



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Producción de ácidos grasos volátiles a partir de bagazo mediante fermentación anaerobia

Autor: D. Sergio Campano Méndez

Tutor: Cristina González Fernández

Valladolid, julio, 2025

Contenido

1.	Introducción	5
1.1.	Bagazo de cerveza	6
1.2.	Pretratamientos	7
1.3.	Digestión anaerobia	9
1.4.	Ácidos grasos volátiles	11
2.	Objetivo	14
3.	Materiales y métodos	15
3.1.	Fango anaerobio.....	15
3.2.	Caracterización del bagazo.....	15
3.2.1.	Pretratamiento	15
3.2.2.	Hidrolisis enzimática.....	16
3.3.	Operación de los reactores	16
3.3.1.	Preparación de la alimentación.....	16
3.3.2.	Diagrama de flujo	17
3.3.3.	Procedimiento experimental.....	18
3.4.	Métodos analíticos	19
4.	Resultado y discusión	22
4.1.	Pretratamiento del bagazo.....	22
4.2.	Hidrólisis enzimática del bagazo	23
4.3.	Experimento en reactores de tanque agitado semicontinuos para la producción de AGVs 24	
4.3.1.	Producción de AGVs	24
4.3.2.	Eliminación de DQO	28
4.3.3.	Mineralización del nitrógeno	30
5.	Conclusiones.....	31
6.	Bibliografía	32

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al personal del laboratorio del ISP por su colaboración y ayuda durante la realización de este TFM. Muy especialmente, agradezco a Claudia Chao, supervisora de mi trabajo en el laboratorio, por su guía, su compromiso y su disponibilidad en todo momento. Además, también quiero agradecer a mi tutora, Cristina González, la orientación y consejos que me ha brindado a lo largo de este trabajo.

También quiero dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermana, Marina, por ser un pilar esencial en mi vida. Su apoyo incondicional y su confianza en mí han sido esenciales a lo largo de este camino.

Resumen:

Este trabajo evaluó la viabilidad de la producción de AGVs, a partir de bagazo de cerveza, un producto de desecho, mediante la fermentación anaerobia.

El experimento se llevó a cabo en dos reactores semicontinuos de tanque agitado (25°C, pH 5.5-6 y 250 rpm). El reactor 1 fue alimentado con bagazo bruto, mientras que el reactor 2 se alimentó con bagazo pretratado mediante explosión de vapor (180°C 20 min). Adicionalmente, sobre este reactor 2 se trató de realizar una hidrólisis enzimática (Cellic CTec 3). No obstante, al no lograr solubilizar una gran cantidad de DQOs, se descartó la idea.

La explosión de vapor consiguió aumentar la disponibilidad de azúcares fermentables, lo que se reflejó en una mayor de producción de AGVs en el reactor 2, con una concentración de AGVs de 15.2 g/L y una bioconversión de 59.2%.

Los resultados obtenidos demostraron la viabilidad de la producción de AGVs a partir de bagazo, además de demostrar la eficacia del pretratamiento de explosión de vapor, así como, la poca eficacia de la hidrólisis enzimática.

Palabras claves: Bagazo, fermentación, ácidos grasos volátiles, pretratamiento y bioconversión.

Abstract

This study evaluated the feasibility of producing VFAs from brewer's spent grain, a waste product, through anaerobic fermentation.

The experiment was performance in two semi-continuous stirred tank reactors (25°C, pH 5.5-6 y 250 rpm). Reactor 1 was fed with raw spent grain, whereas reactor 2 received steam-exploded spent grain (180°C 20 min). Additionally, for reactor 2 an enzymatic hydrolysis using Cellic CTec 3 was performed. However, since significant solubilization of DQO was not achieve, the idea was abandoned.

Steam explosion successfully increased the availability of fermentable sugar, which led to higher production of VFAs in reactor 2, reaching a concentration of 15.2 g/L and bioconversion yield of 59.2%.

The results demonstrated the feasibility of VFAs production from brewery spent grain, showing both the effectiveness of steam explosion pretreatment and the limited efficiency of enzymatic hydrolysis.

Key words: brewery spent grain, fermentation, volatile fatty acids, pretreatment and bioconversion

1. Introducción

Uno de los principales objetivos para el siglo XXI es la sostenibilidad ambiental. Para lograrla es necesario impulsar la economía circular, la cual se basa en la recuperación, reutilización y reciclaje de los residuos. Por esta misma razón, en los últimos años, se está avanzando hacia el objetivo de residuos cero [1]. En ese contexto, el Unión Europea (UE) está adoptando diversas medidas para alcanzar este objetivo, especialmente a través del Pacto Verde Europeo. El cual promueve el uso más eficiente de recursos y la prolongación de la vida útil de los productos mediante acciones como la prohibición del plástico de un solo uso, la obligación de aplicar el ecodiseño, entre otras [2]

Para los residuos ya producidos, la UE intenta implantar la jerarquía de residuos, la cual establece el orden de las prioridades en la gestión de los residuos, que son: prevenir, reutilizar, reciclar, valorizar y como última opción, eliminar [2]. Por este motivo, se han empezado a valorizar materiales de desecho, utilizándolos como materia prima para la obtención de productos con un valor comercial, buscando reducir los efectos del cambio climático y la contaminación [1], [3].

Las estrategias de revalorización de los residuos consisten en la transformación de residuos en nuevos productos que posean valor añadido [3]. La valorización de residuos orgánicos se puede llevar a cabo por diferentes rutas, entre las que destacan las rutas termoquímicas y biológicas.

Dentro de las rutas termoquímicas, la incineración es una de las posibilidades. En este proceso, los residuos orgánicos se queman a temperaturas superiores a 850°C durante tiempos de 2 segundos [4], lo que permite la combustión completa de la materia orgánica, generando una gran cantidad de energía térmica, la cual se transforma en energía eléctrica posteriormente, contribuyendo a la producción de energía renovable. Sin embargo, este proceso requiere de un gran sistema de filtrado para evitar las emisiones de compuestos contaminantes con las dioxinas, furanos, ... [4], [5] lo cual representa uno de los principales desafíos medioambientales asociados a esta tecnología.

Por otro lado, las rutas biológicas incluyen el compostaje y la digestión anaerobia, entre otras. El compostaje es un proceso aerobio mediante el cual los residuos orgánicos, como restos de alimentos, restos vegetales, ... (siempre y cuando sean recogidos de manera selectiva), se descomponen en presencia de oxígeno [6]. Como resultado final se obtiene compost; un producto que se usa como abono agrícola, reduciendo el uso de fertilizantes químicos [6], [7]. En cambio, la digestión anaerobia degrada los residuos orgánicos sin necesidad de oxígeno. Durante el proceso de digestión anaerobia se genera biogás (mezcla de gases rica en metano) como producto final, que se puede aprovechar para la generación de energía de una fuente renovable. Además, el digestato producido se puede aprovechar como fertilizante [8].

1.1. Bagazo de cerveza

La cerveza es una de las bebidas más consumidas en el mundo. De hecho, es la bebida alcohólica más popular. Los principales ingredientes de la cerveza son el agua, la malta, el lúpulo, la levadura, azúcar y una mezcla de cereales [9]. En 2023 se produjeron en torno a 1885 millones de hectolitros de cerveza a nivel mundial, siendo China el principal productor de cerveza, con una producción de 350 millones de hectolitros [10]. No obstante, la producción de cerveza en Europa está en aumento, siendo los principales productores europeos, Alemania con 84.9 millones de hectolitros, España con 41.5 millones de hectolitros y Polonia con 35 millones de hectolitros [11], [12].

Durante el proceso de producción no solo se consigue la cerveza, si no que se generan grandes cantidades de subproductos y residuos. El bagazo es uno de ellos y representa el 85% del total de los residuos de la industria cervecera, ya que para producir 1 hectolitro de cerveza se generan 20 kg de bagazo [13], [14]. Como se muestra en la [Figura 1](#), este residuo está compuesto por granos de cebada, trigo, etc que han sido utilizados para extraer los azúcares fermentables.



Figura 1: Bagazo de cerveza húmedo [15]

El bagazo es un subproducto caracterizado por su alto contenido en fibra y proteínas. Al tratarse de un material lignocelulósico, este material presenta una estructura similar a la mostrada en la [Figura 2](#). Posee un elevado porcentaje de humedad, que suele rondar el 80% [16]. Si se analiza la composición en peso seco, está constituido por un 40-50% de polisacáridos, aproximadamente un 30% de proteínas y entre un 12-28% de lignina [17]. Los principales polisacáridos que componen el bagazo son: la celulosa, que representa entre un 15 y un 18% (del peso seco del bagazo); la hemicelulosa, cuya proporción esta entre el 24 y el 31%; y el almidón, que representa entre un 2 y un 3% [13]. Gracias a esta composición, el bagazo se ha estado utilizando como alimento para el ganado. De hecho, se ha reportado que la calidad de la leche producida por las vacas es incluso mejor cuando estas son alimentadas con bagazo [18].

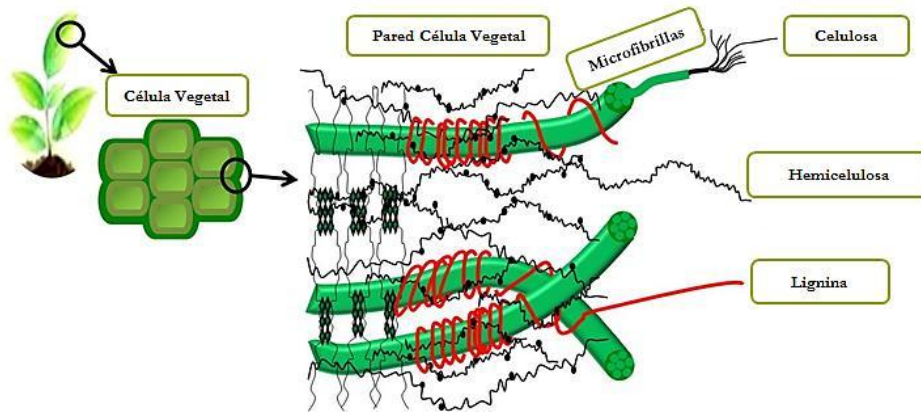


Figura 2: Estructura de una biomasa lignocelulósica [19]

El bagazo se ha estado utilizando también para producir energía, mediante combustión, pues posee un poder calorífico neto de 19.9 MJ Kg^{-1} . No obstante, este método presenta varias desventajas, ya que el bagazo tiene una gran humedad, la cual habría que reducir previamente. Además, la combustión de bagazo genera grandes cantidades de gases de efecto invernadero, como el SO_2 y NO_2 , entre otros [20], [21].

Las últimas investigaciones intentan utilizar el bagazo como materia prima para la producción de biocombustibles u otros productos útiles para la industria química. Estas investigaciones están basadas, sobre todo, en la utilización de procesos biológicos para tratar el bagazo y obtener nuevos productos de valor añadido [20]. Con el objetivo principal de utilizar los azúcares contenidos en el bagazo como fuente de carbono de microorganismos, y que estos los transformen en productos de interés. No obstante, debido al alto contenido en lignina, no es fácil acceder a la celulosa y hemicelulosa del bagazo para que estas fracciones puedan ser utilizadas por los microorganismos. Es por ello que se necesitan una serie de pretratamientos que modifiquen la estructura lignocelulósica y así facilitar el acceso a los polisacáridos [22].

1.2.Pretratamientos

El objetivo del pretratamiento es modificar la estructura conformado por la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalización de la celulosa y aumentar la porosidad del bagazo. Además, el pretratamiento debe diseñarse de modo que no se degraden los carbohidratos y evitando que se generen subproductos que inhiban los procesos posteriores. Existen numerosos tipos pretratamientos, los cuales se pueden clasificar de la siguiente forma:

- **Pretratamientos físicos**

Son el conjunto de procesos mecánicos para la modificación de la estructura lignocelulósica. La trituration es uno de los principales métodos y consiste en reducir el tamaño de las partículas. Otro pretratamiento muy común es la explosión por vapor. De hecho, es el pretratamiento físico más utilizado para materiales lignocelulósicos y consiste en tratar la biomasa con vapor saturado a alta presión para luego reducir la presión drásticamente. Este proceso provoca que lo materiales sufran una

descompresión explosiva [22]. Esta técnica suele emplear temperaturas entorno a los 160-260°C durante un periodo de tiempo que suele oscilar entre 2 y 30 minutos [23].

En la [Figura 3](#), se muestra la composición y estructura de la biomasa lignocelulósica, como el bagazo, tras someterse a un tratamiento de explosión por vapor. Tras este tipo de pretratamiento, la estructura cambia, exponiendo la celulosa y hemicelulosa, siendo más accesible para los microorganismos [24] .

