



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**CENTRO DE ESTUDIOS
AVANZADOS EN ENERGÍA Y
MEDIO AMBIENTE**

TESIS DOCTORAL



**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA
GENERACIÓN A PARTIR DE BAGAZO DE
CERVEZA**

PRESENTADA POR:

José Antonio Rojas Chamorro

DIRIGIDA POR:

M^a Inmaculada Romero Pulido

Eulogio Castro Galiano

JAÉN, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**CENTRO DE ESTUDIOS
AVANZADOS EN ENERGÍA Y
MEDIO AMBIENTE**

TESIS DOCTORAL



PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR DE BAGAZO DE CERVEZA

José Antonio Rojas Chamorro, doctorando del Programa de Doctorado en Energías Renovables presenta esta Tesis Doctoral para optar al grado de DOCTOR por la Universidad de Jaén.

Jaén, octubre de 2019

ROJAS
CHAMORRO
JOSE ANTONIO
- 75121223A

Firmado digitalmente
por ROJAS
CHAMORRO JOSE
ANTONIO -
75121223A
Fecha: 2019.10.23
19:30:17 +02'00'

Fdo. José Antonio Rojas Chamorro



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**CENTRO DE ESTUDIOS
AVANZADOS EN ENERGÍA Y
MEDIO AMBIENTE**

TESIS DOCTORAL



PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR DE BAGAZO DE CERVEZA

Los doctores M^a Inmaculada Romero Pulido y Eulogio Castro Galiano, directores de la Tesis Doctoral realizada por José Antonio Rojas Chamorro, autorizan su presentación a trámite, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa y así optar al grado de DOCTOR por la Universidad de Jaén.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente autorización

En Jaén a 24 de octubre 2019

**ROMERO
PULIDO MARIA
INMACULADA -
26001327B**

Firmado digitalmente
por ROMERO PULIDO
MARIA INMACULADA -
26001327B
Fecha: 2019.10.23
20:45:56 +02'00'

**CASTRO
GALIANO
EULOGIO -
25989401E**

Firmado digitalmente por CASTRO
GALIANO EULOGIO - 25989401E
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, serialNumber=25989401E,
sn=CASTRO GALIANO,
givenName=EULOGIO, cn=CASTRO
GALIANO EULOGIO - 25989401E
Fecha: 2019.10.23 22:14:00 +02'00'

Fdo. Dra. Inmaculada Romero Pulido

Fdo. Dr. Eulogio Castro Galiano

Profesora Titular en la Universidad de Jaén

Catedrático en la Universidad de Jaén

Agradecimientos

Si es difícil plasmar en unas hojas el trabajo realizado durante estos años, más difícil todavía es dar las gracias en unas pocas líneas a todos aquellos que han hecho que la realización de este trabajo fuera una experiencia tan gratificante y enriquecedora.

En primer lugar, quiero dar las gracias, a la Dr M^a Inmaculada Romero Pulido y al Dr. Eulogio Castro Galiano, quienes me dieron su inestimable apoyo, su confianza y sus magníficos comentarios y correcciones. Muchas gracias por vuestra importante contribución en la redacción de los trabajos publicados. Nunca olvidaré la doble oportunidad que me brindasteis, la laboral y la de comenzar a formar parte de vuestro grupo de investigación. Sin vosotros, este trabajo no hubiera sido posible.

Quiero mostrar mi gratitud también a los demás Drs. del grupo de investigación TEP 233 del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, en especial a Cristóbal Cara Corpas, Encarnación Ruiz Ramos, Francisco Espínola, Manuel Moya y a nuestro técnico Mariola de La Casa.

También dar las gracias al Dr. Juan Miguel Romero García. Gracias amigo por implicarte tanto, por hacerme sentir en todo momento capaz de conseguir lo que me propusiera y por estar siempre dispuesto a echar una mano. Eres genial.

A mis compañeros de laboratorio Antonio Jesús, Manuel, Alfonso, Sonia, Carlos, Valeria y a todos los compañeros que nos han visitado, especialmente a Cícero, Felipe y Luciana (Brasil), Yessica (Colombia) y Mairan (Uruguay). Gracias por vuestros ánimos y por todos los buenos momentos compartidos.

A mis amigos portugueses Antónia Maria Prates Oliveira y João Manuel Antunes Oliveira por su generosidad y hospitalidad durante el tiempo que estuve con vosotros.

A mis padres y a mi hermana por su ánimo y apoyo, sin ellos esto nunca habría salido hacia adelante.

A mi familia, a los que están y los que ya no están, os tengo muy presentes todos los días.

A todos mis amigos que se preocupan, que me animan y ayudan en todo momento.

A las personas más humildes y simples.

A mis padres y hermana

A los que no están

“Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido del experimento, madre de toda certidumbre”

Leonardo da Vinci

“En la vida no existe nada que temer, solo cosas que comprender”

Marie Curie

“Si nos ponemos nerviosos, la vida es un mar de espinas. Si estamos tranquilos, la vida es un mar de rosas. Se trata sólo de creer que funcionará”

José Osvaldo da Silva



Índice

Índice	1
Índice de figuras	3
Índice de tablas	7
1. Resumen.....	9
2. Introducción.....	15
2.1 Contexto energético actual	17
2.2 La biomasa	24
2.3 El bagazo de cerveza	36
2.4 Bioetanol.....	51
2.5 Procesos de obtención de bioetanol lignocelulósico.....	58
2.5.1 Pretratamiento	59
2.5.2 Hidrólisis enzimática.....	66
2.5.3 Compuestos tóxicos del pretratamiento.....	71
2.5.4 Fermentación	80
2.5.5 Integración del proceso.....	89
3. Hipótesis y objetivos	96
4. Resumen de resultados.....	99



4.1 Materia prima.....	104
4.2 Comparativa de pretratamientos	107
4.3 Etanol de celulosa.....	119
4.4 Fermentación de licores de pretratamiento.....	124
4.5 Fermentación de los hidrolizados del slurry	127
4.6 Rendimiento global en etanol.....	133
5. Conclusiones	139
6. Bibliografía.....	144
7. Producción científica.....	169
7.1 Artículos incluidos en la Tesis Doctoral.....	171
Artículo 1:.....	171
Artículo 2:.....	181
Artículo 3:.....	189
Artículo 4:.....	221
7.2 Presentaciones en congresos	227



Índice de figuras

Figura 1: Inversión acumulada en generación de energía basada en energías renovables, 2013–2035 (Van der Hoeven , 2013)	18
Figura 2: Cifras totales de empleo en el sector de las energías renovables por tecnología (IRENA, 2018).....	19
Figura 3: Producción primaria de energía procedente de fuentes renovables, EU-28, 1990-2016 (Mtep), (IRENA, 2018).....	20
Figura 4: Estructura de la biomasa lignocelulósica (Alvarado, 2017)	27
Figura 5: Estructura de la celulosa (Ferreira et al., 2009).....	29
Figura 6: Constitución de la celulosa (Nueva Genesis., 2017).....	30
Figura 7: Alcoholes cinamílicos y precursores de la lignina (Yuan et al., 2013).....	33
Figura 8: Estructura química de la lignina (Bommarius et al., 2004).....	35
Figura 9: Proceso de elaboración de la cerveza (Elaboración propia).....	40
Figura 10: Aplicaciones del bioetanol como biocarburante (Elaboración propia)	52



Figura 11: Ilustración del pretratamiento (Adaptado de Mood et al, 2013)	60
Figura 12: Actuación de las endoglucanasas (Gupta y Verma, 2015)	68
Figura 13: Modo de acción de las exoglucanasas (Gupta y Verma, 2015).	69
Figura 14: Modo de acción de la β -Glucosidasa (Gupta y Verma, 2015)	69
Figura 15: Clasificación según su origen de los compuestos inhibidores producidos durante el pretratamiento (Jönsson et al., 2013)	72
Figura 16: Compuestos que actúan como inhibidores en la Hidrólisis enzimática con celulasa (a) y microorganismos fermentativos (b) (Ko et al., 2015)	73
Figura 17: Diferentes métodos de detoxificación (Romero-García, 2016).....	77
Figura 18: Ruta metabólica general de la <i>S. cerevisiae</i> para la producción de etanol a partir de la glucosa (Zabed et al., 2017).....	83
Figura 19: Ruta metabólica de <i>S. Stipitis</i> (Jeffries, 2006)	85
Figura 20: Ruta metabólica de <i>E. coli</i> KO11 (Huerta-Beristain, 2004)	87



Figura 21: Esquema simplificado del proceso experimental.....	103
Figura 22: Composición del bagazo de cerveza (valores medios de seis determinaciones).....	106
Figura 23: Concentración y recuperación de azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado bajo las condiciones óptimas de cada pretratamiento.....	112
Figura 24: Producción de glucosa y rendimientos de hidrólisis a partir del bagazo pretratado en las condiciones óptimas de cada pretratamiento.....	115
Figura 25: Concentraciones de etanol y rendimientos (referidos al teórico, 0,51 g etanol/g glucosa) para las configuraciones de proceso ensayadas con 15 % de carga de sustrato.....	122
Figura 26: Balance de materia de la configuración de proceso basada en la hidrólisis enzimática del slurry resultante del pretratamiento del bagazo con ácido fosfórico en condiciones óptimas.....	137
Figura 27: Balance de materia de la configuración basada en la hidrólisis enzimática del slurry resultante del pretratamiento del bagazo con ácido sulfúrico en condiciones óptimas, incluyendo detoxificación del hidrolizado con carbón activo.....	138



Índice de tablas

Tabla 1: Composición de diferentes materiales lignocelulósicos (%peso seco) (Karagoz et al., 2019)	28
Tabla 2: Diferentes composiciones (% en base seca) del bagazo de cerveza (Elaboración propia).....	42
Tabla 3: Comparación de bioetanol de primera, segunda y tercera generación (Jambo et al., 2016).....	55
Tabla 4: Plantas de Etanol celulósico en Europa (Karagoz et al., 2019).....	56
Tabla 5: Resumen de los principales pretratamientos (adaptada de Carrillo-Nieves et al., 2019)	63
Tabla 6: Ventajas y desventajas de distintas configuraciones de hidrólisis por vía enzimática y fermentación, adaptada de (Carrillo-Nieves et al., 2019)	94
Tabla 7: Condiciones de operación empleadas en los pretratamientos aplicados al bagazo.....	108
Tabla 8: Recuperación y rendimientos globales de azúcares en las condiciones óptimas de los distintos pretratamientos (expresados como g azúcares/100 g bagazo)	116
Tabla 9: Resultados de las configuraciones de proceso llevadas a cabo para la obtención de bioetanol a partir del bagazo pretratado en condiciones óptimas.....	120



Tabla 10: Principales resultados de la fermentación de prehidrolizados de bagazo.....125

Tabla 11: Principales resultados de la fermentación de hidrolizados obtenidos tras la hidrólisis enzimática del slurry del bagazo.....129

Tabla 12: Rendimientos globales en etanol respecto a la materia prima (g etanol/100 g bagazo original).....134



1. RESUMEN



La presente Tesis Doctoral de título “Producción de bioetanol de segunda generación a partir de bagazo de cerveza” se enmarca en la línea de investigación sobre aprovechamiento de residuos lignocelulósicos del Grupo de Investigación “Ingeniería Química y Ambiental” (TEP-233) de la Universidad de Jaén.

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo principal proponer un esquema eficiente de proceso para la producción de etanol de segunda generación a partir de bagazo de cerveza, que es el principal subproducto generado en el proceso de producción de cerveza. En la actualidad, su aplicación principal es la alimentación animal, lo que representa un uso limitado, con bajo beneficio para las fábricas de cerveza. El bagazo de cerveza está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa, proteínas y lignina.

