a cabo el pretratamiento a una carga de sólidos alta (15% m/m MS).
- En los ensayos de hidrólisis enzimática se observó que el lavado del material pretratado con agua entre ambas etapas mejora la producción de butanol (observándose un aumento de 4 a 6 g butanol/L) debido a que se reduce la concentración de compuestos inhibidores de la fermentación ABE como pueden ser los furanos, ácido acético y compuestos fenólicos.

El cuarto capítulo arrojó las siguientes conclusiones:

- El uso de procesos de alta carga de sólidos produjo elevadas concentraciones de monosacáridos con el inconveniente de la generación de compuestos inhibidores en concentraciones que pueden ser perjudiciales para los procesos de fermentación ABE.
- Se ha demostrado que la concentración de butanol a partir de los líquidos de pretratamiento mejoró después de un proceso de detoxificación, en especial cuando se utilizó carbón activo (9,0 g butanol/L sin detoxificar frente a 11,5 g butanol/L después de detoxificación), siendo esto debido a la reducción de la concentración de los compuestos inhibidores, en especial de los compuestos fenólicos.
- En el caso de los hidrolizados enzimáticos, el aumento de la carga de sólidos desde el 10% hasta el 20% m/m MS mejoró la liberación de monosacáridos,

pero también la liberación de compuestos inhibidores. Al aumentar la carga de sólidos del 10 al 15% m/m MS, se hizo necesaria la aplicación de un proceso de detoxificación para mejorar la producción de butanol (de 5,0 a 11,8 g butanol/L para la detoxificación secuencial con carbón activo y overliming). Sin embargo, cuando la carga de sólidos aumentó hasta el 20%, ninguno de los procesos de detoxificación permitió producir butanol, probablemente debido a inhibición por concentraciones muy altas de compuestos fenólicos y de sustrato.

Del quinto capítulo se extrajeron las siguientes conclusiones:

- El diseño de experimentos mediante software estadístico permitió encontrar valores óptimos para maximizar la liberación de monosacáridos y minimizar la producción de compuestos fenólicos, correspondiéndose con una carga de sólidos del 28,1% m/m MS y una carga de enzimas celulasas del 15,4% FPU/g MS.
- La mayor concentración de lignina observada en la composición del bagazo utilizado en esta experimentación influyó sobre la liberación de monosacáridos y de compuestos inhibidores, obteniéndose concentraciones más bajas que las encontradas en capítulos anteriores.

El sexto capítulo permitió obtener las siguientes conclusiones:

- Las dos estrategias de alimentación investigadas (alimentación por pulsos y alimentación en continuo) permiten aumentar la concentración de butanol respecto a procesos de fermentación discontinuos convencionales (13,2 g butanol/L de máximo), a la vez que se obtienen condensados procedentes del gas-stripping con altas concentraciones de butanol (máximo de 78 g butanol/L).
- El uso del líquido obtenido en el pretratamiento como alimentación continua al biorreactor rindió concentraciones altas de butanol (10.2 g/L) a la vez que permite mantener concentraciones de butanol más estables en los condensados (media de 65 g/L frente a 50 g/L de media para la alimentación con pulsos).

Como conclusión global se puede afirmar que el bagazo de cerveza es una materia prima adecuada para la producción de biocombustibles de segunda generación, evitando el uso de materias primas alimentarias. Mediante la utilización de condiciones suaves de operación y cargas de sólidos moderadas tanto en el pretratamiento como en la hidrólisis enzimática, se liberan concentraciones elevadas de monosacáridos potencialmente fermentables. También se liberan compuestos fenólicos potencialmente inhibidores de la posterior etapa de fermentación, dificultad que es posible solventar con el uso de procesos de detoxificación sencillos como son el overliming y la adsorción con carbón activo. Tanto el líquido obtenido durante el pretratamiento como el hidrolizado enzimático procedente de la sacarificación del sólido pretratado rinden concentraciones elevadas de butanol al llevar a cabo la fermentación con el microorganismo *C. beijerinckii*. En los ensayos de fermentación hay inhibición por producto, de forma que al alcanzarse una determinada concentración de butanol. El microorganismo no es capaz de producir más, aunque sigan quedando monosacáridos metabolizables en el medio. Para solucionar este problema se implementó un sistema de gas-stripping simultáneo a la fermentación, alcanzándose concentraciones más altas de butanol, así como un condensado rico en butanol, lo que permitirá reducir costes energéticos en posteriores etapas de purificación.

## Trabajo futuro

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante el trabajo experimental de esta Tesis, la futura investigación en este campo podría abordar los siguientes retos:

- Nuevos pretratamientos que sean capaces de recuperar más monosacáridos generando menos compuestos inhibidores, a la vez que utilizan cantidades más reducidas de catalizadores como pueden ser los pretratamientos emergentes tales como el microondas.
- Uso de cócteles de enzimas que permitan extraer la totalidad de los azúcares presentes en el material pretratado, tanto los azúcares presentes en la celulosa como los presentes en la hemicelulosa, mediante combinaciones de celulasas, xilanasas y pectinasas.
- Utilización de métodos de detoxificación que permitan eliminar concentraciones mayores de inhibidores a la vez que minimizan las pérdidas de monosacáridos asociadas a estos procesos, como puede ser el uso de resinas de intercambio iónico o lacasas.
- Investigar nuevas estrategias de adaptación de microorganismos que permitan aumentar la tolerancia tanto a la presencia de compuestos inhibidores como de los solventes producidos en la fermentación.
- Optimización de la operación de fermentación en continuo con gas-stripping acoplado, analizando el efecto del flujo de alimentación con el objetivo de aumentar los tiempos de operación y obtener condensados con altas concentraciones de butanol.