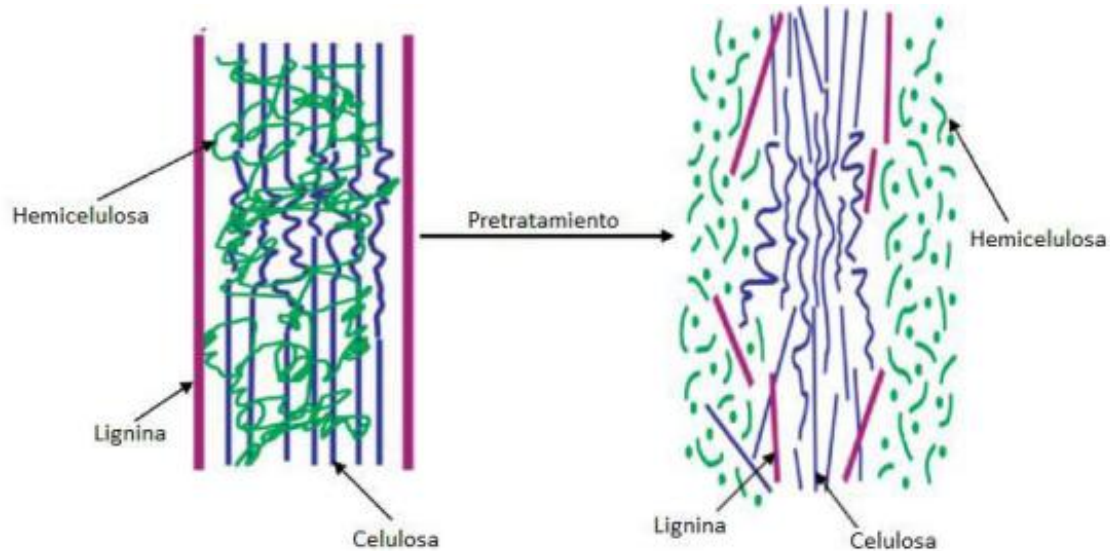


Figura 3: Estructura lignocelulósica tras el pretratamiento [24]

- **Pretratamientos físico-químicos**

Los pretratamientos físico-químicos son la combinación de procesos mecánicos y reacciones químicas para modificar la estructura de un material. Unos de los mejores ejemplos, es la combinación de la explosión por vapor con distintos productos químicos, como el H_2SO_4 o el NaOH . Esta aproximación consigue realizar una hidrólisis ácida o alcalina, al mismo tiempo que se realiza la explosión de vapor, mejorando notablemente la degradación de lignina y hemicelulosa [25], [26]. Otro método muy utilizado es la explosión de fibra con amoníaco (AFEX), siendo este un proceso muy parecido a la explosión de vapor, pero que en lugar de utilizar agua emplea amoníaco. Esta diferencia permite que el pretratamiento no genere compuestos inhibidores, favoreciendo una fermentación posterior [27].

- **Pretratamientos químicos**

Los pretratamientos químicos consisten en la utilización de reactivos químicos para alterar la composición del material. Entre los procesos más importantes se encuentran la hidrólisis ácida y la hidrólisis alcalina, en los cuales la biomasa se trata con ácidos como el H_2SO_4 o el HCl , o con bases como la NaOH , en concentraciones y tiempos de reacción variables. Estos compuestos reaccionan con las uniones estructurales de la biomasa lignocelulósica, permitiendo la hidrólisis de la celulosa y mejorando así su disponibilidad para procesos posteriores [3], [22].

- **Pretratamientos biológicos**

Este tipo de pretratamiento se basa en la utilización de microorganismos, principalmente hongos, para degradar la estructura lignocelulósica. Sin embargo, la tasa de hidrólisis en este tipo de pretratamiento es muy baja [28]. Por otro lado, la hidrólisis enzimática, que suele estar combinado con otro pretratamiento previo, favorece la producción de moléculas más sencillas a partir de los compuestos poliméricos (celulosa y hemicelulosa). Durante el pretratamiento previo (por ejemplo, un pretratamiento físico como explosión por vapor) se aumenta la disponibilidad de dichos compuestos poliméricos para que, en una segunda fase, las enzimas, en este caso celulasas y hemicelulasas, se encarguen de hidrolizar y transformar la celulosa en azúcares reductores. Más concretamente, estos azúcares más simples suelen estar representados principalmente por glucosa y xilosa, siendo ambas moléculas fácilmente fermentables por diversos microorganismos [22], [28].

1.3.Digestión anaerobia

Entre los bioprocesos que se pueden utilizar para revalorizar residuos orgánicos, la digestión anaerobia es posiblemente una de las más convencionales. La digestión anaerobia es un proceso biológico en el cual una serie de microorganismos, en ausencia de oxígeno, descomponen la materia orgánica generando como producto final biogás, una mezcla formada principalmente por metano y dióxido de carbono. Tal y como se muestra en la [Figura 4](#), la digestión anaerobia tiene 4 etapas básicas: la hidrólisis, la acidogénesis, la acetogénesis y la metanogénesis [29], [30].

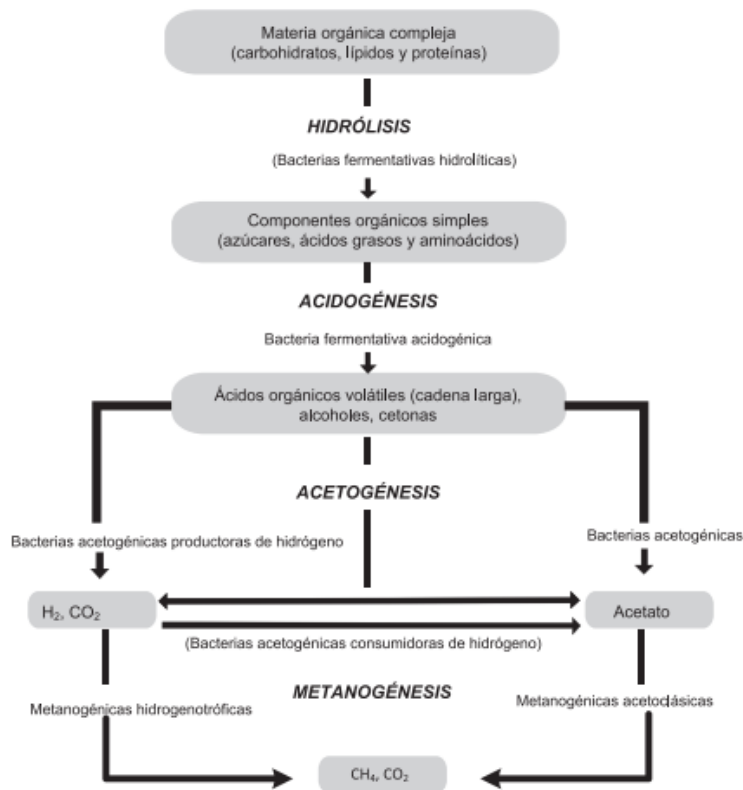


Figura 4: Proceso de la digestión anaerobia [30]

En la primera etapa, es decir, en la hidrólisis, se consigue la degradación de la materia orgánica más compleja, produciendo moléculas más pequeñas y, por tanto, más biodisponibles, que serán utilizadas en las siguientes etapas. En la acidogénesis o también conocida como fermentación, los compuestos producidos en la hidrólisis son utilizados por las bacterias y se degradan en ácidos grasos volátiles, es decir en AGVs, como lo son el ácido butírico, propiónico, acético, ... y en gases como el hidrógeno y el dióxido de carbono [31], [32].

Durante la acetogénesis, los AGVs se convierten en acetato, dióxido de carbono e hidrógeno. Por último, en la metanogénesis, todos los productos anteriores son usados por las arqueas metanogénicas para producir metano, siendo esta etapa la más delicada y que limita la velocidad del proceso. Esto es debido a la gran sensibilidad de las bacterias metanogénicas a cambios en medio o condiciones operacionales en los reactores, pero sobre todo también debido a su lento crecimiento [29], [32].

Durante la digestión anaerobia completa se produce biogás, un gas compuesto fundamentalmente por metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2). Sin embargo, existe una alternativa muy investigada en los últimos años en los que se inhibe la fase metanogénica para producir AGVs. El alto interés en estos compuestos se debe a su gran aplicabilidad como moléculas plataforma por un gran número de reacciones que se llevan a cabo en la industria del transporte, farmacéutica y del plástico. En comparación con la producción de metano, la producción de AGVs puede ser más rentable económicamente, ya que el valor en el mercado es de 50-130 \$/tonelada, que es mayor que el precio del metano 0.72 \$/m³ [31].

Actualmente, la gran mayoría de la AGVs disponibles en el mercado son sintetizados mediante procesos petroquímicos[33], [34]. Esta vía presenta un rendimiento elevado y tiempos de reacción rápida. Sin embargo, el aumento de la demanda de AGVs y la creciente preocupación ambiental sobre el uso de combustibles fósiles han impulsado numerosas investigaciones orientadas a disminuir la producción de AGVs mediante procesos petroquímicos. Como resultado, han surgido nuevas alternativas más sostenibles con el medio ambiente, favoreciendo la sostenibilidad y renovabilidad, entre la que destaca la digestión anaerobia [35].

Para favorecer la producción de AGVs durante la digestión anaerobia, y evitar su consumo por parte de los microorganismos metanogénicos, se pueden modificar varios parámetros de operación del proceso. Principalmente se busca inhibir la metanogénesis, ya que es en esa etapa donde se consumen los AGVs, y para ello se puede reducir el tiempo de retención o alimentar con altas cargas orgánicas, lo cual provoca que la acidogénesis sea la última etapa, resultando en una acumulación de AGVs, evitando que el proceso llegue a la metanogénesis [36]. En estas condiciones, la digestión anaerobia no se completa, por lo que, al detenerse en la mitad de proceso, se denomina fermentación, la cual produce productos intermedios, como los AGVs, alcoholes, ... en lugar de biogás como producto final [37]. También se pueden inhibir a las arqueas metanogénicas variando el pH, disminuyéndolo por debajo de 6.0 o aumentándolo por

encima de 8.0, o introduciendo algún compuesto específico que sea un inhibidor de actividad metanogénica [36].

1.4. Ácidos grasos volátiles

Los AGVs son ácidos carboxílicos saturado o insaturados. Aunque se les conozca como ácidos volátiles no lo son a temperatura ambiente. El término volátil hace referencia a la capacidad para pasar al estado gaseoso bajo condiciones bastante moderadas [38]. En este grupo se incluyen ácidos monocarboxílicos alifáticos cuya longitud es de 6 o menos átomos de carbono. Los principales AGVs son: el ácido fórmico (C1), acético (C2), propiónico (C3), n-butírico (C4), isovalérico, n-valérico (C5), y caproico (C6). También se les puede conocer como ácidos grasos de cadena corta, pero este término es erróneo ya que existen otros ácidos orgánicos de cadena corta que no son volátiles [39], [40].

Los AGVs se caracterizan por ser líquidos a temperatura ambiente, aunque sus puntos de ebullición no son excesivamente altos. Gracias al grupo carboxilo (-COOH), son solubles en agua. Esta propiedad se utiliza en técnicas de separación, como la destilación, que permite aislarlos de disoluciones acuosas bajo condiciones suaves [40].

Los principales AGVs son:

- **Ácido acético:**

Este ácido consta de dos átomos de carbono en su estructura ([Figura 5](#)). Se trata del ácido orgánico más utilizado actualmente, con un consumo de 18.71 millones de toneladas en 2024 [41]. Se trata de un líquido incoloro con un olor fuerte. Tiene unas propiedades ácidas bajas, disolviéndose fácilmente en disolventes polares como el agua. Por otro lado, tiene el precio en el mercado más bajo, ya que el precio de aumenta en función de los carbonos que componen la cadena del AGV. El precio del ácido acético en el mercado es de 600\$ por cada tonelada [1].

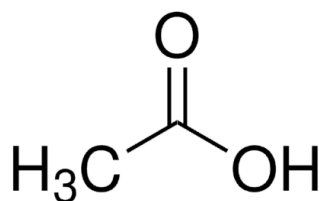


Figura 5: Estructura del ácido acético [42]

Se lleva utilizando el ácido acético desde la antigüedad como conservante de alimentos, ya que impide el crecimiento de bacterias y hongos. Es una materia prima fundamental para la industria química, ya que es el precursor de acetato de etilo, usado para pinturas y barnices, del acetato de celulosa, que se emplea en fibras sintéticas[35].

- **Ácido propiónico:**

El ácido propiónico es un ácido carboxílico de tres átomos de carbono ([Figura 6](#)) con un olor desagradable. Se suele encontrar de manera natural en lácteos, en el sudor humano, ... Sin embargo, su producción industrial proviene del petróleo, se estima que

en 2017 se produjeron 349272 toneladas [2]. Es soluble en disolventes polares, como el agua. Presenta un precio de mercado de 2000\$ por cada tonelada [1], [43].

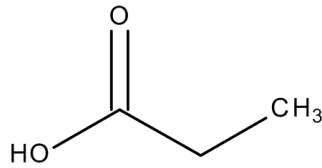


Figura 6: Estructura del ácido propiónico [44]

Su principal aplicación se encuentra en la industria alimentaria y agrícola. Gracias a su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y mohos, se emplea como conservante de productos horneados y para la alimentación animal. En la agricultura, se utiliza en la síntesis de herbicidas. Además, también desempeña un papel relevante en la fabricación de algunos plásticos y resinas [9], [43].