Para lograr el objetivo propuesto en esta Tesis Doctoral, se ha realizado en primer lugar la optimización de dos pretratamientos diferentes. El pretratamiento con ácido fosfórico se ha optimizado mediante un diseño central compuesto rotatable, evaluando la influencia de la temperatura de pretratamiento (140-180 °C) y la concentración de ácido fosfórico (2-6 % p/v), manteniendo una carga de sólidos del 12,5 % (p/v). El pretratamiento con ácido sulfúrico se ha estudiado de acuerdo con un diseño de experimentos tipo Box-Benhken en el que las variables estudiadas fueron la temperatura (110-130° C), concentración de ácido sulfúrico (1-3 % p/v) y tiempo de pretratamiento (10-40 min) con la misma carga de sólidos. En ambos casos, como criterio de optimización, se ha maximizado la recuperación de glucosa por hidrólisis enzimática y la recuperación de azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado, determinando como condiciones óptimas: 155°C, 2% H₃PO₄; y 130°C, 1% H₂SO₄, 26 min. En dichas condiciones se alcanzaron rendimiento



de hidrólisis del 84 y 82,7 % y recuperaciones de azúcares hemicelulósicos del 80 y 94 % para el pretratamiento con ácido fosfórico y sulfúrico, respectivamente.

Por otro lado, se han evaluado diferentes configuraciones del proceso de hidrólisis y fermentación, incluyendo hidrólisis y fermentación secuencial y simultánea de algunos de los sólidos pretratados en las condiciones óptimas. Así, a partir de bagazo pretratado con ácido fosfórico, en un proceso de hidrólisis y fermentación secuencial (HSF) al 15 % de concentración de sustrato, se ha obtenido una disolución etanólica con una concentración de 22,6 g/L y un rendimiento del 38 %. Sin embargo, se han obtenido rendimientos (37,6 %) y concentraciones de etanol bastante similares (18,5 %) con menores tiempos de proceso (30 h frente a 96 h) mediante una sacarificación y fermentación simultánea (SFS) usando xilanasas.

El pretratamiento del bagazo de cerveza con ácido fosfórico diluido ha permitido obtener una disolución de 16 g etanol/L en la fermentación del prehidrolizado con *Escherichia coli* SL100, lo que corresponde a un 78 % del rendimiento teórico. En la fermentación del licor del pretratamiento con ácido sulfúrico en condiciones óptimas, se ha alcanzado una concentración de 17 g etanol/L y un rendimiento del 76%. Asimismo, se ha fermentado este prehidrolizado de ácido sulfúrico con *S. stipitis* aunque con menor producción de etanol (11,4 g/L frente a 17 g/L) al mismo tiempo de fermentación (41 h).

Otra estrategia de aprovechamiento estudiada ha sido la hidrólisis enzimática del *slurry* de pretratamiento (mezcla de las fases sólida y líquida resultantes del pretratamiento, que no se han separado por filtración, en donde la fracción sólida es rica en celulosa y la líquida rica en azúcares hemicelulósicos y glucosa de almidón). Además, con el objetivo de obtener



disoluciones con alta concentración de azúcares, los hidrolizados se concentraron, por evaporación, en torno a 1,5 veces. A continuación, ambos hidrolizados se fermentaron con *E. coli* SL100 (sin detoxificar y detoxificados con carbón activo), alcanzando una concentración máxima de etanol de 38,6 g/L, que corresponde a un rendimiento del 81% a partir del hidrolizado del *slurry* de ácido fosfórico sin detoxificar. No obstante, el máximo rendimiento se alcanzó en la fermentación del hidrolizado de ácido sulfúrico también sin detoxificar, 86% con una concentración en etanol de 37,6 g/L. Para terminar, se llevó a cabo la fermentación de los hidrolizados, detoxificados con resina, con un co-cultivo de *S. cerevisiae* y *S. stipitis*. En este proceso se han alcanzado concentraciones de etanol en torno a 22,2 g/L con un rendimiento máximo del 61%.

Por tanto, se propone el empleo de la configuración de proceso que incluye la hidrólisis enzimática del *slurry* seguida de la fermentación con *E. coli* del hidrolizado resultante, puesto que los rendimientos alcanzados son muy similares y con ello se eliminaría la etapa de filtración además de realizar la fermentación de todos los azúcares en una sola etapa dando lugar a disoluciones más concentradas en etanol. No obstante, para elegir una configuración de proceso entre las ensayadas en esta Tesis Doctoral, sería necesario llevar a cabo una evaluación tecnoeconómica y ambiental que determine también cuál sería el pretratamiento ácido más adecuado para el bagazo de cerveza.



2. INTRODUCCIÓN



2.1 CONTEXTO ENERGÉTICO ACTUAL

La energía es un contribuyente fundamental al logro de los objetivos de desarrollo económico y social de todos los países. Aunque la mayor parte de la energía proviene de materias primas de origen fósil, su encarecimiento, la dependencia de las importaciones de combustibles fósiles, el crecimiento sostenido de la demanda y la disminución de reservas han hecho que se estén buscando nuevas materias primas de origen renovable (Michalena y Hills, 2012).

La Agencia Internacional de Energía (AIE) estimó que la dependencia mundial de los combustibles fósiles se reduciría del 82 % al 76 % en 2035 y que el 18 % de la energía total consumida sería procedente de los recursos de energía renovable (Wigley et al., 1996). Esto enfatiza la necesidad de aumentar la producción de energía renovable y, en consecuencia, se están realizando inversiones a nivel mundial para expandir la producción de energía renovable (Figura 1).

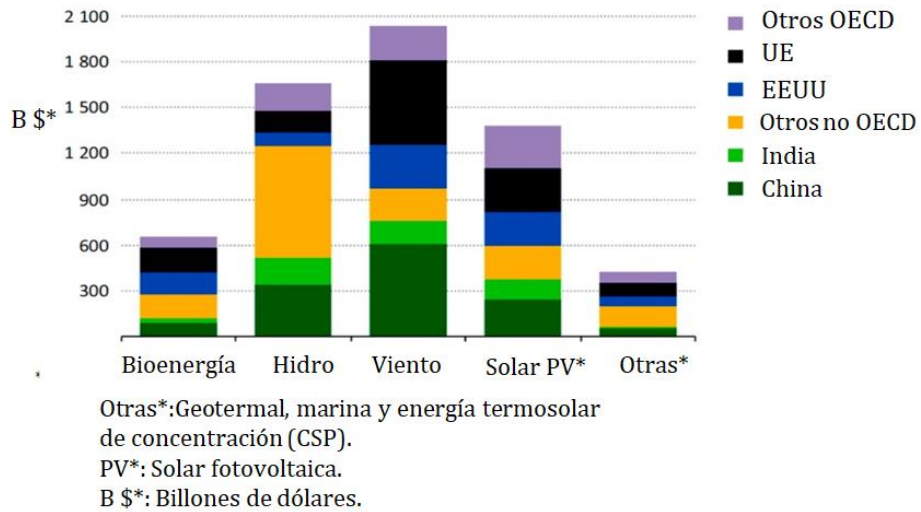


Figura 1: Inversión acumulada en generación de energía basada en energías renovables, 2013–2035 (Van der Hoeven, 2013).

Estas inversiones se traducen también en la generación de empleos, de modo que el sector de las energías renovables empleó cerca de 10,9 millones de personas en 2018. La energía solar fotovoltaica y la bioenergía son los sectores que más plazas de empleo han generado (Figura 2).

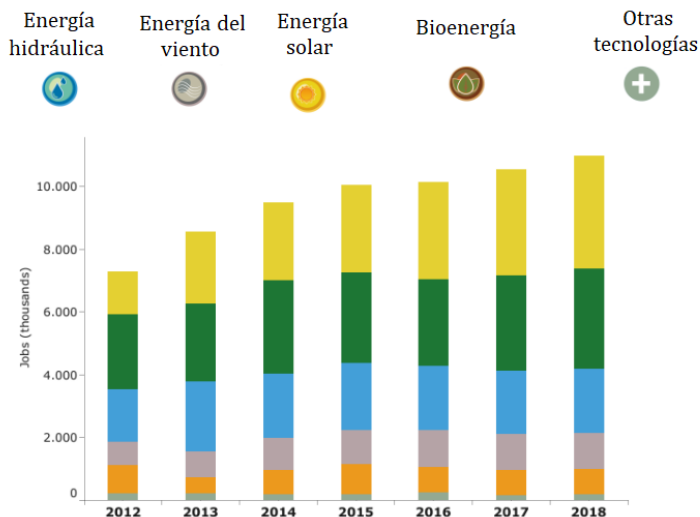


Figura 2: Cifras totales de empleo en el sector de las energías renovables por tecnología (IRENA, 2018).

La producción primaria de energía procedente de fuentes renovables en la EU-28 en 2016 ascendió a 211 millones de toneladas equivalentes de petróleo (tep). La cantidad de energía renovable producida dentro de la EU-28 se incrementó en total un 66,6 % entre 2006 y 2016, lo que equivale a un incremento medio del 5,3 % anual. Entre las energías renovables, las fuentes más importantes en la EU-28 fueron la madera y otros biocombustibles sólidos, así como los residuos renovables, que representaron el 49,4 % de la producción primaria de energías renovables en 2016 (Figura 3).

La energía hidroeléctrica constituyó la segunda fuente más importante (14,3 % del total), seguida de la energía eólica (12,4 %). En la actualidad, los niveles de producción de energía mareomotriz, undimotriz y oceánica son muy bajos, y estas tecnologías se concentran principalmente en Francia y el Reino Unido.

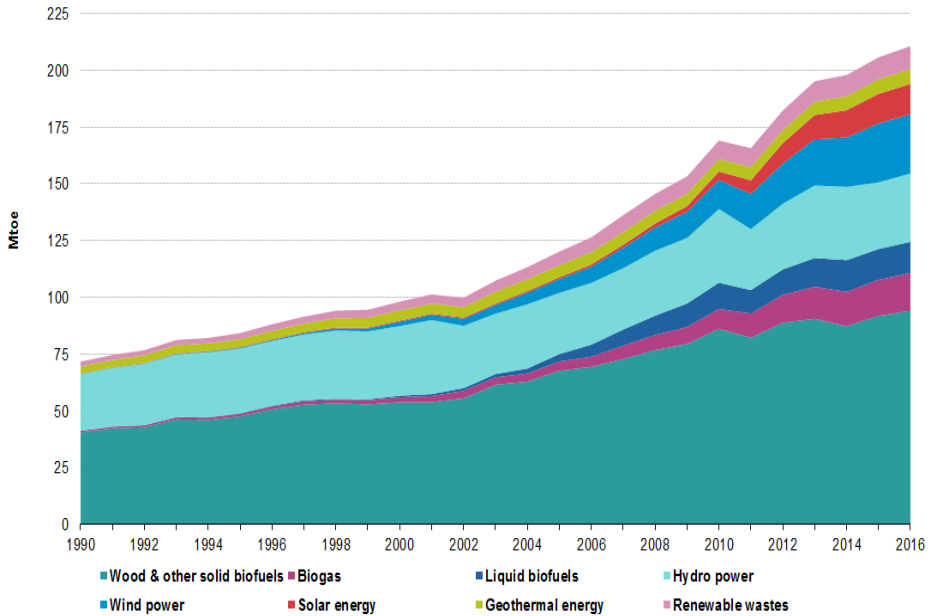


Figura 3: Producción primaria de energía procedente de fuentes renovables, EU-28, 1990-2016 (Mtep), (IRENA, 2018).

Alrededor de las tres cuartas partes del uso de energía renovable en el mundo involucra bioenergía, y más de la mitad del consumo de biomasa tradicional.

La bioenergía representó aproximadamente el 10 % del consumo total final de energía y el 1,4 % de la generación mundial de energía en 2015. Por eso, la bioenergía es importante para luchar contra el cambio climático y para lograr los objetivos de desarrollo sostenible de Naciones Unidas (IRENA, 2018).

El uso de energías renovables ayuda a mejorar la calidad ambiental de su territorio y contribuye al crecimiento económico de los países (EPA, 2016). Mientras que el crecimiento económico global fue del 45 %, las emisiones de GEIs. UE-28 disminuyeron un 17 % en el periodo 1990-2011.