# Anexos



## Asistencia a congresos

- M. Teresa Garcia-Cubero, Pedro Plaza, Monica Coca, Susana Lucas, Gerardo Gonzalez-Benito. Autohydrolysis of brewer's spent grain (BSG) as pretreatment for the production of liquid biofuels. ECB 2016, 3-6 July 2016. Krakow, Polonia.
- P.E. Plaza, M. Coca, G. González-Benito, S. Lucas, M.T García-Cubero. Solids loading influence on brewers' spent grain saccharification for production of butanol by way of *C. beijerinckii* DSM 6422. ECO-BIO 2018, 4-7 March 2018. Dublin, Ireland.
- M. Fernández-Delgado, P.E. Plaza, G. González-Benito, S. Lucas, M.T García-Cubero, M. Coca. Chemical pretreatment of brewer's spent grain (BSG) for ABE solvents production by *C. beijerinckii* fermentation. ECO-BIO 2018, 4-7 March 2018. Dublin, Ireland.
- E. Rochón, P.E. Plaza, C. Lareo, M. Coca, S. Lucas, M.T García-Cubero. Improvement of Brewer's spent grain fermentation by *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 by in situ product recovery. EUBCE 2018, 14-17 May 2018. Copenhagen, Denmark.
- P.E. Plaza, M. Coca, G. González-Benito, S. Lucas, M.T García-Cubero. Brewer's Spent Grain as a potential raw material for butanol production. Influence of autohydrolysis pH in monosaccharides release. EUBCE 2018, 14-17 May 2018. Copenhagen, Denmark.
- P.E. Plaza. Obtención de Biobutanol a partir del residuo sólido de la industria cervecera. Estudio de alternativas y optimización de variables de proceso. I Jornadas Doctorales en Energías Renovables. 9-11 de Mayo de 2018. Jaén, España.
- P.E. Plaza. Obtención de Biobutanol a partir del residuo sólido de la industria cervecera. Estudio de alternativas y optimización de variables de proceso. V Jornada Doctorandos Programa de Doctorado en Ingeniería Industrial. 2 de Julio de 2018. Valladolid, España.
- Plaza, P.E., Fernández-Delgado, M., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T. Ozone as an efficient pretreatment for lignocellulosic biomass to obtain oxygenated biofuels. 4º Congreso Iberoamericano sobre Biorrefinerías (4-CIAB). 24-26 Octubre de 2018. Jaén, España.
- Pedro E. Plaza, Juan C. López-Linares, Susana Lucas, Gerardo González-Benito, Mónica Coca, M. Teresa García-Cubero. ION EXCHANGE RESINS: AN ALTERNATIVE FOR THE REMOVAL OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM BREWER'S SPENT GRAIN. Congreso ECCE12-ECAB5, Florencia, 15-19 de septiembre de 2019.
- Pedro E. Plaza. Obtención de Biobutanol a partir del residuo sólido de la industria cervecera. Estudio de alternativas y optimización de variables de proceso. VI jornada de doctorandos del programa de doctorado en Ingeniería

Industrial. Organizado por el comité académico del programa de doctorado en Ingeniería Industrial.

- Congreso innovación docente CINDU 2021:
  - Propuesta de clase inversa en la asignatura Tecnología Ambiental y de Procesos. VII Congreso Internacional de Docencia Universitaria. 14-17 Junio de 2021. Vigo, España.
  - Actividades docentes y herramientas de evaluación en la asignatura Introducción a la Ingeniería Química para cumplir con los requisitos de acreditación EUR-ACE®. VII Congreso Internacional de Docencia Universitaria. 14-17 Junio de 2021. Vigo, España

## Publicaciones

- Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*. Pedro E. Plaza, Luis Javier Gallego-Morales, Mariana Peñuela-Vásquez, M. Teresa García-Cubero, Mónica Coca. *Bioresour. Technol.* 244, 2017, 166-174.
- Comparison of mild alkaline and oxidative pretreatment methods for biobutanol production from brewer's spent grains. Fernández-Delgado, M., Plaza, P.E., Coca, M., González-Benito, G., Lucas, S. *Industrial Crops and Products* 130, 2019, 409–419.
- Efficient use of brewer's spent grain hydrolysates in ABE fermentation by *Clostridium beijerinckii*. Effect of high solid loads in the enzymatic hydrolysis. Pedro E Plaza, Mónica Coca, Susana Lucas, Marina Fernández-Delgado, Juan C López-Linares y María Teresa García-Cubero. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95, 2020, 2393-2402.
- Exploring the use of high solid loadings in Enzymatic hydrolysis to improve biobutanol production from brewers' spent grains. Pedro E Plaza, Mónica Coca, Susana Lucas, Marina Fernández-Delgado, Juan C López-Linares y María Teresa García-Cubero. *Can. J. Chem. Eng.* 99, 2021, 2607-2618.
- Bioprocess intensification for acetone-butanol-ethanol fermentation from brewer's spent grain: fed-batch strategies coupled with *in-situ* gas stripping. Pedro E. Plaza, Mónica Coca, Susana Lucas Yagüe, Gloria Gutiérrez, Eloísa Rochón, M. Teresa García-Cubero. *Biomass Bioenerg.* 156, 2022, 106327.