- **Ácido butírico:**

Se trata de un ácido con cuatro átomos de carbono en su estructura ([Figura 7](#)). Es un líquido incoloro o ligeramente amarillo, con un olor desagradable. Su producción industrial se lleva a cabo a través de métodos petroquímicos. De manera natural, se encuentra en los lácteos, como el queso o mantequilla y como subproducto de bacterias intestinales. En el mercado tiene un precio de 2163\$ por tonelada [43].

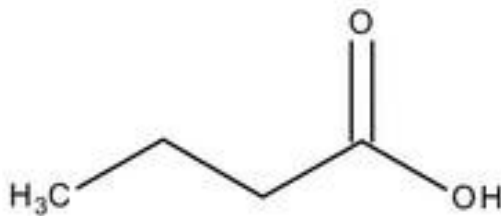


Figura 7: Estructura del ácido butírico [45]

Uno de sus principales aplicaciones del ácido butírico es en la industria farmacéutica, para el tratamiento de problemas intestinales. Por este motivo también es utilizado como aditivo en piensos para animales. También se utiliza en la industria química para formar los ésteres de butirato que son utilizados para la síntesis de perfumes, plastificantes, ... En el campo médico se ha empezado a investigar el uso del ácido butírico debido a que posee efectos anticancerígenos [9], [46].

- **Ácido valérico:**

También llamado, ácido pentanoico, este ácido está compuesto por cinco átomos de carbono lineales en su estructura ([Figura 8](#)), con un olor penetrante y desagradable. Se encuentra de manera natural en plantas y aceites. Se estima que, en 2020, el mercado del ácido valérico movió cerca de 1506 millones de \$, con tendencia a

aumentar los siguientes años. Se trata de un compuesto soluble en agua y que se absorbe fácilmente en superficies hidrófobas [35].

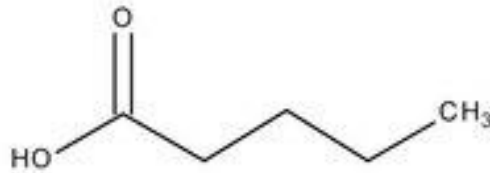


Figura 8: Estructura del ácido valérico [47]

El ácido valérico presenta diversas aplicaciones, principalmente en la industria alimentaria, de bebidas y cosmética, ya que se trata de un intermedio químico que se utiliza para la fabricación de diferentes sabores, perfumes, lubricantes, productos farmacéuticos y otros productos químicos agrícolas [35].

- **Ácido caproico:**

El ácido caproico, también conocido como ácido hexanoico, es un ácido carboxílico compuesto por seis átomos de carbono (Figura 9). Se presenta como un líquido oleoso, incoloro y con un olor acre. De manera natural, se encuentra en pequeñas cantidades en aceites y grasas animales [35].

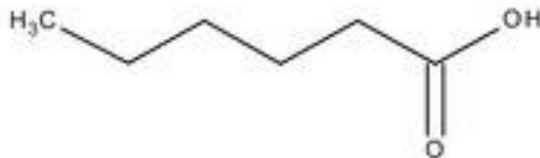


Figura 9: Estructura del ácido caproico [48]

Las principales aplicaciones industriales de este ácido son en la fabricación de plastificantes, como agente antimicrobiano, como aditivo en sabores y como aditivo para alimentos de animales. Se estimó que el mercado del ácido caproico alcanzaría los 1250 millones de \$ en el 2020 [35].

2. Objetivo

Este trabajo fin de máster tiene como objetivo principal estudiar la viabilidad de la producción de AGVs, compuestos de alto valor añadido, a partir de bagazo, un residuo de la industria cervecera, mediante la fermentación anaerobia. Este estudio impulsa la economía circular y la reducción de residuos a ser tratados para su conversión.

Para lograr el objetivo principal, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación de la efectividad de los pretratamientos aplicados al bagazo, en términos de solubilización de materia orgánica y su posterior impacto en la producción de AGVs
- Evaluar el rendimiento de la bioconversión del bagazo mediante la fermentación anaerobia, cuantificando la producción de AGVs, con el fin de analizar la viabilidad del proceso.

3. Materiales y métodos

3.1. Fango anaerobio

Para este estudio de investigación se utilizó un fango anaerobio digerido proveniente la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) Las ERAS, en Valladolid. El fango se almacenó en cámara fría (4°C) hasta uso.

3.2. Caracterización del bagazo

El bagazo fue obtenido de la fábrica cervecera Mahou situada en Getafe (Madrid, España). Se congeló para evitar que se degradara y se descongeló y caracterizó a medida que se necesitó para ser utilizado como sustrato de los reactores anaerobios. En la [Tabla 1](#), se muestra las características del bagazo bruto, donde ST son los sólidos totales y SV los sólidos volátiles contenidos en bagazo

Tabla 1: Parámetros del bagazo

ST (g/L)	211.7 ±2.5
SV (g/L)	203.9 ±1.3

3.2.1. Pretratamiento

Con el objetivo de modificar la estructura física y química del bagazo, y conseguir una mayor exposición de los azúcares fermentables, se aplicó un pretratamiento físico-químico, conocido como explosión por vapor. Este proceso consistió en realizar una hidrólisis térmica al bagazo. Para ello, se introdujo una cantidad fija de bagazo y se hidrolizó a 180°C durante 20 minutos. Estas condiciones fueron seleccionadas basándose en resultados anteriores descritos en Kemppainen et al [49]. El bagazo presento una composición de 45.4 ±0.1% de carbohidratos, 30.1 ±0.4% de proteínas, 21.7 ±0.7% de lípidos y un 2.7 ±1.2% de cenizas. En la [Tabla 2](#) se muestran las características químicas del bagazo hidrolizado, donde DQOt es la demanda química de oxígeno total, DQOs es la demanda química de oxígeno soluble y NKT es el nitrógeno Kjeldahl total.

Tabla 2: Parámetros del bagazo pretratado térmicamente

DQOt (g/L)	43.1 ±1.8
DQOs (g/L)	19.2 ±0.3
Carbohidratos (g/L)	15.5 ±0.2
NKT (gN/L)	1.6 ±0.1
ST (g/L)	34.2 ±0.4
SV (g/L)	33.3 ±0.7
Lípidos (g/L)	7.5 ±0.3
Amonio (g/L)	0.08 ±0.0

Para la evaluar el rendimiento del pretratamiento, se utilizó la [Ecuación 1](#), la cual indica la cantidad de DQO que ha sido solubilizada.

$$\text{Solubilización}(\%) = \frac{DQOs}{DQOt}$$

Ecuación 1

3.2.2. Hidrolisis enzimática

La hidrólisis enzimática del material pretratado se llevó a cabo utilizando la enzima Cellic CTec 3, suministrada por Novozymes (Dinamarca). En la literatura, los rangos de concentración enzimática utilizados varían considerablemente. Por ejemplo, Valenzuela et al., [50] trabajaron con dosis de 0.044 g de enzima por cada gramo de sustrato pretratado seco, mientras que Chenebault and Percheron [51] utilizaron concentraciones de 180 mg de enzima por cada gramo de ST. Por este motivo, se partió de la dosis enzimática más alta y se evaluaron también dosis menores con el fin de determinar la dosis óptima que permita maximizar la liberación de azúcares, intentando reducir los costes económicos. En este sentido, se seleccionaron dos dosis enzimáticas: 180 mg/g ST y 90 mg/g ST. Este experimento se realizó en botellas de 1 L (Simax, España), donde se añadieron 200 mL de material pretratado, y se añadió la dosis correspondiente de enzima. El experimento se realizó por duplicados para garantizar la validez de los resultados. Posteriormente, se ajustó el pH a 5 (con HCl 3 M). Las botellas se incubaron durante 72 h a 50°C con una agitación moderada de 150 rpm. Estas últimas condiciones fueron seleccionadas pues eran los recomendados por el proveedor. Para detener la actividad enzimática, el medio se hirvió durante 10 minutos.

Para seguir la evolución de la DQOs, se tomaron 2 muestras diarias espaciadas en el tiempo al menos 6 horas. Se volvió a utilizar la [Ecuación 1](#) para evaluar el rendimiento de la hidrólisis, representado por la solubilidad alcanzada.

3.3. Operación de los reactores

Se operaron dos reactores semicontinuos de tanque agitado (CSTR) con el objetivo de evaluar la efectividad del pretratamiento térmico de explosión de vapor. El reactor 1 fue alimentado con bagazo sin pretratar, mientras que el reactor 2 se alimentó con el bagazo pretratado. Ambos reactores trabajaron con las mismas condiciones, misma carga orgánica (OLR), misma temperatura, mismo tiempo de retención hidráulica (TRH), mismo pH, ... asegurando poder realizar una comparación entre ambos reactores.

3.3.1. Preparación de la alimentación

Para asegurar que ambos reactores fueran alimentados con la misma OLR, el bagazo inicial se diluyó con agua destilada hasta igualar la concentración de SV del bagazo pretratado térmicamente. En la Tabla 3 se presentan las características del bagazo sin pretratar. El bagazo presento una composición de $32.3 \pm 2.3\%$ de carbohidratos, $24.3 \pm 0.3\%$ de proteínas, $40.6 \pm 2.3\%$ de lípidos y un $2.8 \pm 0.8\%$ de cenizas.

Producción de ácidos grasos volátiles mediante fermentación anaerobia

Tabla 3: Parámetros del bagazo sin pretratar

DQOt (g/L)	49.5 ±15.6
DQOs (g/L)	4.5 ±2.5
Carbohidratos (g/L)	11.2 ±0.7
NKT (gN/L)	1.3 ±0.1
ST (g/L)	34.8 ±0.8
SV (g/L)	33.8 ±0.5
Lípidos (g/L)	14.1 ±1.1
Amonio (g/L)	0.07 ±0.0

3.3.2. Diagrama de flujo

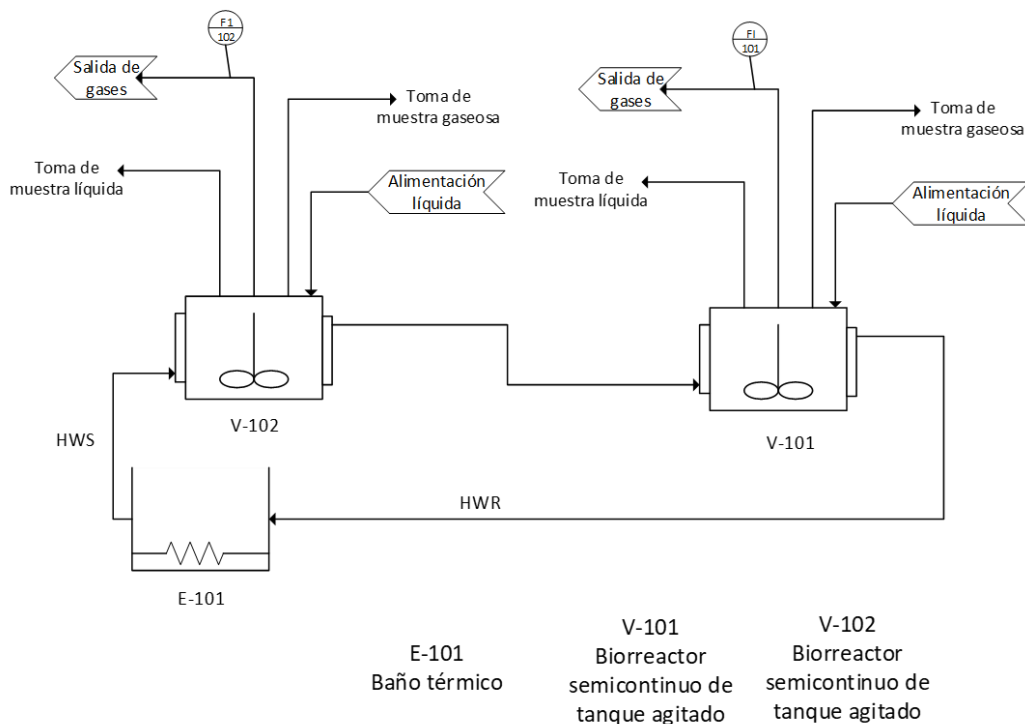


Figura 10: Diagrama P&ID

En la [Figura 10](#) se muestra el diagrama P&ID del proceso, mientras que la [Figura 11](#) representa el sistema experimental empleado para la operación de los reactores.

El experimento se llevó a cabo utilizando dos reactores (Vidra Foc, España) con un volumen de 1.5 L cada uno. La homogenización de los reactores se consiguió gracias a una agitación magnética a 250 rpm. Para ello se utilizó el agitador Hei-PLATE Mix 20 I (Heidolph, Alemania). Para mantener la temperatura constante de 25°C en el interior de los reactores, se empleó un baño térmico (4100 H14P, Fisherbrand, España).

El sistema contaba con varios puntos de toma de muestra: uno para la fase gaseosa y otro para la fase líquida. La alimentación del reactor se realizó a través del punto de muestreo de la fase líquida, utilizando jeringas de 100 mL (DB Plasticpak, EEUU). Para cuantificar el biogás producido se utilizó un contador de pulsos (MGC-1 V3.4 PMMA, Ritter, Alemania), el cual estaba relleno de una disolución de HCl 1.8%. Los gases generados en el bioproceso fueron conducidos al sistema de extracción del edificio.