La confirmación de que el uso desenfrenado de recursos naturales y energías fósiles planteaba una creciente amenaza de cambio climático, económico y social fue reconocido por primera vez en la Conferencia Mundial sobre el Clima, en 1979, donde los gobiernos fueron orientados a prever y prevenir posibles cambios artificiales en el clima. El primer acuerdo internacional con medidas energéticas y jurídicamente vinculantes fue el Protocolo de Kioto (adoptado el 11 de diciembre de 1997 en Kioto, Japón, pero no entró en vigor hasta el 16 de febrero de 2005). Ratificado por 191 países hasta 2013, es considerado como un “hito histórico” para conseguir la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). En dicho acuerdo, la UE se comprometía a disminuir sus emisiones de GEI en un 8 % en el periodo 2008-2012. Las estrategias para aminorar estos gases consistían básicamente en la incorporación de fuentes de energía renovable (Şener et al., 2018).

La UE está implantando políticas para contrarrestar el uso desenfrenado de recursos naturales y energías fósiles. En 2003, la directiva de biocombustibles (Directiva 2003/30/CE) estableció un objetivo energético del 5,7 % para biocarburantes en el transporte por carretera para 2010, alcanzándose finalmente un 4,7 % ese año (Directiva 2003/30/CE). A partir de 2011 entró en vigor la Directiva Europea sobre Energías Renovables (Directiva 2009/28/CE) adoptando los siguientes criterios:

- Reducción del 20 % de las emisiones de GEI para el año 2020 con respecto a 1990 (España 20 %).
- Mejorar en el 20 % en la eficiencia energética con relación a las previsiones para 2020.



- Establece una cuota del 20 % de energías renovables en el cómputo total de energías de la UE (España un 20 %).
- Establece un objetivo mínimo del 10 % de energías renovables en el sector transporte en cada Estado miembro de la UE. La reducción de las emisiones de GEI será de un 35 % como mínimo; a partir del 1 de enero de 2017 será de un 50 % como mínimo y a partir del 1 de enero de 2018, dicha reducción de las emisiones de GEI será del 60 % como mínimo para los biocarburantes y biolíquidos producidos en instalaciones cuya producción haya comenzado a partir del 1 de enero de 2017.

A finales de 2015, fue ratificado en París por casi 200 naciones, el “Acuerdo de París para el Cambio Climático”. No impone una legislación a cada uno de los países que después deba ser ratificada por sus parlamentos, sino que las naciones participantes simplemente anuncian qué porcentaje de emisiones se comprometen a reducir y en qué plazo, participando también en las negociaciones posteriores (el siguiente encuentro fue el 2 de diciembre del 2018 en la ciudad polaca de Katowice, y después será cada cinco años (Pereda, 2017)).

Otro de los objetivos del Acuerdo, es disminuir la emisión de GEI hasta 2030 en al menos el 40 % en comparación a 1990 (Liobikiene y Butkus, 2017).

Recientemente ha sido publicada la Directiva 2015/1513 del Parlamento Europeo, que se aplicará en la próxima década. La nueva directiva, persigue que el consumo final en energías renovables de la UE sea como mínimo del 27 % para 2030. Además, establece otros objetivos:

- Limitación para los biocarburantes de cultivos energéticos y cultivos alimentarios a un máximo del 7 %.



- Obligación de los Estados miembros de establecer objetivos nacionales indicativos de “biocarburantes avanzados” para 2020, que incluyen a los residuos y agrícolas, industriales y forestales, con un objetivo de referencia del 0,5 % que los Estados podrán rebajar por razones objetivas.
- Incremento del umbral de reducción mínimo de las emisiones de GEI, aplicable a los biocarburantes y biolíquidos producidos en instalaciones nuevas.

Por último, debe mencionarse que para lograr los objetivos de reducción de emisiones y uso de energías limpias, una posible vía sería utilizar residuos agroindustriales, para su conversión en biocombustibles, principal objetivo de la presente Tesis Doctoral.



2.2 LA BIOMASA

La biomasa es la fracción biodegradable de los productos, los desechos y los residuos procedentes de la agricultura, de la silvicultura y de las industrias conexas (incluidas las sustancias de origen animal), así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y municipales. Por sus características físico- químicas y caloríficas, la biomasa puede ser materia prima para la producción de energía (calor y electricidad), de biocombustibles y de productos químicos alternativos a los producidos a partir de recursos no renovables (petróleo, gas y carbón). Su producción anual se estima en 10^{10} MT (Millones de Toneladas) (Sánchez y Cardona, 2008).

Es una fuente renovable, amigable medioambientalmente y ampliamente disponible (Behera et al., 2014). Sin embargo, como desventajas, hay que añadir la disponibilidad del combustible, su estacionalidad y la variación de los precios, íntimamente ligados al comportamiento de las cosechas, en el caso de residuos agrícolas y de la industria agroalimentaria.



Según el IDEA (Instituto para Diversificación y Ahorro de la Energía), la biomasa puede ser definida como *“la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía, es decir, cualquier sustancia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo los materiales que resultan de su transformación natural o artificial”*. Ya la Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588 define la biomasa como *“todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización”*.

En relación a su potencial de aprovechamiento para fines energéticos se viene apoyando en el uso de la materia prima para la producción de biocombustibles, ya que pueden complementar o sustituir por completo a los combustibles fósiles derivados del petróleo (Özdenkçi et al., 2017).

La clasificación de biomasa que mejor puede definir su uso vendría establecida atendiendo a su composición. Puede ser clasificada en azucarada, amilácea, lignocelulósica y oleaginosa.

Las biomásas azucarada y amilácea son empleadas en la producción de bioetanol de primera generación. La biomasa lignocelulósica, compuesta por residuos agrícolas, forestales, agroindustriales o industriales, está siendo estudiada para la conversión al bioetanol denominado de segunda generación, a través de un proceso bastante más complejo que lo establecido para las materias primas azucaradas y amiláceas en función de su estructura fibrosa y difícil de hidrolizar (Raele et al., 2014).

Es posible extraer de las materias primas oleaginosas un aceite que se utiliza para la producción de biodiésel mediante transesterificación química (ácida o básica) de los ácidos grasos para la producción de los ésteres metílicos (Tran et al., 2017).



2.2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica constituye el mayor depósito de energía fotosintética y materia orgánica renovable. Los biopolímeros más abundantes en la naturaleza son la celulosa y lignina. Los componentes de los materiales lignocelulósicos se pueden clasificar en dos grupos:

- **Componentes estructurales:** celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa y hemicelulosa son polisacáridos de alto peso molecular que representan entre el 60-80 % del peso total de los materiales lignocelulósicos. En cambio, la lignina es un polímero no polisacárido tridimensional de unidades fenilpropano y representa entre el 20-35 % del total. El contenido en estos componentes principales varía en función de la materia prima (Figura 4):
- **Componentes no estructurales:** compuestos extractos y cenizas. Son fracciones minoritarias dentro del material lignocelulósico que no pertenecen a la pared celular, son solubles en agua o solventes orgánicos y de bajo peso molecular. En esta fracción se encuentran grasas, terpenos, alcaloides, proteínas, fenoles, pectinas, gomas, resinas, componentes antioxidantes, como la oleuropeína, flavonoides y compuestos fenólicos, con interés industrial bastante significativo. Por otro lado, las cenizas presentes en la biomasa contienen principalmente Ca, K, Mg y Si, compuestos inorgánicos que permanecen después de la incineración del material (Fengel y Wegener, 1983), siendo su proporción general menor del 1 % de peso seco de la madera.

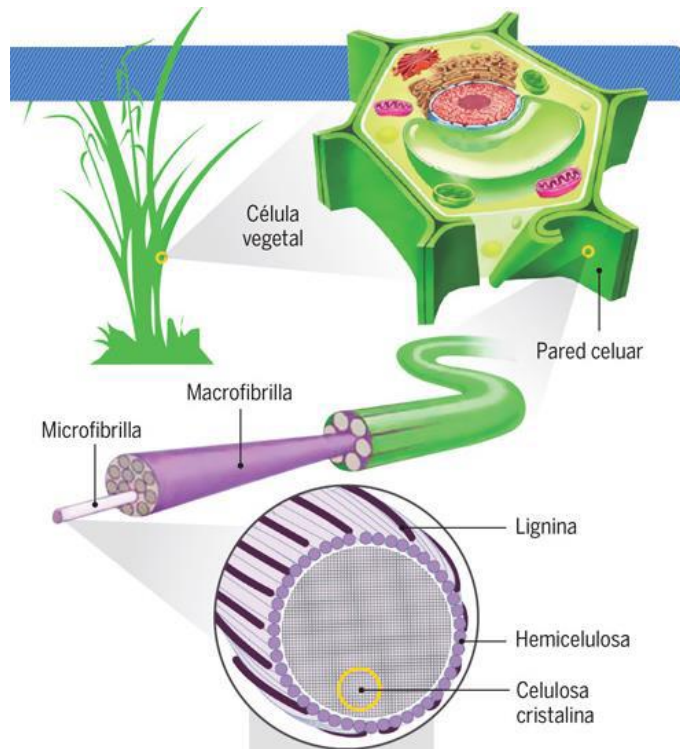


Figura 4: Estructura de la biomasa lignocelulósica (Alvarado, 2017).



Como se puede observar en la siguiente tabla, la proporción de los diferentes componentes principales de la biomasa lignocelulósica varía dependiendo del tipo de material.

Tabla 1: Composición de diferentes materiales lignocelulósicos (%peso seco) (Karagoz et al., 2019)

Biomasa	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Alfalfa	30,4-31,1	17,6-17,7	13,3-14,5
Paja de cebada	36,6-39,1	21,1-25,7	15,2-22,4
Rastrojo de maíz	37 -37,5	18,5-28,9	19,4-22,1
Hierba	31,8-38,5	31,1-42,6	3,1-5,6
Tallos de madera	40-55	24-40	18-25
Microalgas	50-73		No disponible
Fracción orgánica de RSU	57		No disponible
Paja de colza	37 -44,6	19,6-20	18-22
Paja de arroz	38,4-42,5	21,8-24,5	9,2-16,2
Paja de centeno	33,1-37	22,2-40	19,8-22
Algas marinas	30	2,2	No disponible
Tallos de madera blanda	45-50	25-35	25-35
Bagazo de caña de azúcar	43-50,4	19,9-25,2	17,0-22,8
Pasto varilla	28,2-35,1	20,2-26,9	15,4-21,1
Almidón de trigo	30,2-48,5	22,3-27,7	8,1-17,9



2.2.1.1 Celulosa

Se estima la producción anual de celulosa en $26,5 \times 10^{10}$ (donde “T” indica tonelada), por lo que es la macromolécula más abundante de la Tierra, (Brown, 2003). La celulosa fue descubierta en 1838 por el químico francés Anselme Payen, que la aisló a partir de materia vegetal y determinó su fórmula química (Payen, 1838). Es un biopolímero de función estructural constituido por unidades lineales de D-glucosa enlazadas por uniones del tipo β -1,4-glucosídico, siendo la celobiosa, disacárido 4-O-(β -D-glicopiranosil-D-glucopiranososa), la unidad que se repite (Figura 5) (Harris y DeBolt, 2010).

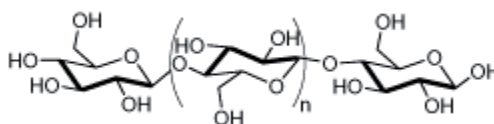


Figura 5: Estructura de la celulosa (Ferreira et al., 2009).

Los polímeros de celulosa individuales forman estructuras rígidas de microfibras, llamadas microfibrillas, de aproximadamente 150 Å de sección transversal y 300 Å de largas, que se estabilizan mediante enlaces de hidrógeno (los grupos OH del carbono 4 crean puentes de hidrogeno al interactuar entre sí o con otros átomos de nitrógeno, azufre o oxígeno), lo que contribuye significativamente a su resistencia (Cheng et al., 2011).

Hay dos tipos principales de celulosa: la cristalina o nativa, definida por su ordenamiento molecular que induce a una menor solubilidad en agua, en disolventes orgánicos (benceno, éter, cloroformo, etanol) y en disoluciones de ácidos y álcalis diluidas, por lo que será más difícil de degradar durante la hidrólisis, ya sea mediante el uso de enzimas o productos químicos (Zhang y Lynd, 2004); y la celulosa modificada, que abarca la celulosa amorfa,



carboximetilcelulosa y celooligosacáridos. Estas regiones amorfas parecen ser los lugares donde las enzimas hidrolíticas tienen mayor facilidad para atacar (Gomez et al., 2008).

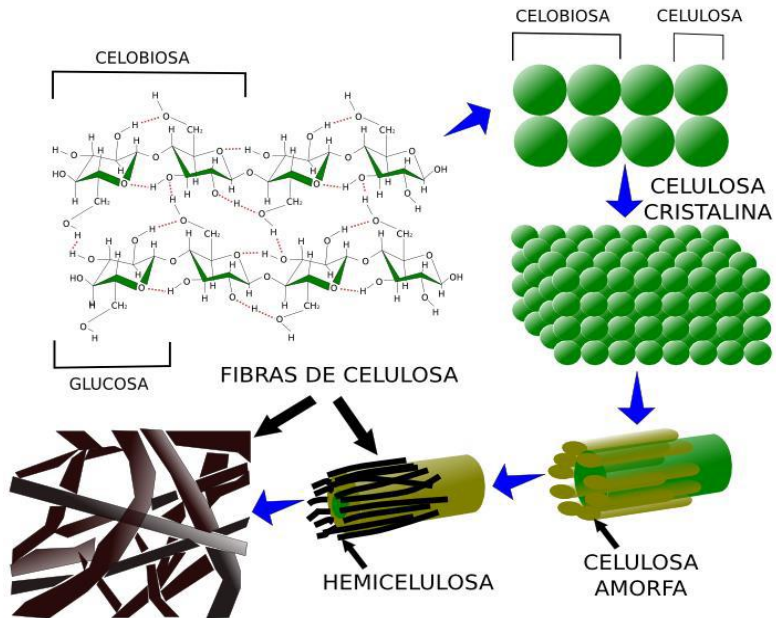


Figura 6: Constitución de la celulosa (Nueva Génesis., 2017).



2.2.1.2 Hemicelulosa

En 1891, Schulze introdujo el término “hemicelulosa”, que se refería al tejido vegetal que podía extraerse mediante álcali acuoso (Schulze, 1891). Como tal, la hemicelulosa es un biopolímero heterogéneo de cadena ramificada, se forma por rutas biosintéticas diferentes a la de la celulosa y está formado por pentosas (D-xilosa, D-arabinosa, D-xilulosa, L-arabinopiranos, L-arabinofuranosa...), hexosas (D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-fructosa, L-ramnosa, L-fucosa...) y ácidos orgánicos (principalmente ácido glucurónico, y galacturónico), los cuales se encuentran enlazados entre sí mediante enlaces glicosídicos, dando lugar a estructuras ramificadas y en general, amorfas (Phitsuwan et al., 2013). La gran mayoría, se encuentran rodeando a las fibras de celulosa y proporcionan la unión entre la celulosa y la lignina (Bhaskar et al., 2011).

Las hemicelulosas, cuya proporción dentro de la pared celular de las plantas puede variar entre 15 y 30 % en función del tipo de biomasa del que se trate, es químicamente heterogénea, presentan una menor longitud que la celulosa, baja cristalinidad con predominio de regiones amorfas y también un menor grado de polimerización, entre 100 y 200 (Peng et al., 2012).

Se clasifican según el tipo de azúcar dominante en la cadena principal: xilanos, glucanos y mananos, siendo los xilanos los más abundantes. Las maderas duras (angiospermas leñosas) y los residuos agrícolas tienen mayor cantidad de xilosa y grupos acetilo, presentándose en este caso los xilanos ramificados con pequeñas cantidades de ácidos glucurónico, mientras que las maderas blandas (gimnoespermas) presentan más alta proporción de manosa y galactosa, encontrándose los xilanos parcialmente acetilados y generalmente ramificados con arabinosa y ácidos urónicos (Gírio et al., 2010).



2.2.1.3 Lignina

La lignina es un biopolímero tridimensional amorfo sintetizado a partir de la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano, unidos a través de distintos tipos de enlaces que se alternan sin un orden definido, formando una matriz compleja (Santos et al., 2017).

Es el polímero aromático no polisacárido más abundante de la naturaleza, es insoluble, amorfo y de alto peso molecular (Buranov y Mazza, 2008)

Los monómeros básicos que forman la lignina son los denominados alcoholes cinamílicos: el alcohol p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Figura 7). Gracias a la acción de lacasas y peroxidases producen radicales libres que al azar van reaccionando para formar diversos tipos de uniones, principalmente C-O o C-C, siendo predominante el enlace β -O-4.

Estos tres precursores no presentan una proporción fija, variando conforme la localización de la lignina dentro de la pared celular, la especie de la planta y el tipo de tejido. Cada uno de ellos va a generar las subunidades de la lignina: el p-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo, respectivamente. Así, el alcohol p-cumarílico que da lugar a las unidades p-hidroxifenilo (unidades H) no presenta ningún sustituyente; el alcohol coniferílico que da lugar a las unidades guayacilo (unidades G) presenta un grupo metoxilo en la posición 3 del anillo aromático; y el alcohol sinapílico que da lugar a las unidades siringilo (unidades S) presenta dos grupos metoxilo en las posiciones 3 y 5 de dicho anillo (Fengel y Wegener, 1983; Ragauskas et al., 2014).



Otros compuestos como el coniferaldehído y los monolignoles acilados también participan de las reacciones de acoplamiento que forman la lignina (Waldron et al., 2015).

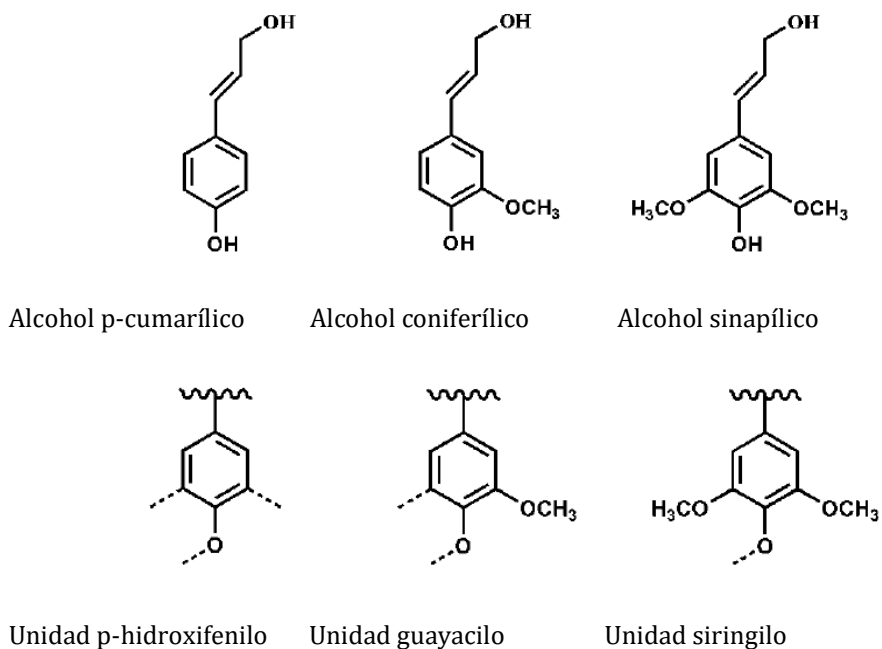


Figura 7: Alcoholes cinamílicos y precursores de la lignina (Yuan et al., 2013).



La estructura irregular y heterogénea de la lignina, sin unidades repetitivas, es la responsable de esa gran dureza y rigidez de su pared celular, posibilitando la unión entre las fibras de polisacáridos (Phitsuwan et al., 2013).

En respuesta al ataque de hongos patógenos, se pueden producir fenómenos como la lignificación, que supone un aumento en el contenido de lignina (Howard et al., 2003).

En general, en las angiospermas (maderas duras) la lignina contiene principalmente unidades siringilo, mientras que en las gimnoespermas (maderas blandas) abundan las unidades tipo guayacilo.

Las maderas duras son más fáciles de deslignificar que las maderas blandas (Oliva et al., 2003). En cambio, las ligninas de biomasa herbácea (angiospermas monocotiledóneas) contienen los tres tipos de unidades de fenilpropano, es decir, las unidades H, G y S, provocando un aumento en la heterogeneidad y complejidad de las ligninas herbáceas en comparación con las ligninas de maderas duras y blandas.

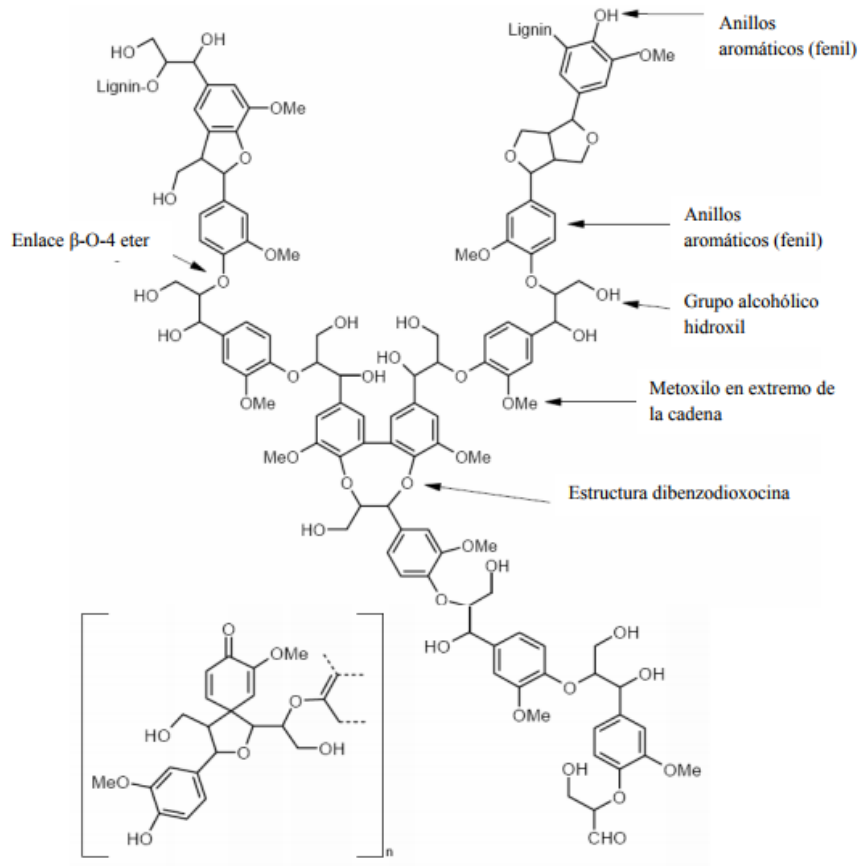


Figura 8: Estructura química de la lignina (Bommarius et al., 2004).



2.3 EL BAGAZO DE CERVEZA

La cerveza es un producto natural elaborado a partir de agua, cereales, lúpulo y levadura. El cereal más utilizado, para la elaboración de cerveza es la cebada. Su cultivo se conoce desde tiempos remotos y se supone que procede de dos centros de origen situados en el Sudeste de Asia y África Septentrional.

Se cree que fue una de las primeras plantas empleadas en la agricultura. En excavaciones arqueológicas realizadas en el Valle del Nilo se descubrieron restos de cebada en torno a los 15000 años de antigüedad, además los descubrimientos indican el uso del grano de cebada molido. La cebada ocupa el cuarto lugar en importancia entre los cereales, después del trigo, maíz y arroz. La razón se debe a su amplia adaptación ecológica y a su diversidad de aplicaciones.