3.3.3. Procedimiento experimental



Figura 11: Sistema experimental empleado

Los reactores se operaron de forma semicontinua. Inicialmente, se procedió al montaje de los reactores, lo cuales se inocularon con 1 L de fango anaerobio. Con el fin de eliminar oxígeno que se encontraba en el espacio de cabeza de los reactores, se purgaron con helio. A continuación, para asegurar unas condiciones de trabajo anaerobias, los reactores se sellaron para asegurar un cierre hermético. Posteriormente, se verificó la ausencia de fugas comprobó con el detector de gas PCE-GA 10 (PCE Instrument, Albacete, España).

A continuación, se preparó la alimentación de los reactores, como se indica en el [Caracterización del bagazo](#). Como se ha comentado antes, el reactor 1 fue alimentado con el bagazo sin pretratar, mientras que el reactor 2 se alimentó con el bagazo pretratado térmicamente.

La alimentación se ajustó para alcanzar un TRH de 10.5 ± 0.5 días, una OLR de 3 g SV/L d, en ambos reactores. El pH se ajustó diariamente con NaOH 4 M, manteniéndolo en el intervalo 5.5-6, siendo este rango determinado en literatura como el pH el óptimo para la producción de AGVs [52]. El día 20 se empezó a alimentar con otro lote de alimentación de los reactores, el cual presentó unas características muy similares al primero. En la [Tabla 4](#) se muestran las condiciones de operación de los reactores. Se puso fin al experimento cuando los reactores alcanzaron el estado estacionario, es decir, la bioconversión se estabilizó y se mantuvo constante.

Producción de ácidos grasos volátiles mediante fermentación anaerobia

Tabla 4: Condiciones de operación

Temperatura (°C)	25
pH	5.5-6
TRH (d)	10.5 ±0.5
CV (g SV/Ld)	3.00
V (L)	1.0

Se realizó un seguimiento diario a los reactores, basado en el control del pH, caudal de biogás generado y alimentación y extracción del efluente. Además, se llevaron a cabo análisis químicos de forma periódica a los efluentes líquidos y gaseosos, dos días a la semana, con el objetivo de evaluar su comportamiento. Por ello, durante el proceso de alimentación, se extrajo una muestra del medio de los reactores la cual se utilizó para realizar los análisis químicos, que consistieron en analizar los ST y SV (20 mL), la DQOt (3 mL) y DQOs (4 mL) y los AGVs (1.5 mL). También se analizó la fase gaseosa del reactor, identificando la composición de los gases generados.

Se utilizaron los siguientes parámetros para evaluar los reactores: bioconversión ([Ecuación 2](#)), eliminación de DQO ([Ecuación 3](#)) y la mineralización del nitrógeno ([Ecuación 4](#)). En estas ecuaciones el subíndice e indica entrada y s indica salida.

$$\text{Bioconversion (\%)} = \frac{DQO_{AGVs}}{DQO_{t_e}} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$DQO \text{ eliminada (\%)} = \frac{DQO_{t_e} - DQO_{t_s}}{DQO_{t_e}} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{Mineralización } N_2 (\%) = \frac{Amonio_s - Amonio_e}{NKT_e - Amonio_e} \quad \text{Ecuación 4}$$

3.4. Métodos analíticos

La composición de la fase gaseosa de los reactores se determinó mediante cromatografía de gases. Para ello se tomaron muestra de los reactores reactor con jeringas de gas herméticas de 500 µL (Hamilton, USA). Las muestras fueron analizadas por un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (GC-TCD, Agilent 8860, EEUU). Las temperaturas del inyector, horno y detector fueron 150°C, 60°C y 200°C respectivamente, mientras que la presión del inyector fue de 16.9 psi. La fase móvil estaba constituida por Helio con un caudal de 4 mL/min.

La cuantificación de los AGVs producidos en los reactores se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El equipo que se utilizó era un HPLC e2695 (Waters, EEUU), equipado con un detector de luz ultravioleta (2489 UV/Vis detector) y con una columna (00K-0138-KO, Phenomenex, EEUU). La fase móvil estuvo compuesta por H₂SO₄ 5 mM. Para el análisis de AGVs, las muestras se centrifugaron a 7800 rpm durante 10 minutos (2-16P, Fisher Bioblock Scientific, Alemania). Seguidamente se realizó un primer filtrado con un filtro de 0.45 nm. A continuación, la muestra filtrada se volvió a centrifugar a 10000 rpm durante 8 minutos (accuSpin Micro 17, Fisherbrand, España), seguida del segundo filtrado utilizando filtros de 0.22 nm. Finalmente, en el vial

se depositaron 100 µL de muestra, 900 µL de agua tipo destilada y 20 µL de ácido sulfúrico 96%.

La demanda química de oxígeno total (DQOt) y soluble (DQOs) se determinó con un kit basado en la colorimetría (Spectroquant COD Cell Test, Supelco, Merck, Alemania). En el caso de la DQOs, primero se centrifugó la muestra a 7800 rpm (2-16P, Fisher Bioblock Scientific, Alemania) durante 10 minutos, y se filtró con un filtro de 0.45 µm. Para llevar a cabo el protocolo del kit, se añadió 3 mL de cada muestra en los viales del Kit, se agitó y se dejó en un calentador (Spectroquant TR 420, Merck, Alemania) a 148°C durante 2 horas. Finalmente, se dejó enfriar las muestras hasta temperatura ambiente y se midieron en un espectrofotómetro (Prove 100, Spectroquant, Merck, Alemania) para cuantificar la DQO.

Los ST y SV se determinaron mediante el método estándar [53]. Para obtener los ST, primero se pesó una capsula de porcelana, se añadió la muestra, se volvió a pesar y se introdujo en un horno a 100°C durante 24 horas. Luego, la capsula se dejó enfriando en el desecador y se pesó una vez fría. A continuación, para obtener los SV, se introdujo la capsula en una mufla a 550°C durante otras 24 horas, al finalizar el tiempo se volvió a pesar.

$$ST = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$SV = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_0} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde m_0 es la masa de la capsula, m_1 es la masa de la capsula más la muestra, m_2 es el peso tras estar en la estufa y m_3 es el peso tras pasar por la mufla.

Para determinar la concentración de amonio se utilizó un método basado en la colorimétrica (kit Spectroquant Ammonium Test, Supelco, Merck, Alemania). Se empleó 1 mL de muestra previamente centrifugada a 7800 rpm (2-16P, Fisher Bioblock Scientific, Alemania) durante 10 minutos. Seguidamente se añadió 100 µL de la dilución, 5 mL del ácido del kit (H_2SO_4) y una cucharada del reactivo del kit. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 15 minutos, y finalmente se midió la concentración en un espectrofotómetro (Prove 100, Spectroquant, Merck, Alemania).

El pH se determinó mediante un pH-metro (HI-981412, Hanna Groline, EEUU), para el reactor 1, y pH-metro (BL100, Hanna, EEUU), para el reactor 2.

En la caracterización del bagazo, para determinar la concentración de carbohidratos se utilizó un método colorimétrico [54]. En este procedimiento, se mezclaron en un tubo de ensayo 200 µL de la muestra, 1800 µL de agua destilada, 5 mL de ácido sulfúrico al 96% y 50 µL de fenol al 96%. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 30 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro (CE2041 UV/Vis, Cecil, UK) a una longitud de onda de 485 nm. Para calcular las concentraciones de carbohidratos, se introdujo la absorbancia obtenida en la recta de calibrado realizada previamente con patrones de glucosa.

Producción de ácidos grasos volátiles mediante fermentación anaerobia

Para la determinación del nitrógeno total se utilizó el método Kjeldahl [55]. Se pesó una cantidad conocida de la muestra y se depositó en un tubo de digestión. A continuación, se añadieron 6 mL de ácido sulfúrico al 96%, algunas piedras de porcelana para facilitar la ebullición y aumentar la superficie de contacto, y una pastilla de catalizador, que contiene 1.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y 2% Se. Se dejó reaccionar esta mezcla durante 3 horas a 150°C. Posteriormente, se procedió a la destilación utilizando el equipo KjelFlex K-360 (Büchi, Suiza), obteniendo una solución que contenía el amoníaco liberado. Finalmente, la solución se valoró con ácido sulfúrico (0.05 N).

$$NKT (\%) = \frac{(V_{ac} - V_{bl}) * N * 14007 * 100}{m_{muestra}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Para calcular la cantidad de proteínas del bagazo se multiplicó el valor del NKT por el factor de conversión, 6.25 es el empleado para compuestos vegetales [56].

El contenido en cenizas se determinó como la diferencia entre los ST y los SV. Por otro lado, el contenido de lípidos se calculó restando la suma de los carbohidratos y las proteínas al valor de los SV.

4. Resultado y discusión

4.1. Pretratamiento del bagazo

El pretratamiento consistió en una explosión de vapor, utilizando una temperatura de 180°C durante 20 minutos. En la [Tabla 5](#) se muestran las características del bagazo antes y después del pretratamiento. Como se puede observar, la concentración de lípidos disminuyó en un 53.5%, probablemente debido a que, durante el pretratamiento se alcanzaron temperaturas bastante elevadas, las cuales provocaron que algunos lípidos se pudieran degradar o emulsionarse [57]. En cambio, la concentración de carbohidratos y proteínas en el bagazo pretratado aumentó un 40.4% y un 24.1% respectivamente. Lo cual podría justificarse con el hecho de que las tres concentraciones están interrelacionadas, ya que todas representan proporciones relativas, por lo que su comportamiento esta interrelacionado; un cambio en una puede influir directamente en las demás. Al sufrir una degradación de los lípidos, su proporción disminuyó, afectando a las otras dos concentraciones, que fueron modificadas, reajustando los valores relativos. No obstante, también es reseñable que las altas presiones y temperaturas a las que se somete la biomasa durante el pretratamiento pueden llegar a desnaturalizar a las proteínas, modificando su proporción [58].

Tabla 5: Comparación tras el pretratamiento

	Sin pretratamiento	Pretratamiento
DQOt (g/L)	49.5 ±15.6	43.1 ±1.8
DQOs (%)	9.1 ±0.4	44.5 ±1.1
ST (g/L)	34.8 ±0.8	34.2 ±0.4
SV (%)	97.2 ±0.8	97.3 ±1.2
Carbohidratos (%)	32.3 ±2.8	45.4 ±0.1
Lípidos (%)	40.6 ±2.3	21.7 ±0.7
Proteínas (%)	24.3 ±0.3	30.1 ±0.4
Cenizas (%)	2.8 ±0.8	2.7 ±1.2

También se observa una pequeña diferencia de color entre ambos bagazos, siendo el bagazo pretratado ligeramente más oscuro, probablemente se deba a las reacciones de Maillard [59]. Gracias al pretratamiento, la solubilización causó un aumento de DQO s de cuatro veces, llegando hasta un valor de 44.5% DQOs/DQOt ([Tabla 5](#)), un valor ligeramente superior al obtenido en bibliografía bajo las mismas condiciones de operación, donde la concentración DQOs fue de un 29.0% [49]. Sin embargo, Wilkinson et al. [60] reportaron una solubilización del 62.0%, utilizando unas condiciones de operación distintas (121°C y 30 minutos). Esto se podría deber a que tiempos de pretratamientos más largos promueven una mayor solubilización [49]. Por lo contrario, cuando se emplean temperaturas superiores a 200°C, los rendimientos empeoran debido a la degradación de los azúcares [21].

4.2. Hidrólisis enzimática del bagazo

Tras el pretratamiento térmico, se realizó una hidrólisis enzimática con el fin conseguir una mayor solubilización de azúcares fermentables. Para ello se utilizó el cocktail enzimático Cellic Ctec 3, en dosis distintas: 180 gramos de enzima por cada gramo de sólido total y 90 gramos de enzima por cada gramo de sólido total. A continuación, la [Tabla 6](#) se muestran los resultados de la hidrólisis enzimática y en la [Figura 12](#) se muestran la evolución de la DQOs a lo largo de la hidrólisis.