En algunas ocasiones se utilizan otros cereales como maíz, arroz, trigo, centeno, avena, sorgo, mijo, etc. Su utilización amplia el espectro de estilos de cervezas disponibles y en algunos casos se reemplazan debido a razones económicas. Parte de la malta de cebada (del 15 % al 20 %) es sustituida por



cereales como los descritos anteriormente. Usualmente son conocidos como complementos o adjuntos (Kunze, 1996).

En 2014, 42,8 y 180,3 millones de toneladas de cerveza de cebada se produjeron en la UE y en el mundo, respectivamente. (FAOSTAT, 2014). El primer productor de cerveza industrial del mundo es China, con una producción anual de 489 millones de hectolitros, seguida de Estados Unidos con 225 millones de hectolitros y Brasil con 133 millones de hectolitros. Europa es la segunda región que más cerveza produce en el mundo, con una cifra alrededor de 400 millones de hectolitros al año. Alemania es el país con mayor producción con 95 millones de hectolitros al año y España ocupa el cuarto puesto en producción cervecera dentro de la UE con 33 millones de hectolitros al año.

Europa cuenta, con más de 6500 fábricas de cervezas activas, repartidas por los 31 países objeto de estudio. Los países que cuentan con mayor número de fábricas de cerveza son: Reino Unido que dispone de una cuarta parte de las fábricas de cerveza con 1700, le sigue Alemania con 1352 y Francia con 663. España se encuentra por detrás de estos países con 332 (Brewers of Europe, 2016).

El proceso de elaboración de la cerveza comienza con el malteado, que es la germinación controlada del grano de cebada para que libere el almidón; y su posterior tostado. Así se prepara para convertirse en azúcares mediante cocción, y estar disponible para las levaduras en la fermentación.

Al llegar a la maltería, los granos de cebada se limpian, se clasifican en función del tamaño, y se dejan en remojo en depósitos de agua fría durante 24 h. Así se inicia la germinación, interrumpiéndola con descansos al aire para que los granos respiren y no fermenten.



A continuación se transportan a la sala de germinación: allí una corriente de aire frío y húmedo mantiene la humedad y la temperatura de germinación. Cuando el tallo que brota tiene 5/4 de la longitud del grano, ya es malta verde: el almidón liberado está listo para convertirse en azúcar. Esta malta verde se seca y se tuesta.

En la sala de cocción se introducen en los molinos, donde se trituran y humedecen. Los cereales triturados se transportan a la caldera de malta, donde se mezclan con agua, formando una masa que se calienta para macerarla. La temperatura se incrementa lentamente (de 37° C a 78 ° C) para promover la hidrólisis enzimática de los componentes de la malta. Durante la cocción, el almidón de los cereales se transforma en azúcares fermentables (principalmente maltosa y maltotriosa) y azúcares no fermentables (dextrinas). Las proteínas se degradan parcialmente a polipéptidos y aminoácidos.

De la caldera de malta, la masa se transporta a una cuba filtro, que separa el bagazo de cerveza del mosto. Una vez filtrado, el mosto va a la caldera de merma, donde se calienta hasta ebullición (entre 70 y 90 min). Pero antes, entre 82 °C y 86° C se añade el lúpulo.

De la caldera de merma se bombea el mosto a gran velocidad entrando tangencialmente a las paredes del tanque remolino o Whirlpool, donde las fuerzas centrípetas consiguen un mosto claro y limpio, listo para su fermentación. Toda esta fase dura aproximadamente unas 10 h. El mosto limpio se enfría hasta la temperatura de fermentación antes de mezclarlo con la levadura.

El mosto frío (10° C) y aireado llega a los tanques de fermentación, donde se mezcla con las levaduras iniciándose la fase aerobia de la



fermentación que dura entre 4 y 8 h, consiguiéndose el máximo crecimiento de las levaduras. Una vez consumido el oxígeno, el metabolismo de la levadura cambia al encontrarse en un medio anaerobio (ausencia de oxígeno) y comienza la fermentación, transformando el mosto amargo en cerveza verde, con alcohol, anhídrido carbónico y sustancias aromáticas características de cada tipo de levadura empleada.

La fermentación en las cervezas normales (de 5º aproximadamente) dura de 4 a 9 días, según el tipo de cerveza. La cerveza verde recién fermentada se trasiega a nuevos tanques o barricas, donde comienza la maduración de la cerveza o guarda, a temperaturas muy bajas (entre 0º C y 4º C). Las últimas proteínas y levaduras se precipitan con lentitud, y se disuelve el CO₂ producido por la fermentación. Dura entre una semana y un mes, según el tipo de cerveza. Terminada la maduración, la cerveza se filtra para adquirir su transparencia y brillantez características.

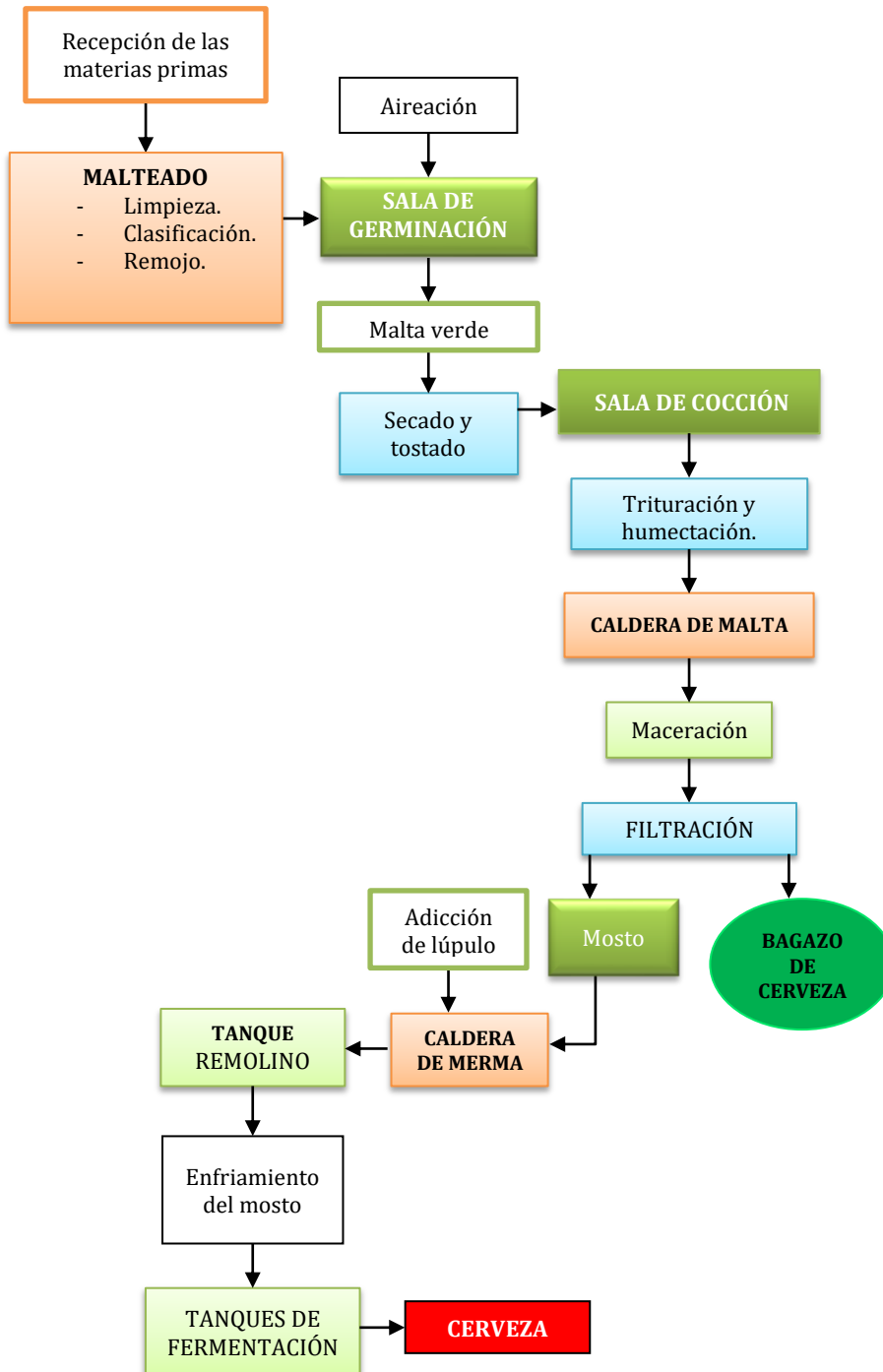


Figura 9: Proceso de elaboración de la cerveza (Elaboración propia).



El bagazo de cerveza es un subproducto de la industria cervecera resultante del proceso de prensado y filtración del mosto obtenido tras la sacarificación del grano de cebada. Es un subproducto rico en azúcares, proteínas y minerales. Una mezcla formada básicamente por cáscaras del grano de cebada, capas de tegumento y pericarpio, obtenidas tras la producción del mosto, constituyen este material (Mussatto et al., 2006).

La industria cervecera genera cantidades relativamente grandes de subproductos y desperdicios. El bagazo de cerveza representa el subproducto más importante (85 %), estando disponible a bajo costo durante todo el año (~\$14/T peso mojado) y se produce en grandes cantidades, 20 kg de bagazo de cerveza por cada 100 L de cerveza producida. (Reinold, 1997). La composición química de este material puede variar por diversos factores, entre los que destacan el tipo y calidad de cebada y otros cereales usados en el proceso, el tiempo de cocción así como las condiciones usadas en el malteado y la maceración. Glucosa, xilosa y arabinosa son los azúcares más abundantes en este material lignocelulósico (50 % w/w de su composición es celulosa y hemicelulosa) (Mussatto et al., 2007). Sus principales componentes son la celulosa (15-20 %), hemicelulosa (18-25 %) y lignina (12 %). También presenta un elevado contenido en proteínas (21-24 %).



Tabla 2: Diferentes composiciones (% en base seca) del bagazo de cerveza (Elaboración propia).

Composición (%)	(Beldman et al., 1987)	(Mussatto et al., 2004)	(Wilkinson et al., 2014)	(Rojas-Chamorro et al., 2017)
Celulosa	15,1	16,8	19,2	15,2
Almidón	2		26,6	5,2
Hemicelulosa	24,8	28,4	18,4	25,1
Lignina			27,8	12,5
Extractos				18,5
Proteína	23,8	24,6	15,3	21,2
Cenizas	3,5	1,2	2,7	2,3

Hasta ahora la aplicación principal del bagazo de cerveza ha sido la alimentación animal, debido a su alto contenido en proteína y fibra. Es un excelente ingrediente para los rumiantes, ya que combinándolo con fuentes baratas de nitrógeno, tales como urea, se pueden proporcionar todos los aminoácidos esenciales. Su elevado contenido en humedad (alrededor del 80 %) conlleva a que su transporte sea costoso y por lo tanto un factor limitante. Tampoco es posible el almacenamiento del material porque necesita una fuente de enfriamiento debido a que el crecimiento microbiano se produce fácilmente (Aliyu y Bala, 2011).

Sin embargo, existe una cantidad aceptable de estudios alternativos para su posterior aprovechamiento. Una opción de valorización evaluada sobre este subproducto propone su uso como fuente de arabinosilanos con actividad prebiótica. Cabe mencionar que un prebiótico es un ingrediente fermentado selectivamente que permite cambios específicos en la composición y/o



actividad de la microbiota gastrointestinal, mejorando así el bienestar del huésped (Figueroa et al., 2011). Son carbohidratos no digestibles debido a su resistencia al ácido gástrico, enzimas gastrointestinales y a la absorción gastrointestinal (Voragen, 1998). La fermentación de los arabinosilanos por las bacterias intestinales humanas indica que promueve el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Gullón et al., 2014). Los prebióticos parecen ejercer un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador mediante la modulación de la microbiota intestinal. La microbiota intestinal juega un papel fundamental en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II, cáncer colorrectal y obesidad.

Debido al creciente interés en la producción y el consumo de biocombustibles líquidos, algunos autores también han propuesto la utilización del bagazo para la producción de butanol y ABE (Acetona, etanol y butanol). En este estudio se fermentó con *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 el hidrolizado obtenido tras la hidrólisis enzimática del sólido, obteniéndose los siguientes rendimientos: 33 g de butanol /Kg bagazo de cerveza y 40,8 g ABE /kg bagazo de cerveza (Plaza et al., 2017). Además, han optimizado el pretratamiento hidrotérmico asistido por microondas y tras realizar la hidrólisis enzimática del sólido óptimo, la concentración de butanol y rendimiento obtenidos fueron de 8,3 g/L y 46 kg/T bagazo de cerveza, respectivamente (López-Linares et al., 2019).

Otra posible vía de aprovechamiento del bagazo es para la producción de xilitol. Es un excelente edulcorante y por lo tanto puede ser un sustituto de la sacarosa en ciertos alimentos, con objeto de conseguir la reducción calorífica de estos (Winkelhausena et al., 2007; Edelstein et al., 2008). El uso de xilitol en la industria farmacéutica se ha extendido debido principalmente a sus propiedades anticariogénicas. En este contexto, varios estudios han



demostrado su eficacia contra la formación de biopelículas orales (Ammons et al., 2011; Lee et al., 2012). Además es reconocido por ser capaz de combatir la calcificación dental, lo que en la mayoría de los casos es causada por el envejecimiento (Imazato et al., 2006). Su utilización resulta eficaz también en el tratamiento de diversas enfermedades, como por ejemplo, la diabetes (Islam, 2011), la anemia (Fau et al., 1971), la otitis media aguda (Danhauer et al., 2011) y la osteoporosis (Mattila et al., 2005). Aunque han sido llevadas a cabo investigaciones previas sobre producción de xilitol a partir de diferentes residuos lignocelulósicos, el bagazo tiene la enorme ventaja de que no requiere una etapa previa de detoxificación, si bien es cierto que la producción es más favorable cuando hay altas concentraciones iniciales de xilosa, una mayor densidad de inóculo así como un apropiado suplemento durante la fermentación. *Debaryomyces hansenii* (Carvalho et al., 2006) y *Candida guilliermondii* (Mussatto y Roberto, 2008) han sido los microorganismos empleados exitosamente para la producción de xilitol.

Roukas et al. (1999) plantean la utilización del bagazo para la obtención de pululano. En sus estudios fermentaron con *Aureobasidium pullulans* y obtuvieron una concentración de 6,0 g/L de pululano a partir de bagazo de cerveza suplementado con 0,5 % de K_2HPO_4 , 1 % de ácido L-glutámico, 2,5 % de aceite de oliva y 0,5 % de Tween 80. Cabe destacar que este polisacárido se utiliza en la industria alimentaria, siendo su principal uso la fabricación de películas comestibles utilizadas para refrescar el aliento y productos de higiene bucal. Como aditivo alimentario, es conocido por el número E1204.

Mussatto et al. (2008) en sus trabajos mencionaron la utilización del bagazo de cerveza para la producción de ácido láctico. Por ello, fermentaron un hidralizado rico en glucosa con *Lactobacillus delbrueckii*, obteniendo en



todos los casos estudiados un rendimiento de 0,73 g de ácido láctico por cada gramo de glucosa consumida.

Asimismo, el bagazo se ha utilizado como medio de crecimiento para diferentes microorganismos como: *Bifidobacterium adolescentis* 94BIM, *Lactobacillus* (Novik et al., 2007), *Streptomyces* (Szponar et al., 2003), *Pleurotus ostreatus* y *Penicillium brasilianum* (Panagiotou et al., 2006). También se ha utilizado para la producción de enzimas. Es un buen sustrato dónde los microorganismos amilolíticos podrían cultivarse para la producción de β -amilasa y amiloglucosidasa (Adeniran et al., 2008).

El ácido ferúlico y el ácido p-cumárico son los ácidos hidroxicinámicos más abundantes en el bagazo de cerveza. Bartolomè et al. (2002) emplearon el bagazo de cerveza para extraer el ácido ferúlico y obtuvieron un rendimiento de 0,3 % Por ello, usaron una esterasa de *Aspergillus niger* y observaron que el 3,3 % del ácido ferulico total fue liberado por la presencia de ésta. Hay un gran interés en la utilización de ácidos hidroxicinámicos como materia prima para su posterior bioconversión a otros productos de valor añadido como polímeros, derivados del ácido vanílico, guaiacol, catecol y vainillina.

Dada la cantidad relativamente alta de proteína presente en el bagazo (22 %) resulta interesante su extracción. (Vieira et al., 2014) realizaron una extracción selectiva y secuencial de las proteínas presentes en el bagazo de cerveza por acidificación del medio con una solución de ácido cítrico.

Por otro lado, De Song et al. (2010) optimizaron la extracción de proteína usando un diseño compuesto central rotatable atendiendo a tres parámetros: tiempo de extracción, potencia del ultrasonido y relación sólido-líquido. Las condiciones óptimas para dicha extracción fueron las siguientes: tiempo de extracción 81,4 min, potencia de ultrasonido 88,2 W/100 ml de



extractante, relación sólido- líquido de 2,0 g/100 ml. Más recientemente, Qin et al. (2018) han utilizado diferentes estrategias de pretratamiento con el objetivo de extraer la proteína. El pretratamiento alcalino seguido del pretratamiento con ácido diluido resultó ser el más eficiente, siendo capaz de extraer hasta el 95 % de la proteína. Sin embargo, esta combinación de pretratamientos no resultó ser muy selectiva, porque una importante cantidad de carbohidratos y lignina fueron solubilizados junto con la proteína. No obstante, el pretratamiento hidrotérmico a 60° C parece ser una opción interesante, ya que aunque el porcentaje extraído de proteína es menor (64 %), la selectividad es mayor, además estos pretratamientos no requieren altas temperaturas ni la adicción de productos químicos.

Otro compuesto de interés presente en este residuo es la lignina. Mussatto et al. (2007) lograron obtener lignina a partir de la acidificación del licor negro, previo tratamiento ácido y alcalino del bagazo de cerveza.

El bagazo de cerveza ha sido utilizado como materia prima en la producción biotecnológica de algunos biocombustibles como el biogás ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$). Una de las primeras opciones de valorización del bagazo de cerveza para la producción de biogás fue llevada a cabo por Ezeonu y Okaka (1996), estos investigadores evaluaron la cinética del proceso y pretrataron el bagazo de cerveza para la obtención de biogás con un rendimiento total de 3476 cm^3 /100 g de bagazo, tras 15 días de fermentación. Más tarde, Čater et al. (2015) estudiaron la fermentación anaeróbica del bagazo de cerveza para la producción de biogás, el cual fue fermentado por *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T obteniéndose un 17,8 % de metano. Recientemente, otros autores han utilizado el bagazo de cerveza para obtener un gas combustible por medio de la gasificación alotérmica de vapor. El gas producido estaba compuesto principalmente por 22,8–30,2 % H_2 , 15,1–22,3 % CO y 7,2–11,1 %



CH₄, contribuyendo a un valor de calentamiento de 8,11–9,0 MJ/Nm³. La principal conclusión de este trabajo es que el gas producido obtenido de la gasificación por vapor de bagazo de cerveza tiene la calidad suficiente para abrir otras opciones a los productores de cerveza para que usen sus propios desechos y así satisfacer sus necesidades energéticas (Sérgio et al., 2019).

Debido a su alto contenido en carbohidratos, el bagazo de cerveza también puede ser utilizado para la producción de biohidrógeno. En este estudio se investigó la utilización del pretratamiento con lodo rojo calcinado para mejorar los rendimientos fermentativos de hidrogeno que aumentaron en un 67 %, en comparación con las pruebas de control sin lodo rojo calcinado (Zhang y Zang, 2016).

Por otro lado, dado el alto valor nutritivo que presenta esta biomasa ha sido evaluado para la fabricación de una harina con alta proteína para su posterior incorporación a productos de panadería, incluidos panes, magdalenas, galletas (Huige, 1994). Sin embargo, sólo puede incorporarse en cantidades pequeñas (5-10 %) debido a las alteraciones en el sabor y propiedades (por ejemplo, textura) que produce en los productos finales (Hassona, 1993).

Más recientemente, Jayant et al. (2018) han investigado la posibilidad de sustituir la harina de soja, utilizada en acuicultura por bagazo de cerveza. Estos autores sugieren que es posible la sustitución del 50 % de harina de soja por bagazo de cerveza sin ningún efecto adverso sobre el crecimiento de los peces.

Otra posible vía de aprovechamiento del bagazo es para la producción de carbón. Okamoto et al. (2002) describieron el proceso y evaluaron sus propiedades físicas y químicas. El carbón producido tenía un poder calorífico



similar (27 MJ/Kg) al producido con otras materias primas (caña de azúcar, sarmiento). Otros autores también se han centrado en la producción de hidrocarbón, es decir, cuando el carbón se produce por carbonización hidrotermal (un proceso donde la biomasa se calienta a una temperatura de 200 a 300 ° C en presencia de agua), y se compone de dos fases: líquido y sólido (Arauzo et al., 2018).

Debido al bajo contenido en ceniza del bagazo y su alto contenido en celulosa y lignina, lo hacen adecuado para su uso como componente de los ladrillos. Se podría utilizar para sustituir al aserrín, que normalmente se utiliza en la fabricación de ladrillos para aumentar la porosidad (Russ et al., 2005).

Más recientemente, Klímek et al. (2017) han utilizado el bagazo de cerveza como aditivo para la fabricación de tableros de conglomerado de madera (solamente el tablero en el que se emplea el 10 % de bagazo cumple con los requisitos).

Por otra parte, Ishiwaki et al. (2000) han estudiado exitosamente la utilización de este residuo como un material lignocelulósico para la fabricación de pasta de papel, obteniéndose una pulpa con una gran resistencia y de gran calidad para la fabricación de tarjetas de visita, posavasos y toallas de papel.

El bagazo de cerveza ha sido también utilizado como un eficiente adsorbente para la eliminación de los iones Pb (II) y Cd (II) presentes en soluciones acuosas, con una capacidad máxima de adsorción de 17,3 y 35,5 mg/g respectivamente (Lu y Gibb, 2008). Recientemente, Chen et al. (2016) han conseguido eliminar As (III) de disoluciones acuosas. Como particularidad, el bagazo de cerveza es capaz de eliminar el ácido naranja 7



(AO7), un colorante empleado en la industria textil y papelera, causante de graves problemas ambientales (Silva et al., 2004). Además, también ha sido utilizado para eliminar compuestos orgánicos volátiles tras ser pirolizado (Chiang et al., 1992).

Por otro lado, dada la naturaleza lignocelulósica que presenta este residuo lignocelulósico con una cantidad relativamente alta de azúcares celulósicos y hemicelulósicos disponibles (en torno al 45 %), parece prometedor el estudio de su aprovechamiento bioquímico para la obtención de bioetanol de segunda generación, línea en la que se enmarca la presente Tesis Doctoral.

En este contexto, el bagazo de cerveza se ha usado para la producción de etanol utilizando el hongo *Neurospora crassa* y *Fusarium oxysporum* con un rendimiento del 74 y 109 g etanol/kg de bagazo seco, respectivamente (Xiros et al., 2010).

Más recientemente, Wilkinson et al. (2014) utilizaron un prehidrolizado obtenido tras someter al bagazo de cerveza a un pretratamiento con ácido clorhídrico al 1 %, para su posterior fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* NCYC479. El rendimiento teórico fue del 69 %, con una concentración de etanol de 5,4 g/L. También trabajaron con el hidrolizado obtenido tras la hidrólisis enzimática del sólido previo pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno y obtuvieron un rendimiento teórico del 81 % (17,3 g/L de etanol) y del 43 % (8,4 g/L de etanol), respectivamente. Igualmente, cabe destacar que también estudiaron el bioproceso consolidado (BCP) con *A. oryzae* y *S. cerevisiae* NCYC479 y obtuvieron una concentración final de 37 g/L. A pesar de todas las ventajas que implicaría la realización de este tipo de proceso en la actualidad todavía



no existen microorganismos lo suficientemente consolidados que puedan producir, simultáneamente, celulasas y otras enzimas en los niveles requeridos, además de producir etanol con altos rendimientos.