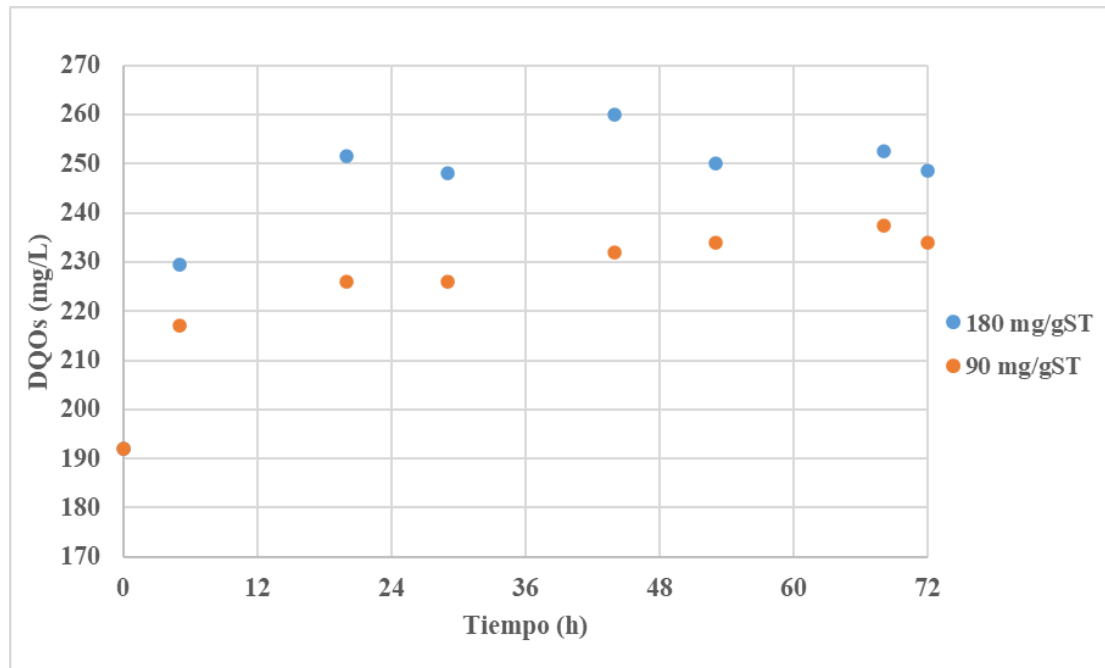


Figura 12: Evolución temporal de la DQOs en la hidrólisis. Los puntos de color azul corresponden a la dosis más alta (180 mg enzima/gST) y los puntos naranjas a la dosis más baja (90 mg enzima/gST)

Tabla 6: Solubilización tras la hidrólisis enzimática

	Sin pretratamiento	Pretratamiento	Tratamiento enzimático	
			180 g/g ST	90 g/g ST
DQOt (g/L)	49.5 ±15,6	43.1 ±1.8	43.1 ±1.8	43.1 ±1.8
DQOs (g/L)	4.5 ±2.5	19.2 ±0.3	25.2 ±2.0	23.1 ±5.0
DQOs (%)	9.1 ±0.4	44.5 ±1.1	58.5 ±0.6	53.6 ±1.7

Tras 72 horas de hidrólisis enzimática, se logró aumentar la solubilización en un 30.9% con la dosis más alta y en un 20.0% en el caso de la dosis más bajo, alcanzando valores de 58.5% y 53.6% DQOs/DQOt, respectivamente. Este incremento se debe a que las enzimas catalizan la ruptura de los enlaces glicosídicos, liberando mayor cantidad de azúcares [61]. Al comparar ambas dosis, se observa que la dosis menor ofrece una mayor rentabilidad, ya que proporciona una solubilidad parecida a la dosis mayor, pero empleando la mitad de dosis, lo que hace que el proceso sea más viable económicamente.

Sin embargo, los resultados obtenidos en la hidrólisis son ligeramente inferiores a los reportados en la bibliografía. Por ejemplo, Chenebault et Percheron [51] registraron una

solubilización del 70%. Cabe destacar que en su estudio no se utilizó bagazo como materia prima, sino papel, otro material lignocelulósico, y además se emplearon distintas concentraciones enzimáticas, de modo que estos factores pudieron influir en los resultados. Un resultado muy parecido al obtenido por Kemppanien et al. [49] quienes emplearon una mezcla de enzimas para obtener una solubilización del 72% en bagazo de cerveza. Por otro lado, Niemi et al [62] reportaron una solubilización del 48%, también con bagazo de cerveza. Estos valores quedan muy lejos de la solubilización casi completa (100%) obtenida por Pierre et al. [63]. La diferencia de los valores aquí obtenidos con los reportados en bibliografía pudo deberse a varios factores, la utilización de otras concentraciones, la composición de los cóckteles enzimáticos, así como las características previas del sustrato. Por este motivo se decidió que no era rentable realizar la hidrólisis enzimática, ya que el aumento de la solubilidad no fue mucho mayor que el obtenido con el pretratamiento térmico.

4.3. Experimento en reactores de tanque agitado semicontinuos para la producción de AGVs

El objetivo de este apartado de la investigación era evaluar la eficacia del pretratamiento, en función de la producción de AGVs, a partir de bagazo cervecero en reactores operado en modo semicontinuo.

4.3.1. Producción de AGVs

Ambos reactores operaron con un pH lo más estable posible en el rango 5.5-6, como se observa en la [Figura 13](#), que es el valor considerado óptimo para la producción de AGVs [52], ya que este parámetro afecta de manera directa las reacciones químicas llevadas a cabo por las bacterias. El reactor 1, alimentado con el bagazo sin pretratar, tuvo un valor medio de 5.6 ± 0.2 , mientras que el pH del reactor 2, alimentado con el bagazo pretratado, se mantuvo en 5.6 ± 0.1 . Cabe destacar que durante los primeros 10 días de operación se observaron disminuciones en el pH de ambos reactores, para posteriormente, mantenerse constante en ambos reactores el resto del proceso. Este comportamiento se puede explicar a la ausencia de AGVs al inicio de la operación lo que promovió una rápida generación de AGVs, lo que provocó la acidificación del medio, alcanzado a valores mínimos de 5.1 para el reactor 1 y 5.2 para el reactor 2. Sin embargo, una vez alcanzada una estabilidad en el proceso, el pH se mantuvo constante.

Producción de ácidos grasos volátiles mediante fermentación anaerobia

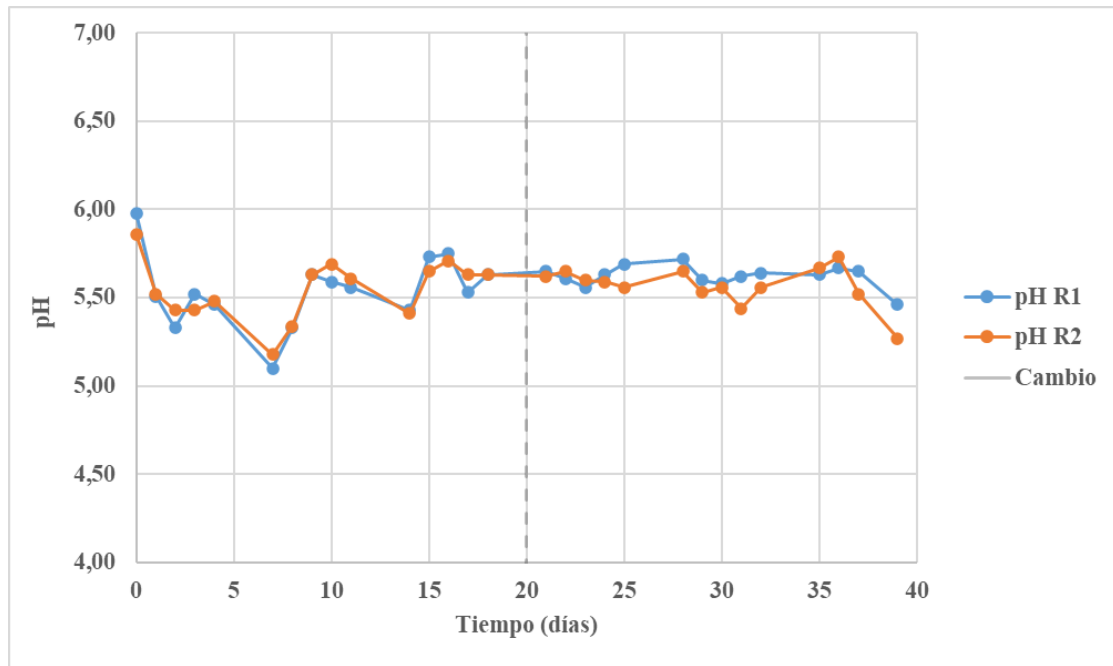


Figura 13: Evolución del pH en ambos reactores. La línea azul corresponde al reactor 1, mientras que la línea naranja hace referencia al reactor 2. La línea discontinua hace referencia al cambio de lote en la alimentación.

La evolución de la concentración de AGVs con el tiempo y la bioconversión alcanzada, se puede observar en las [Figura 14](#) y [Figura 15](#) para los reactores 1 y 2, respectivamente.

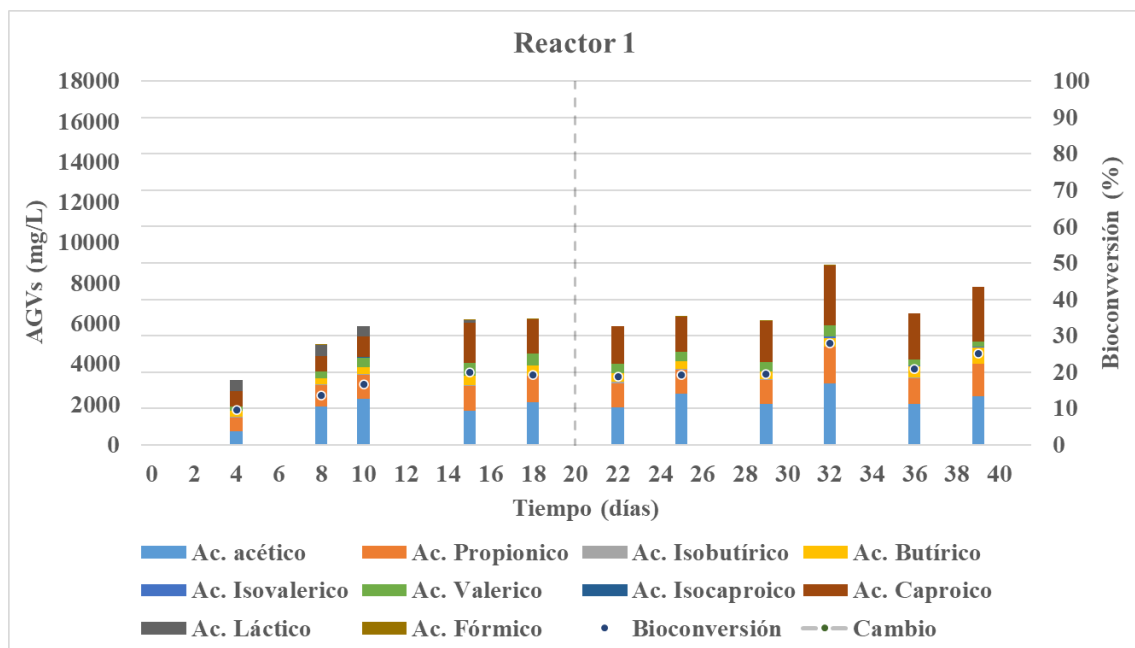


Figura 14: Evolución temporal de los AGVs del reactor 1. El punto indica la bioconversión alcanzada. La raya discontinua indica el cambio de lote en la alimentación.

Durante la operación del reactor 1 se observó una clara evolución de la concentración de AGVs. Durante los primeros días, hasta aproximadamente el día 10, se produjo un incremento progresivo tanto en los AGVs como en la bioconversión, lo que refleja una alta actividad microbiana. Los siguientes días tanto la concentración de AGVs como la bioconversión se mantuvieron estables en torno a 6.2 ± 0.1 g/L y $19.6 \pm 0.5\%$,

respectivamente. Sin embargo, tras el cambio de la alimentación el día 20, el sistema no presentó ninguna variación significativa, ya que ambos lotes presentaron una composición y características muy similares. Después del cambio, la concentración de AGVs y la bioconversión se estabilizaron en valores superiores a los iniciales, con valores medios de 7.1 ± 1.2 g/L y de $23.3 \pm 3.8\%$, respectivamente. Tras 40 días de operación y una tendencia estable en la bioconversión, se consideró que el sistema había alcanzado el equilibrio, dando por terminado el experimento.

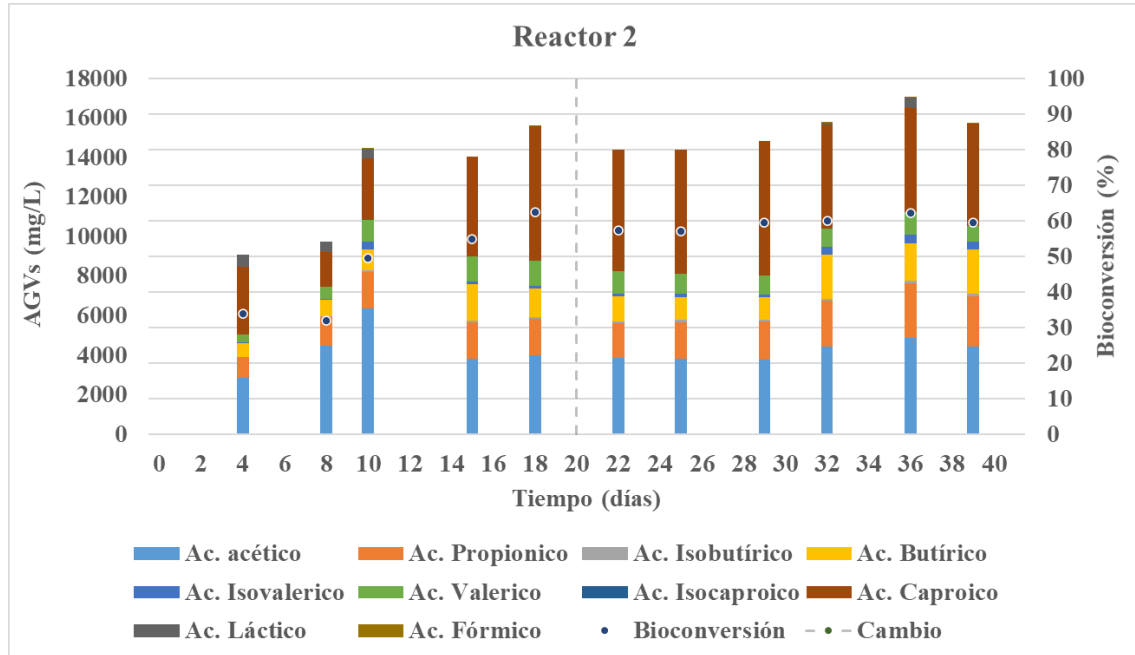


Figura 15: Evolución temporal de los AGVs del reactor 2. El punto indica la bioconversión alcanzada. La raya discontinua indica el cambio de lote en la alimentación

El comportamiento reactor 2 fue muy similar al observado en el reactor 1. Durante los primeros 10 días de operación, la concentración de AGVs y la bioconversión aumentó progresivamente, reflejando una adaptación activa de los microorganismos. De la misma manera que el reactor 1, el día 20 tras cambiar el lote de la alimentación, apenas hubo variaciones en la concentración y en la bioconversión, que rápidamente se estabilizaron en valores similares a los registrados antes del ajuste, con valores medios de 15.3 ± 1.0 g/L y $59.2 \pm 1.8\%$, respectivamente. Tras 40 días de operación, se consideró que la bioconversión estaba estable y se dio por finalizado el experimento.