Recientemente, se ha estudiado la hidrólisis del *slurry* del bagazo de cerveza para la producción de etanol. Sin embargo, solamente han fermentado la fracción celulósica de los azúcares con dos cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, dejando los azúcares hemicelulósicos sin fermentar (Pinheiro et al., 2019)



2.4 BIOETANOL

El etanol, es un compuesto orgánico perteneciente a la clase de los alcoholes. En condiciones normales se presenta como un líquido incoloro, fácilmente inflamable, de llama azulada y muy hidróscopico. Los alcoholes pueden obtenerse mediante tres métodos: hidratación de alquenos en medio ácido; a través del proceso oxo, conversión de alquenos en aldehídos por hidroformilación con una mezcla equimolecular de CO y H₂, siendo posteriormente convertido a alcohol; y a través de la fermentación de carbohidratos.

El bioetanol puede ser obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en distintas biomásas, para su uso en motores con ciclo de combustión de ignición por chispa (motor Otto), a partir de dos maneras: en mezclas con la gasolina utilizándose el etanol anhidro (99,6 °GL, donde “°GL” indica grado Gay Lussac o como combustible puro, empleándose el etanol hidratado (96 °GL). También puede ser utilizado en vehículos



especiales, llamados vehículos “*Flex-fuel*”, capaces de utilizar mezclas gasolina-etanol anhidro (con 20 a 25 % de etanol), etanol hidratado o mezclas entre etanol hidratado y gasolina-etanol anhidro en cualquier proporción sin ningún problema en los motores, ya que estos vehículos disponen de un sensor que detecta la relación etanol/gasolina y en función de la mezcla ajustan la carburación del motor. Las porcentajes de etanol a la gasolina son representadas por la sigla “E”, así, E27 indica 27 % de etanol anhidro a la gasolina, E0 no hay ninguna adición mientras E100 indica 100 % de etanol. Además se puede utilizar para fabricar ETBE (5-Etilter-butil-éter) un aditivo que se añade a la gasolina. En España todo el bioetanol es convertido en ETBE para mezclarse con la gasolina, por su menor poder corrosivo, mayor poder calorífico y menor emisión de CO y partículas (Rodríguez-Antón et al., 2015; Yee et al., 2013).

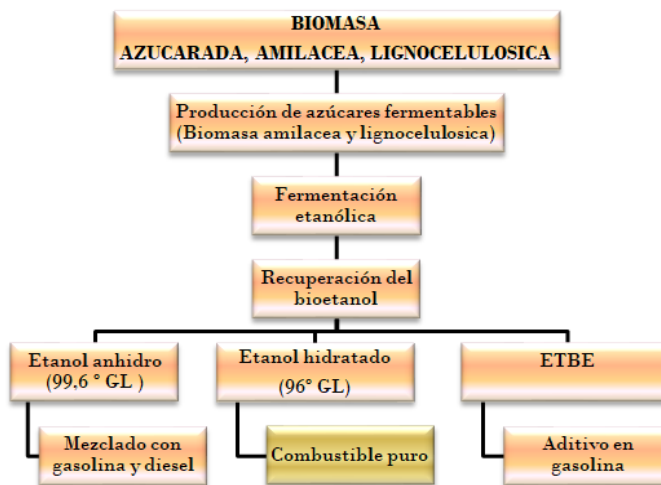


Figura 10: Aplicaciones del bioetanol como biocarburante (Elaboración propia).



Este biocombustible presenta un mayor índice de octano que el de la gasolina (108), una temperatura de ignición más alta (420 °C) y mayores calores latentes de vaporación (842-930 kJ/kg) (Zabed et al., 2017). Sin embargo, un litro de etanol aporta un 66 % de la energía que proporciona la misma cantidad de gasolina (Nigam y Singh, 2011). Tiene una combustión con menor emisión de compuestos tóxicos a la atmósfera, 80 % menos CO₂ que los combustibles fósiles (Aditiya et al., 2016; Manochio et al., 2017).

La producción mundial de bioetanol mostró un rápido crecimiento, de 17,25 billones de litros en el año 2000 a más de 46 billones de litros en 2007 (Balat, 2009). Se espera que supere los 160 billones de litros para 2020 (Bibi et al., 2017).

EEUU es el mayor productor de bioetanol, con una producción de 99 billones de litros en 2016, (contribuye en un 59 %) y Brasil con un 27 % (se impulsó en 1975 con Proalcool). Además, China es el principal representante asiático, con una producción estimada de 3,2 billones de litros en 2016. En Tailandia la producción llegó a 1,2 billones de litros, mientras en Canadá ha llegado a 1,7 billones de litros en 2016. En Europa, la producción ha caído cerca de un 6 %, aunque se considera que la única vía para descarbonizar el sector del transporte es la industria de los biocombustibles avanzados.

Según un informe de la CE, elaborado por un grupo de expertos en el sector, las necesidades energéticas del transporte en la UE en 2030 pueden ser sufragadas entre un 3 y un 4,5 % por el bioetanol (CE, 2017). España es el quinto país productor de bioetanol de la UE, la mayor parte de las plantas productoras utilizan cereales como materia prima, principalmente trigo y cebada.



Las fuentes renovables utilizadas para la producción de bioetanol pueden clasificarse en materias primas ricas en azúcares (principalmente caña de azúcar, sorgo dulce y remolacha azucarera), en almidón (maíz, trigo, cebada, leguminosas y frutas verdes e inmaduras), biomasa lignocelulósica (pastos perennes, plantas acuáticas, maderas blandas y duras, residuos agrícolas y la porción orgánica de los desechos sólidos de los municipios) y algas (se limita a la investigación de laboratorio, no a escala comercial).

El bioetanol obtenido a partir de biomasa azucarada o amilácea se denomina bioetanol de primera generación, mientras que el obtenido a partir de biomasa lignocelulósica y las algas recibe el nombre de bioetanol de segunda y tercera generación, respectivamente.

En la Tabla 3, se muestran las principales diferencias entre el bioetanol de primera, segunda y tercera generación.



Tabla 3: Comparación de bioetanol de primera, segunda y tercera generación (Jambo et al., 2016).

<i>Comparación</i>	<i>Primera generación</i>	<i>Segunda generación</i>	<i>Tercera generación</i>
<i>Fuentes de materia prima</i>	Cultivos comestibles	Cultivos no comestibles (lignocelulósicos, residuos forestales)	Biomasa de algas
<i>Uso de la tierra para el cultivo</i>	Crece en tierra cultivable	Crece en tierras cultivables y marginales	Agua de mar, agua dulce, aguas residuales
<i>Tecnologías de conversión</i>	Extracción de azúcar, fermentación, destilación	Pretratamiento, hidrólisis, fermentación, destilación	Hidrólisis, fermentación, destilación
<i>Rendimiento de bioetanol</i>	Bajo	Medio	Alto
<i>Impacto al medio ambiente</i>	Baja contribución a la mitigación del CO ₂	Gran contribución a la mitigación del CO ₂	Gran contribución a la mitigación del CO ₂
<i>Principales ventajas</i>	Proceso de conversión relativamente simple	No hay competencia con los recursos alimenticios	Alta tasa de crecimiento
<i>Principales desventajas</i>	Debate "Comida versus combustible"	Estructuras recalcitrantes de la materia prima	Inversiones limitadas y dificultades en el diseño del proceso



A nivel comercial solamente está totalmente implantado el proceso de obtención de bioetanol de primera generación. GranBio, una compañía biotecnológica brasileña, construyó la primera fábrica de etanol celulósico a escala comercial. Comenzó su producción en septiembre de 2014 y tiene una capacidad de producir 82 millones de litros de etanol por año de materia prima celulósica. La mayoría de las plantas de etanol celulósico en Europa todavía se encuentra en etapas piloto o de demostración. La Tabla 4 muestra las principales plantas de etanol celulósico en Europa.

Tabla 4: Plantas de etanol celulósico en Europa (Karagoz et al.,2019)

<i>Nombre de la Planta</i>	<i>Localidad</i>	<i>Materia prima</i>	<i>Producción bioetanol (Tonelada/año)</i>	<i>Tipo de planta</i>	<i>Año de puesta en marcha</i>
Beta Renewables	Crescentino (Italia)	Paja de trigo	60000	Comercial	2013
BioAgra	Goswinnowice (Polonia)	Paja de trigo y rastrojo de maíz	50000	Demo	2014
Inbicon	Kalundborg (Dinamarca)	Paja de trigo	4300	Demo	2009
PROCETHOL 2G	Pomacle (Francia)	Subproductos leñosos y agrícolas, residuos	2700	Piloto	2011
SEKAB/EPAB	Ornskoldsvik (Suecia)	Astillas de madera y residuos agrícolas	160	Piloto	2004
Weyly AS	Bergen (Noruega)	Abeto y pino	158	Demo	2010



A partir del etanol pueden obtenerse otros productos de interés, principalmente puede ser convertido a eteno, y éste a su vez puede ser transformado a polietileno (Kajaste, 2014). Para mejorar la viabilidad de los procesos de obtención de bioetanol avanzado se hace indispensable la diversificación de los productos que pueden obtenerse a partir de la biomasa (Oh et al., 2018). Según la RFA (Asociación de Biorefinerías Americana), varias biorefinerías en Iowa, Kentucky, California y Kansas utilizaron desechos de la industria cervecera para producir etanol (RFA, 2017).



2.5 PROCESOS DE OBTENCIÓN DE BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO

Una de las propiedades características de la biomasa lignocelulósica es su estructura rígida, que es recalcitrante a la descomposición. La celulosa y la hemicelulosa se unen firmemente a la lignina formando redes lignocelulósicas complejas. Por ello, en el proceso de producción de bioetanol a partir de la biomasa lignocelulósica se encuentran varias etapas o procesos: pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación de los azúcares y la separación de los productos y la lignina. A partir de cada una de las fracciones obtenidas se pueden obtener gran variedad de productos con alto valor añadido mediante procesos químicos, enzimáticos o fermentativos.

Para llevar a cabo un eficaz proceso de obtención de bioetanol orientado a la fermentación de azúcares se deben cumplir una serie de criterios generales (Hahn-Hagerdal et al., 2006):



- Efectiva despolimerización de celulosa y hemicelulosa hasta azúcares solubles.
- Eficiente fermentación de los hidrolizados, que contienen una mezcla de hexosas, pentosas y compuestos inhibidores de la fermentación.
- Una adecuada integración de las etapas del proceso, que permita minimizar la demanda energética.
- Aprovechamiento de la lignina.

2.5.1 Pretratamiento

En la ruta de la producción del bioetanol se hace necesaria una etapa de pretratamiento, capaz de descomponer la estructura rígida de la biomasa (Figura 11) y preparar las condiciones para que el coctel enzimático pueda actuar sobre el material. Provoca principalmente la eliminación de la lignina y la hemicelulosa de la matriz lignocelulósica, un aumento en la porosidad de la biomasa y de la superficie, así como la disminución de la cristalinidad de la celulosa (Wyman et al., 2005).