El reactor 2 fue capaz de producir una concentración mayor de AGVs (15.3 ± 1.0 g/L) y tener una mayor bioconversión ($59.2 \pm 1.8\%$) en comparación con el reactor 1, que produjo 7.1 ± 1.2 g/L de AGVs y una bioconversión de $23.3 \pm 3.8\%$. Esta diferencia de valores se atribuyó a la naturaleza de la alimentación del reactor 1. Al ser alimentado con bagazo no pretratado, se limitó la disponibilidad de azúcares fermentables necesarios para la producción de AGVs. En cambio, el reactor 2 se alimentó con bagazo pretratado térmicamente, lo que liberó los azúcares fermentables, volviéndolo un sustrato más fácilmente fermentable, lo que promovió la generación de AGVs, demostrando la efectividad del pretratamiento.

Los resultados obtenidos en este estudio son ligeramente superiores a las obtenidas por Castilla et al. [3] quienes obtuvieron concentraciones de aproximadamente de 12 g/L empleando una hidrólisis ácida al bagazo como pretratamiento y con una fermentación a 37°C. En cambio, fueron inferiores a las obtenidas por Liu et al. [64] que reportaron concentraciones de 25 g/L y bioconversiones del 70% tras realizar al bagazo un pretratamiento de molienda seguido de una hidrólisis enzimática. Por otro lado, los valores del bagazo sin pretratamiento son similares a las registradas por Fonseca et al. [65] quienes obtuvieron una concentración de 8.0 g/L operando a temperatura de 35°C y un pH de 9. Sin embargo, fueron inferiores a los obtenidos por Liang et Wan. [66] que reportaron concentraciones de 13 g/L al llevar a cabo una fermentación a pH 7 utilizando bagazo sin pretratamiento como sustrato. Por otro lado, Aarle et al. [67] informó de bioconversiones del 31% utilizando como sustrato otro tipo de materiales lignocelulósicos, como la pulpa de remolacha o la cascara de los granos de trigo.

Por otro lado, la [Figura 16](#) muestra la distribución de los AGVs del reactor 1. El ácido caproico y el ácido acético, con un 35.1 y 33.6% respectivamente, fueron los principales AGVs obtenidos en el reactor 1. El ácido propiónico también presentó una proporción significativa con el 19.8%. En contraste, el ácido butírico y el valérico, estuvieron presente en menor medida, con una 7.2 y 5.7%, respectivamente.

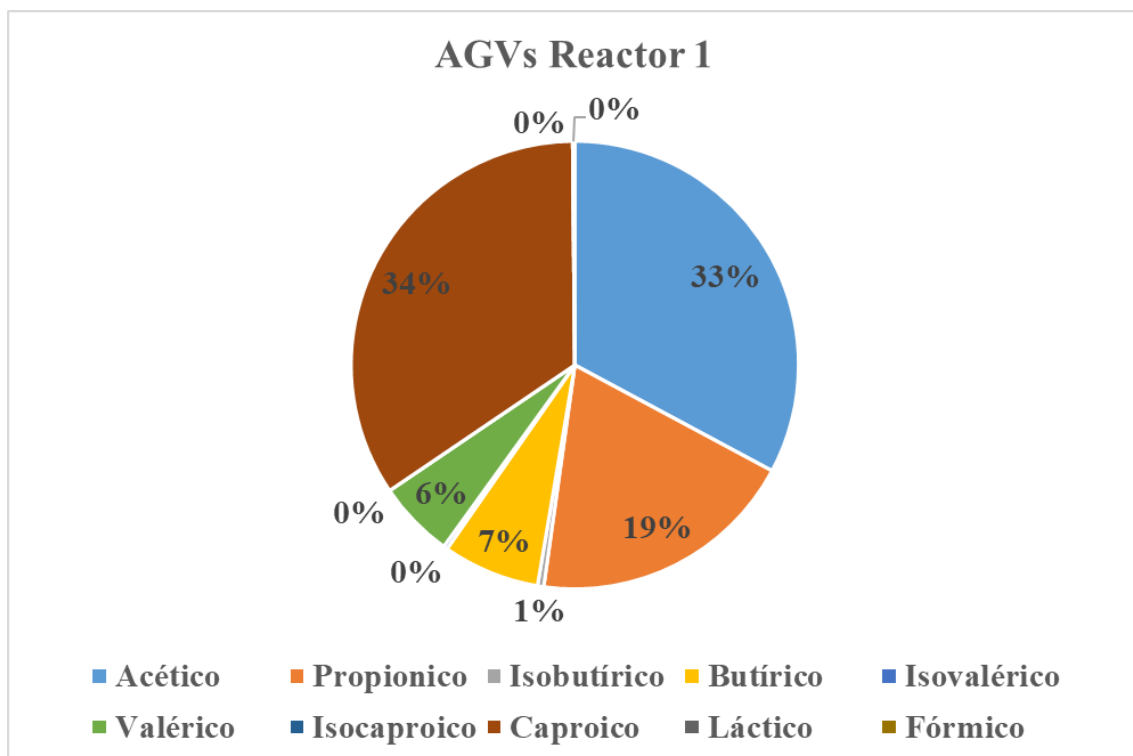


Figura 16: Proporción de cada AGVs en el reactor 1

En la [Figura 17](#) muestra la distribución de los AGVs del reactor 2. El ácido caproico fue mayoritario con un 37.9%, seguido del ácido acético, que representó un 27.2%. A continuación, el ácido propiónico y butírico, con proporciones en torno al 13%. El ácido valérico alcanzó una proporción del 6.6%.

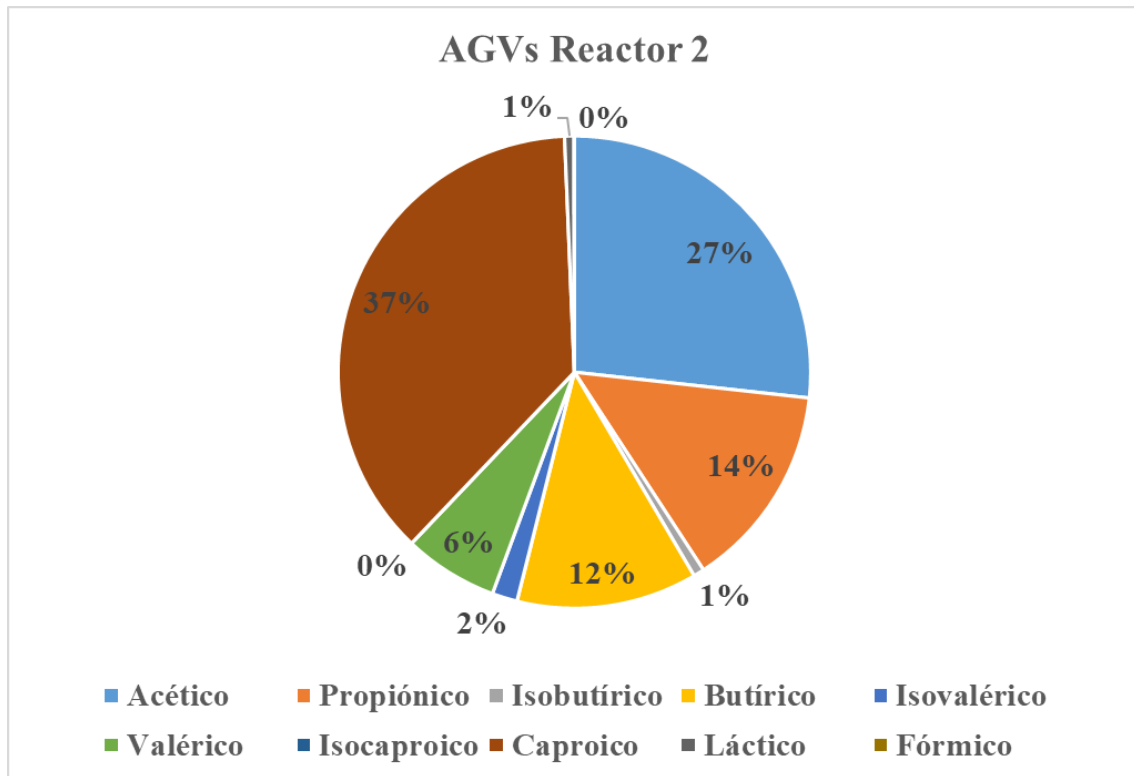


Figura 17: Proporción de cada AGVs en el reactor 2

Diferentes estudios señalan que la producción de AGVs a pH bajos favorece principalmente la síntesis de ácido acético y ácido butírico [3], [68]. Sin embargo, los resultados no se ajustan con los resultados, ya que, aunque el ácido acético sí se encontró en grandes proporciones, no ocurrió lo mismo con el ácido butírico. Esto se puede explicar por el hecho de que el butírico se puede transformar en caproico mediante rutas de elongación de la cadena [69], lo cual explicaría la alta concentración de ácido caproico y la baja concentración de ácido butírico. Además, pHs relativamente bajos, una temperatura en torno a los 25°C, como la empleada en este estudio, y THR de medio-largos, favorecen la síntesis de ácido caproico [70]. Por otro lado, la concentración de ácido propiónico se encontró en un rango bajo, lo cual es esperable, ya que se trata de un producto secundario cuando se trabaja a pH bajos. Además, grandes cantidades de ácido propiónico provocan una bajada del pH interno de las células e inhiben los mecanismos responsables para su restauración, lo que inhibe el funcionamiento celular [68].

4.3.2. Eliminación de DQO

En la [Figura 18](#) se muestra la eliminación de DQOt en ambos reactores. Este parámetro indica la cantidad de DQOt degradada por la acción de los microorganismos, permitiendo conocer cuanta materia orgánica ha sido consumida y transformada en biogás, ya que ambos parámetros tienen una relación directamente proporcional en estos procesos [71].

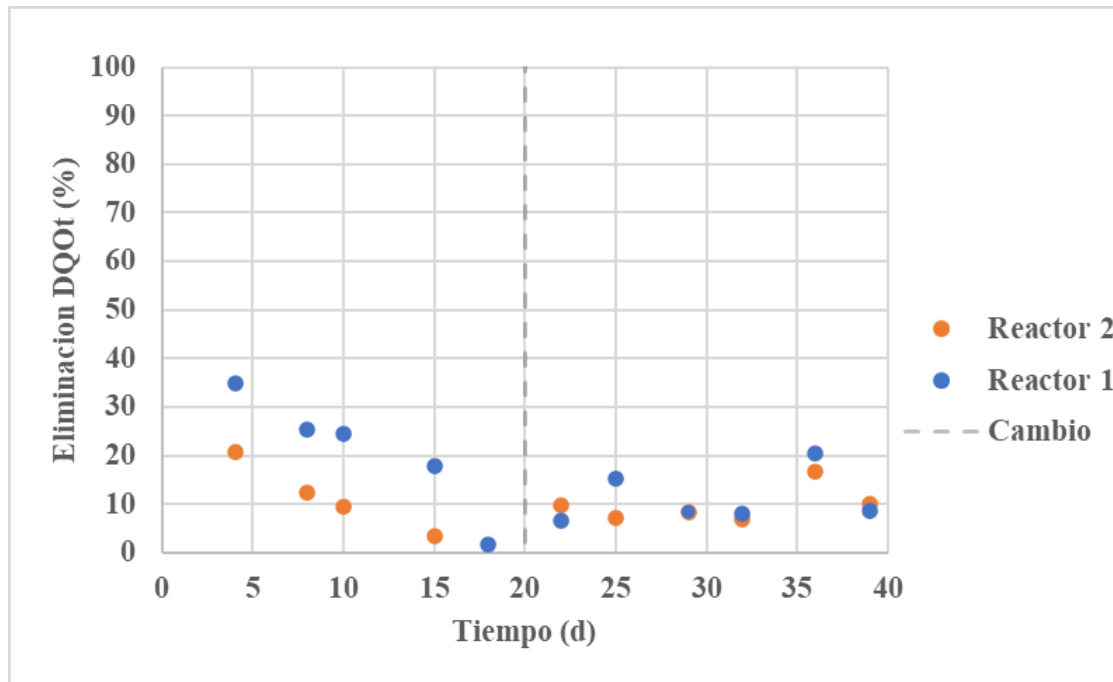


Figura 18: Evolución de la eliminación de DQOt respecto del tiempo. Los puntos de color azul corresponden al reactor 1, mientras que los puntos de color naranja al reactor 2. La línea discontinua hace referencia al cambio de lote en la alimentación.

En ambos reactores, al principio de la operación, la eliminación de DQOt fue relativamente alta debido a la alta actividad biológica metanogénica (fango utilizado para inoculación). Sin embargo, tras los primeros días, se estabilizaron en valores bastante bajos. El reactor 1 presentó una eliminación del $9.3 \pm 4.9\%$, en cambio la del reactor 2 fue del $8.8 \pm 3.9\%$. Estos bajos porcentajes de eliminación indicaron que apenas se consumió la materia orgánica, por lo que sugirió que toda carga orgánica aportada en la alimentación se transformó en AGVs, los cuales apenas fueron consumidos por las arqueas metanogénicas.

La escasa eliminación de DQOt explicó los bajos índices de producción de biogás. El reactor 1 produjo 17.0 ± 6.2 mL/día de biogás, en cambio, el reactor 2 tuvo una producción mayor que el reactor 1, siendo capaz de producir 31.7 ± 6.3 mL/día. Pese a ello, los principales componentes para ambos reactores fueron el nitrógeno (N_2) ($39.4 \pm 3.3\%$ y $34.9 \pm 3.7\%$) y el dióxido de carbono (CO_2) ($24.9 \pm 2.7\%$ y $29.7 \pm 1.6\%$). Por otro lado, la proporción de metano (CH_4) ($3.7 \pm 2.5\%$) fue muy inferior a los valores de la bibliografía, que suele ser en torno a 60-70% [32]. Este hecho también se relacionó con la escasa eliminación de DQOt, además también indicó que la fase metanogénica de la digestión estuvo detenida, por lo que no se consumieron los AGVs producidos.

Este parámetro también indicó cuando el sistema alcanzó el equilibrio, ya que cuando la eliminación de DQOt se mantuvo constante significó que toda la materia orgánica está siendo transformada en AGVs, los cuales no estaban siendo consumidos, por lo que el sistema alcanzó el equilibrio.

4.3.3. Mineralización del nitrógeno

La mineralización del N_2 es un parámetro que indica como se degradan las proteínas. La mineralización cuantifica la cantidad de nitrógeno orgánico de la alimentación que se transforma en nitrógeno inorgánico, principalmente en amonio (NH_4^+).

Como se observa en la [Figura 19](#), los primeros 20 días de operación, la mineralización disminuye paulatinamente en ambos reactores, esto se debe a que durante los primeros días de operación la actividad microbiana. Los reactores se estabilizaron en valores de $1.2 \pm 1.2\%$ y $12.4 \pm 1.1\%$, respectivamente. Estos valores fueron relativamente bajos, lo que indicó la escasa degradación de las proteínas por parte de los microorganismos. Estos valores se corresponden a los esperados, debido a la escasa concentración de proteínas en los sustratos.

Por otro lado, el reactor 2 tuvo una mayor mineralización que el reactor 1, ya que tras realizar el pretratamiento la disponibilidad de proteínas aumentó, facilitando su degradación y la formación de NH_4^+ . Sin embargo, valores superiores a 60 mg/L como los obtenidos, inhiben casi por completo la metanogénesis [3], lo cual era un objetivo para la producción de AGVs, además, valores de NH_4^+ superiores a 300 mg/L, los cuales no se alcanzaron, pueden afectar significativamente a la acidogénesis, incluso inhibir el proceso [3].

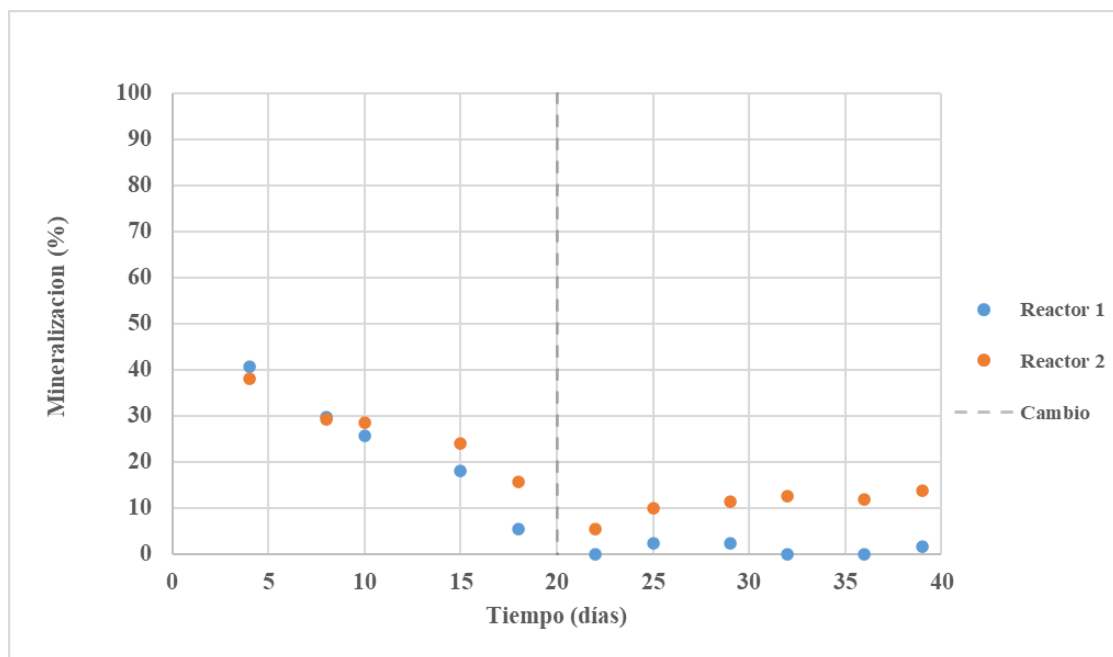


Figura 19: Evolución temporal de la mineralización del N. La línea naranja representa al reactor 2, mientras que la azul representa al reactor 1. La línea discontinua indica el cambio de lote en la alimentación.

5. Conclusiones

Este estudio ha permitido evaluar la viabilidad de la producción de AGVs mediante la fermentación anaerobia en reactores de tanque agitado operado de forma semicontinua utilizando bagazo de la industria cervecera como sustrato.

Para favorecer la producción de AGVs, se redujo el pH a valores entre 5,5-6, con el objetivo de inhibir la fase metanogénica de la digestión anaerobia, transformando el proceso en una fermentación. Esta estrategia se reflejó en las bajas eliminaciones de DQOt obtenidas, alineadas también con bajas proporciones de metano detectadas en el biogás.

El pretratamiento del bagazo mediante explosión de vapor (180°C durante 20 minutos) ha resultado ser una alternativa muy interesante, logrando un incremento notable de la solubilidad de la DQO, alcanzando valores 44.5% sobre la total. La hidrólisis enzimática posterior aumentó la solubilidad hasta un valor de 58.5% con la dosis más alta (180 g/gSV) y 53.6% con la dosis más baja (90 g/gSV). Sin embargo, el escaso incremento alcanzado frente a los costes asociados a la realización de la hidrólisis enzimática, hizo inviable este pretratamiento.

Durante la operación de los dos reactores, donde el reactor 1 fue alimentado con bagazo sin pretratar y el reactor 2 con bagazo pretratado, se observó que el reactor 2 incrementó las concentraciones de AGVs con respecto al reactor 1, llegando a valores de 15.3 g/L, y mejoró la bioconversión estabilizándose en valores 59.2%. Esta mejora se atribuye a la mayor disponibilidad de azúcares fermentables y proteínas que fueron liberados por el pretratamiento térmico, lo que favoreció la bioconversión.

Por otro lado, la distribución AGVs fue muy similar en ambos reactores, con el ácido caproico (35.1% y 37.9% respectivamente) y el ácido acético (33.6% y 27.2%, respectivamente) como los ácidos predominantes. Contrariamente con lo reportado en la literatura, que indica que a pH bajos deberían predominar los ácidos acético y butírico, este último se encuentre en concentraciones menores (7.2% y 13.0%, respectivamente), lo que sugiere que las condiciones de operación y el medio de cultivo favoreció la transformación del ácido butírico en caproico mediante reacciones de elongación de cadena.

Los resultados obtenidos confirman la viabilidad de utilizar bagazo de cerveza, un producto de desecho, como materia prima para la producción de AGVs mediante la fermentación anaerobia. Además, también se demostró la eficacia de la explosión de vapor como pretratamiento, al facilitar la liberación de azúcares y mejorar la bioconversión.

6. Bibliografía

- [1] M. Atasoy, I. Owusu-Agyeman, E. Plaza, and Z. Cetecioglu, "Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges," Nov. 01, 2018, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.042.
- [2] "INFORMACIÓN BÁSICA SOBRE EL RESIDUO CERO."
- [3] J. Castilla-Archilla, S. Papirio, and P. N. L. Lens, "Two step process for volatile fatty acid production from brewery spent grain: Hydrolysis and direct acidogenic fermentation using anaerobic granular sludge," *Process Biochemistry*, vol. 100, pp. 272–283, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.procbio.2020.10.011.
- [4] F. Mimún Mohamed Director, D. José Ramón Andres Díaz, and F. Mimún Mohamed, "Evaluación de los impactos ambientales de una incineradora de residuos sólidos urbanos con recuperación de energía mediante el análisis de ciclo de vida," 2015. [Online]. Available: <http://orcid.org/0000-0002-6469-481X>
- [5] L. Makarichi, W. Jutidamrongphan, and K. anan Techato, "The evolution of waste-to-energy incineration: A review," Aug. 01, 2018, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.rser.2018.04.088.
- [6] T. Mengistu, H. Gebrekidan, K. Kibret, K. Woldetsadik, B. Shimelis, and H. Yadav, "Comparative effectiveness of different composting methods on the stabilization, maturation and sanitization of municipal organic solid wastes and dried faecal sludge mixtures," *Environmental Systems Research*, vol. 6, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1186/s40068-017-0079-4.
- [7] E. Lizundia, F. Luzi, and D. Puglia, "Organic waste valorisation towards circular and sustainable biocomposites," Jun. 16, 2022, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d2gc01668k.
- [8] P. Weiland, "Biogas production: Current state and perspectives," 2010, *Springer Verlag*. doi: 10.1007/s00253-009-2246-7.
- [9] J. A. Beltethon Escobar, "Tecnologías para la producción de ácidos grasos volátiles a partir de aguas residuales de la industria cervecera," 2022.
- [10] "Cerveza: líderes producción mundial en 2023 | Statista." Accessed: May 04, 2025. [Online]. Available: <https://es.statista.com/estadisticas/1147467/lideres-produccion-cerveza-mundial/>
- [11] "La industria de la cerveza en España- Datos estadísticos | Statista." Accessed: Mar. 14, 2025. [Online]. Available: <https://es.statista.com/temas/5410/la-industria-de-la-cerveza-en-espana/#topicOverview>
- [12] "Cerveza: producción europea por país en 2023 | Statista." Accessed: Mar. 14, 2025. [Online]. Available: <https://es.statista.com/estadisticas/1147479/produccion-europea-por-pais/>
- [13] E. Vieira *et al.*, "Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans," *Ind Crops Prod*, vol. 52, pp. 136–143, 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.10.012.

- [14] A. B. de Camargos *et al.*, “Production of biogas and fermentable sugars from spent brewery grains: Evaluation of one- and two-stage thermal pretreatment in an integrated biorefinery,” *J Environ Chem Eng*, vol. 9, no. 5, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.jece.2021.105960.
- [15] “Bagazo de cerveza - Wikipedia, la enciclopedia libre.” Accessed: Mar. 14, 2025. [Online]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Bagazo_de_cerveza
- [16] S. I. Mussatto, G. Dragone, and I. C. Roberto, “Brewers’ spent grain: Generation, characteristics and potential applications,” Jan. 2006. doi: 10.1016/j.jcs.2005.06.001.
- [17] D. Macheiner, B. F. Adamitsch, F. Karner, and W. A. Hampel, “Pretreatment and Hydrolysis of Brewer’s Spent Grains,” *Eng Life Sci*, vol. 3, no. 10, pp. 401–405, Oct. 2003, doi: 10.1002/elsc.200301831.
- [18] N. G. Belibasakis and D. Tsirgogianni, “Effects of wet brewers grains on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows in hot weather,” 1996.
- [19] N. Gurdo, “Mejoramiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Y138 por ingeniería evolutiva para la producción de bioetanol de segunda generación,” 2016, doi: 10.13140/RG.2.1.4246.3602.
- [20] P. E. Plaza Lázaro, “Valorización de bagazo de a industria cervecera mediante su transformación en biocombustibles avanzados: biobutanol,” 2017.
- [21] B. Weber, I. D. Ayala-Mercado, and E. A. Stadlbauer, “Steam explosion versus hydrothermal carbonization: evaluation of applicability for pretreatment of semi-solid waste from beverage industries to facilitate on-site biogas production,” *Biomass Convers Biorefin*, vol. 14, no. 6, pp. 7659–7671, Mar. 2024, doi: 10.1007/s13399-022-02983-3.
- [22] Y. Sun and J. Cheng, “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review q,” 2001.
- [23] G. T. Mihiretu, A. F. Chiphango, and J. F. Görgens, “Steam explosion pre-treatment of alkali-impregnated lignocelluloses for hemicelluloses extraction and improved digestibility,” *Bioresour Technol*, vol. 294, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.122121.
- [24] K. Wang, J. Chen, S. N. Sun, and R. C. Sun, “Steam Explosion,” in *Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies*, Elsevier Inc., 2015, pp. 75–104. doi: 10.1016/B978-0-12-800080-9.00006-2.
- [25] T. Thamsee, S. Choojit, B. Cheirsilp, R. Yamseangsung, T. Ruengpeerakul, and C. Sangwichien, “Combination of Superheated Steam Explosion and Alkaline Autoclaving Pretreatment for Improvement of Enzymatic Digestibility of the Oil Palm Tree Residues as Alternative Sugar Sources,” *Waste Biomass Valorization*, vol. 10, no. 10, pp. 3009–3023, Oct. 2019, doi: 10.1007/s12649-018-0292-z.
- [26] L. Wang, Y. Liu, and H. Chen, “A Steam-Explosion-Based Hydrolysis and Acidification Technology for Cornstalk Bioconversion,” *Bioenergy Res*, vol. 12, no. 1, pp. 103–111, Mar. 2019, doi: 10.1007/s12155-018-9945-9.

- [27] S. P. S. Chundawat *et al.*, "Ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment of lignocellulosic biomass," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2020, no. 158, Apr. 2020, doi: 10.3791/57488.
- [28] W. R. Grous, A. O. Converse, and H. E. Grethlein, "Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar," 1985.
- [29] O. Arango Bedoya and L. Sanches E Sousa, "Tratamiento de aguas residuales De la industria láctea en sistemas anaerobios tipo UASB," 2009. [Online]. Available: www.wastewaterengineering.com
- [30] R. Adolfo Parra Huertas, "Anaerobic digestión: biotechnological mechanisms in waste water treatments and their application in food industry," 2015.
- [31] M. Zhou, B. Yan, J. W. C. Wong, and Y. Zhang, "Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways," Jan. 01, 2018, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.121.
- [32] L. Appels, J. Baeyens, J. Degreè, and R. Dewil, "Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge," Dec. 2008. doi: 10.1016/j.peccs.2008.06.002.
- [33] S. Aydin, H. Yesil, and A. E. Tugtas, "Recovery of mixed volatile fatty acids from anaerobically fermented organic wastes by vapor permeation membrane contactors," *Bioresour Technol*, vol. 250, pp. 548–555, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.061.
- [34] R. R. Singhanian, A. K. Patel, G. Christophe, P. Fontanille, and C. Larroche, "Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation," *Bioresour Technol*, vol. 145, pp. 166–174, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.137.
- [35] S. Agnihotri *et al.*, "A Glimpse of the World of Volatile Fatty Acids Production and Application: A review," 2022, *Taylor and Francis Ltd.* doi: 10.1080/21655979.2021.1996044.
- [36] H. Liu, P. Han, H. Liu, G. Zhou, B. Fu, and Z. Zheng, "Full-scale production of VFAs from sewage sludge by anaerobic alkaline fermentation to improve biological nutrients removal in domestic wastewater," *Bioresour Technol*, vol. 260, pp. 105–114, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.105.
- [37] J. Sun, L. Zhang, and K. C. Loh, "Review and perspectives of enhanced volatile fatty acids production from acidogenic fermentation of lignocellulosic biomass wastes," Dec. 01, 2021, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi: 10.1186/s40643-021-00420-3.
- [38] S. Sun *et al.*, "A review of volatile fatty acids production from organic wastes: Intensification techniques and separation methods," Jun. 01, 2024, *Academic Press*. doi: 10.1016/j.jenvman.2024.121062.
- [39] S. Aghapour Aktij, A. Zirehpour, A. Mollahosseini, M. J. Taherzadeh, A. Tiraferri, and A. Rahimpour, "Feasibility of membrane processes for the recovery and purification of bio-

- based volatile fatty acids: A comprehensive review,” Jan. 25, 2020, *Korean Society of Industrial Engineering Chemistry*. doi: 10.1016/j.jiec.2019.09.009.
- [40] F. Raposo *et al.*, “First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: Evaluating sources of error,” 2013, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.trac.2013.07.007.
- [41] “Mercado de ácido acético - Tamaño, tendencias y crecimiento.” Accessed: Mar. 14, 2025. [Online]. Available: <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/acetic-acid-market>
- [42] “Ácido acético solution for analysis EMSURE® Reag. Ph Eur | Sigma-Aldrich.” Accessed: Mar. 14, 2025. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/mm/159166>
- [43] S. K. Bhatia and Y. H. Yang, “Microbial production of volatile fatty acids: current status and future perspectives,” Jun. 01, 2017, *Springer Netherlands*. doi: 10.1007/s11157-017-9431-4.
- [44] “Ácido propiónico CAS 79-09-4 | 800605.” Accessed: Mar. 14, 2025. [Online]. Available: https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Propionic-acid,MDA_CHEM-800605?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- [45] “Ácido n-butírico CAS 107-92-6 | 800457.” Accessed: Mar. 14, 2025. [Online]. Available: https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Butyric-acid,MDA_CHEM-800457?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- [46] M. P. Zacharof and R. W. Lovitt, “Recovery of volatile fatty acids (VFA) from complex waste effluents using membranes,” *Water Science and Technology*, vol. 69, no. 3, pp. 495–503, 2014, doi: 10.2166/wst.2013.717.
- [47] “Ácido n-valérico CAS 109-52-4 | 800821.” Accessed: May 12, 2025. [Online]. Available: https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Pentanoic-acid,MDA_CHEM-800821?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- [48] “Ácido hexanoico CAS 142-62-1 | 800198.” Accessed: May 12, 2025. [Online]. Available: https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Hexanoic-acid,MDA_CHEM-800198
- [49] K. Kemppainen, K. Rommi, U. Holopainen, and K. Kruus, “Steam explosion of Brewer’s spent grain improves enzymatic digestibility of carbohydrates and affects solubility and stability of proteins,” *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 180, no. 1, pp. 94–108, Sep. 2016, doi: 10.1007/s12010-016-2085-9.
- [50] R. Valenzuela, X. Priebe, E. Troncoso, I. Ortega, C. Parra, and J. Freer, “Fiber modifications by organosolv catalyzed with H₂SO₄ improves the SSF of *Pinus radiata*,” *Ind Crops Prod*, vol. 86, pp. 79–86, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.indcrop.2016.03.037.
- [51] C. Chenebault and B. Percheron, “Development of a simple and versatile process for commercial and municipal lignocellulosic waste conversion into fermentable sugars,” *Bioresour Technol*, vol. 386, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.biortech.2023.129497.
- [52] S. D. M. Hasan, C. Giongo, M. L. Fiorese, S. D. Gomes, T. C. Ferrari, and T. E. Savoldi, “Volatile fatty acids production from anaerobic treatment of cassava waste water:

- Effect of temperature and alkalinity," *Environmental Technology (United Kingdom)*, vol. 36, no. 20, pp. 2637–2646, Oct. 2015, doi: 10.1080/09593330.2015.1041426.
- [53] F. W. Gilcreas, *Standard methods for the examination of water and waste water.*, vol. 56. 1966. doi: 10.2105/AJPH.56.3.387.
- [54] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [55] P. Sáez-Plaza, M. J. Navas, S. Wybraniec, T. Michałowski, and A. G. Asuero, "An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality Control," *Crit Rev Anal Chem*, vol. 43, no. 4, pp. 224–272, Oct. 2013, doi: 10.1080/10408347.2012.751787.
- [56] S. Greses, M. Llamas, A. Kaoutar, and C. González-Fernández, "Vinasses valorization into short-chain fatty acids: microbiome robustness against process variations," *Bioresour Bioprocess*, vol. 12, no. 1, Dec. 2025, doi: 10.1186/s40643-025-00865-w.
- [57] K. Wang, X. Nan, J. Tong, G. Zhao, L. Jiang, and B. Xiong, "Steam Explosion Pretreatment Changes Ruminal Fermentation in vitro of Corn Stover by Shifting Archaeal and Bacterial Community Structure," *Front Microbiol*, vol. 11, Aug. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.02027.
- [58] S. Ni, W. Zhao, Y. Zhang, M. A. A. Gasmalla, and R. Yang, "Efficient and eco-friendly extraction of corn germ oil using aqueous ethanol solution assisted by steam explosion," *J Food Sci Technol*, vol. 53, no. 4, pp. 2108–2116, Apr. 2016, doi: 10.1007/s13197-016-2189-9.
- [59] S. Zhang *et al.*, "Application of steam explosion in oil extraction of camellia seed (*Camellia oleifera* Abel.) and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid, and antioxidant activities," *Food Sci Nutr*, vol. 7, no. 3, pp. 1004–1016, Mar. 2019, doi: 10.1002/fsn3.924.
- [60] S. Wilkinson, K. A. Smart, and D. J. Cook, "A comparison of dilute acid- and alkali-catalyzed hydrothermal pretreatments for bioethanol production from brewers' spent grains," *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 72, no. 2, pp. 143–153, 2014, doi: 10.1094/ASBCJ-2014-0327-02.
- [61] F. Garcia-Ochoa *et al.*, "Multi-feedstock lignocellulosic biorefineries based on biological processes: An overview," Nov. 15, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.indcrop.2021.114062.
- [62] P. Niemi, C. B. Faulds, J. Sibakov, U. Holopainen, K. Poutanen, and J. Buchert, "Effect of a milling pre-treatment on the enzymatic hydrolysis of carbohydrates in brewer's spent grain," *Bioresour Technol*, vol. 116, pp. 155–160, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.04.043.
- [63] G. Pierre *et al.*, "Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain," *J Cereal Sci*, vol. 54, no. 3, pp. 305–310, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.jcs.2011.06.004.

- [64] C. Liu, A. Ullah, X. Gao, and J. Shi, "Synergistic Ball Milling–Enzymatic Pretreatment of Brewer’s Spent Grains to Improve Volatile Fatty Acid Production through Thermophilic Anaerobic Fermentation," *Processes*, vol. 11, no. 6, Jun. 2023, doi: 10.3390/pr11061648.
- [65] Y. A. da Fonseca, E. da Silva Barreto, P. F. Lomar, S. de Q. Silva, L. V. A. Gurgel, and B. E. L. Baêta, "Biobased production of volatile fatty acids from brewer’s spent grain: Optimization and insights into the impact of protein extraction on process performance," *Biochem Eng J*, vol. 203, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.bej.2024.109218.
- [66] S. Liang and C. Wan, "Carboxylic acid production from Brewer’s spent grain via mixed culture fermentation," *Bioresour Technol*, vol. 182, pp. 179–183, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.082.
- [67] I. M. van Aarle, A. Perimenis, J. Lima-Ramos, E. de Hults, I. F. George, and P. A. Gerin, "Mixed inoculum origin and lignocellulosic substrate type both influence the production of volatile fatty acids during acidogenic fermentation," *Biochem Eng J*, vol. 103, pp. 242–249, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.bej.2015.07.016.
- [68] A. Vázquez-Fernández, M. E. Suárez-Ojeda, and J. Carrera, "Review about bioproduction of Volatile Fatty Acids from wastes and wastewaters: Influence of operating conditions and organic composition of the substrate," *J Environ Chem Eng*, vol. 10, no. 3, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.jece.2022.107917.
- [69] S. G. Arhin, A. Cesaro, F. Di Capua, and G. Esposito, "Acidogenic fermentation of food waste to generate electron acceptors and donors towards medium-chain carboxylic acids production," *J Environ Manage*, vol. 348, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.jenvman.2023.119379.
- [70] K. Aboudi, S. Greses, and C. González-Fernández, "Hydraulic Retention Time as an Operational Tool for the Production of Short-Chain Carboxylates via Anaerobic Fermentation of Carbohydrate-Rich Waste," *Molecules*, vol. 28, no. 18, Sep. 2023, doi: 10.3390/molecules28186635.
- [71] I. N. Al-Sulaimi, J. K. Nayak, H. Alhimali, A. Sana, and A. Al-Mamun, "Effect of Volatile Fatty Acids Accumulation on Biogas Production by Sludge-Feeding Thermophilic Anaerobic Digester and Predicting Process Parameters," *Fermentation*, vol. 8, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/fermentation8040184.