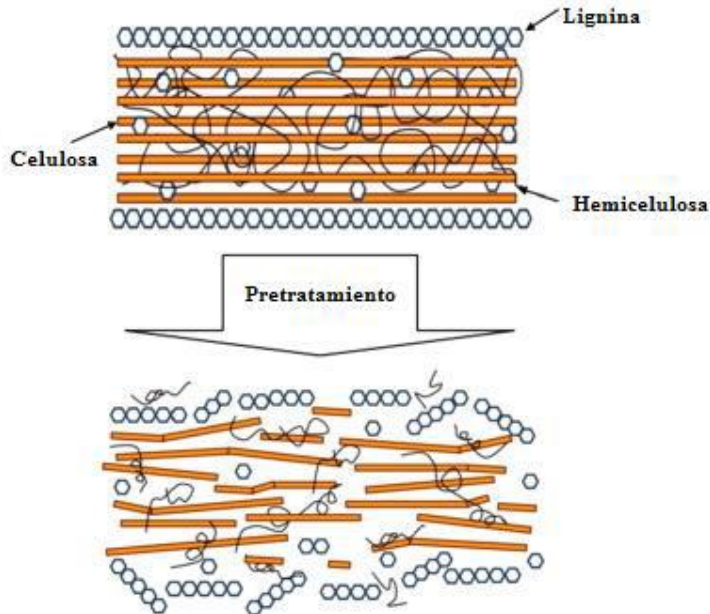


Figura 11: Ilustración del pretratamiento (Adaptado de Mood et al, 2013).

Un pretratamiento adecuado de acuerdo con Gupta y Verma (2015) debe:

- Tener un rendimiento elevado para distintos cultivos, en distintos lugares y con distintos tiempos de maduración: idealmente, un pretratamiento debería ser efectivo para cualquier materia prima lignocelulósica.
- Baja degradación de carbohidratos: una recuperación de azúcares fermentables provenientes de la fracción celulósica y hemicelulósica próximas del 100% es deseable.
- Mínima producción de compuestos inhibidores: dependiendo de las condiciones del pretratamiento, se pueden formar compuestos inhibidores para las enzimas y los microorganismos, siendo estos compuestos agrupados en ácidos débiles, compuestos fenólicos y derivados del furano.
- Que no se requiera una disminución previa del tamaño del material.



- Que la realización del pretratamiento tenga lugar en reactores con el menor tamaño y coste posibles: los costes del reactor deben ser bajos y capaces de aguantar unas presiones de trabajo razonables, además de la corrosión, por el empleo de productos químicos.
- No generar residuos sólidos: sería ideal que el tratamiento realizado sobre el hidrolizado generado en el pretratamiento no produjese residuos que necesitasen de posterior pretratamiento, para disminuir los costes del proceso.
- Trabajar con altas cargas de biomasa.
- Efectivo en materias primas con bajo contenido en humedad: la utilización de materias primas con baja humedad podría reducir el consumo de energía durante el pretratamiento.
- Obtener materiales con una alta concentración de azúcares: juntando los procesos de hidrólisis enzimática y pretratamiento, es recomendable que la concentración de azúcares sea superior al 10 % para asegurar una producción de etanol con concentración adecuada.
- Recuperación y valorización de la lignina: con la idea de producir el máximo de compuestos químicos de valor añadido a partir de una materia prima.
- Bajos requerimientos de calor y energía: para que los costes de la etapa de pretratamiento sean los menores posibles, una baja demanda de energía o una integración de procesos que permita el aprovechamiento del calor generado es necesario.



Debido a que cada uno de los materiales lignocelulósicos presentan diferentes características físico-químicas, es necesario adoptar una adecuada tecnología de pretratamiento para cada una de las materias primas (Alvira et al., 2010). Es por ello que durante las últimas décadas han sido estudiados y probados multitud de pretratamientos, pudiendo hacerse una clasificación según su naturaleza en biológicos, químicos, físicos, físico-químicos y combinados.

En la Tabla 5, se muestra un resumen de los principales pretratamientos:



Tabla 5: Resumen de los principales pretratamientos (adaptada de Carrillo-Nieves et al., 2019)).

Pretratamiento	Modo de acción	Ventajas	Desventajas.
<i>Mecánico</i>	Reducir el tamaño de partícula. Fresar, moler, triturar o picar	Reduce la cristalinidad de la celulosa	Alto consumo energético
<i>Explosión por vapor</i>	La exposición de la biomasa picada al vapor caliente (160–260 °C) a alta presión durante un período específico de tiempo seguido de una liberación repentina de presión provoca la autohidrólisis de grupos acetilo de hemicelulosa. Las fibras individuales se separan interrumpiendo la estructura de la pared celular	- Buena relación coste-beneficio - Transformación de la lignina	- Separación incompleta de la fracción lignina-carbohidrato - Ineficiente para materias primas con alto contenido en lignina - Generación de compuestos inhibidores para la fermentación - Degradación de parte de las pentosas
<i>AFEX</i>	El tratamiento con amoníaco líquido a temperatura moderada (60–100 °C) durante 30–60 min a alta presión (250–300 psi) seguido de una liberación repentina de presión provoca la interrupción de las fibras de biomasa y la des cristalización parcial de celulosa	- Aumento del área disponible - No produce compuestos inhibidores para los microorganismos fermentadores - Eliminación de lignina y hemicelulosa	No es eficiente para materias primas con alto contenido en lignina
<i>Explosión por CO₂</i>	Este método se basa en la utilización de CO ₂ supercrítico. Las moléculas de CO ₂ pueden penetrar en los poros del material lignocelulósico, facilitando la disrupción de la hemicelulosa y celulosa a través de la inyección de presión al medio, aumentando el área disponible para la hidrólisis enzimática	- Aumento del área disponible - Buena relación coste/beneficio - No produce compuestos inhibidores	No modifica la estructura de la lignina ni de la hemicelulosa
<i>Ozonólisis</i>	El tratamiento con ozono degrada la lignina al atacar la estructura de los anillos aromáticos, apenas afecta a la celulosa y las hemicelulosas	- Reduce el contenido de lignina; - No produce compuestos inhibidores	- Altos costes involucrados - Largas cantidades de ozono requeridas
<i>Ácidos</i>	El ácido diluido en lugar de concentrado se usa a alta temperatura (por ejemplo, 180 °C) durante un período corto de tiempo o a una temperatura más baja (por ejemplo, 120 °C) durante un tiempo de retención más largo (30–90 min) para solubilizar hemicelulosas y lignina	- Altera la estructura de la lignina - Hidroliza la hemicelulosa a azúcares más simples	- Formación de compuestos inhibidores; - Altos costes involucrados - Corrosión de equipos
<i>Básicos</i>	El tratamiento con álcalis como los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio altera el éster y las cadenas laterales glucosídicas causando alteración en la estructura de la lignina, hinchazón de la celulosa y su des cristalización parcial y solubilización parcial de hemicelulosas	Eliminación de la hemicelulosa y lignina - Aumento del área superficial	- Formación de sales que se incorporan en la materia prima - Extensos tiempos de contacto
<i>Organosolvente</i>	Las mezclas de disolventes orgánicos orgánicos o acuosos (como etanol, etilenglicol, acetona, metanol, etc.) con catalizadores de ácido inorgánico se utilizan para extraer lignina	Hidroliza la lignina y las hemicelulosas	Necesidad de eliminación del solvente del reactor y altos costes para recuperarlo
<i>Biológico</i>	Los hongos de podredumbre blanca, producen lignina, peroxidasa y peroxidasa que causan degradación de la lignina	- Degradación de la lignina y hemicelulosa	- Largos tiempos de residencia



Se describen a continuación los pretratamientos utilizados en esta Tesis Doctoral:

Pretratamiento ácido

En este tipo de pretratamiento, el principal objetivo es la solubilización de la fracción hemicelulósica y facilitar el ataque enzimático a la celulosa. Es uno de los tipos de pretratamiento más prometedores por su capacidad de reducción del grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, alteración estructural de la lignina y porque se consigue extraer una mayor cantidad de azúcares hemicelulósicos en comparación con los pretratamientos que no utilizan la adición de un agente hidrolítico (Yang et al., 2012).

Se pueden utilizar ácidos concentrados o diluidos, pero se ha reducido el interés de aplicar a nivel comercial el ácido concentrado, porque presenta problemas de corrosión en los equipos y un alto coste operacional. Aunque puede realizar la conversión de la celulosa y la hemicelulosa a la vez y ofrece una rápida y eficaz conversión a azúcares monoméricos a bajas temperaturas de operación, tiene como principales inconvenientes la formación de productos de degradación que tienen efecto negativo en las etapas posteriores de producción del bioetanol, como compuestos fenólicos, ácidos carboxílicos y furanos y la exigencia de equipos que soporten la corrosión. La neutralización del pH para la etapa de hidrólisis y fermentación también es otro factor que debe ser llevado en consideración en la selección de este tipo de pretratamiento (Wijaya et al., 2014).

Por ello, es mejor utilizar ácido concentrado para la producción de metano, porque las bacterias metanogénicas consiguen una mejor adaptación en un medio con presencia de compuestos como 5-HMF y furfural, principales



productos de degradación de los azúcares presentes en la biomasa (Dagnino et al., 2013).

En cambio, el pretratamiento con ácido diluido se puede realizar a altas temperaturas (180 °C) durante cortos periodos de residencia (1 a 5 min), o a temperaturas menores (120° C) y tiempos de retención mayores (30 a 90 min). En los procesos realizados con ácido diluido, la concentración del ácido está entre 0,5 y 1,5 % generalmente (Keshav et al., 2016).

Presenta como principales ventajas las siguientes (Manzanares et al., 2020):

- Alto rendimiento de solubilización de hemicelulosas.
- Posibilidad de usar ácidos menos corrosivos que el ácido sulfúrico.
- Ampliamente utilizado a escala industrial.
- Desarrollo extenso de reactores.

Algunas de las desventajas de este pretratamiento son:

- Dependiendo de las condiciones del proceso, hay degradación de hemicelulosas. Si el tiempo de reacción supera 1h a 120 °C, la xilosa empieza a disminuir su concentración y formar productos de degradación (Cruz et al., 2000).
- Posible formación de pseudoligninas.
- Necesidad de paso de neutralización.

Los ácidos sulfúrico, fosfórico, nítrico e hidroc্লórico son los más estudiados, destacando el ácido sulfúrico por su alta reactividad, bajo coste, disponibilidad inmediata para fines industriales y bajas preocupaciones ambientales (Singh et al., 2015). Cara et al (2008) obtuvo un rendimiento en



azúcares de 36,3 g/100 g de materia prima, al pretratar el olivar a 180^o C con 1 % de ácido sulfúrico durante 10 min.

Sin embargo, el ácido fosfórico es más caro, menos tóxico y corrosivo y puede ser utilizado como nutriente por los microorganismos durante la etapa de fermentación, ya que es una fuente de fósforo (Vasconcelos et al., 2013). Además, gran cantidad de productos químicos de valor añadido (fosfatos, N, K, Mg y metales traza) pueden ser recuperados y utilizados como fertilizantes (Geddes et al., 2010).

2.5.2 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se basa en la capacidad de algunos microorganismos, entre los que se encuentran bacterias y hongos, de producir un conjunto de enzimas extracelulares capaces de hidrolizar tanto la celulosa como la hemicelulosa en azúcares fermentables a través del complejo enzimático de celulasas y hemicelulasas (xilanasas), respectivamente.

La hidrólisis es un proceso efectivo (debido a la especificidad de las enzimas) que se realiza con temperaturas entre 45 y 50 °C. No presentan problemas de degradación de azúcares ni tampoco generación de compuestos tóxicos o inhibidores (Zabed et al., 2017).

Sin embargo, a pesar de la reducción de los costes en la producción de enzimas, éste sigue siendo un factor limitante ya que aún representa una de las etapas más caras en el proceso de producción del bioetanol de segunda generación. (Chovau et al., 2013), informaron que el coste de las enzimas de celulasa era superior a \$ 26 USD por metro cúbico de etanol producido por hidrólisis enzimática de celulosa. Algunos géneros de hongos, tales como *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Phanerochaete* tienen la capacidad de producir enzimas de forma extracelular y en grandes cantidades.



En este estudio reciente, han realizado la hidrólisis enzimática del bagazo de cerveza con un cóctel enzimático producido por *Aspergillus niger* CECT 2700. Los resultados muestran que este hongo puede proporcionar hidrolizados con concentraciones elevadas de azúcares fermentables (Paz et al., 2019).

La presencia de lignina en el medio hidrolítico produce una menor calidad en la hidrólisis enzimática. La lignina actúa como una barrera física dificultando el acceso al material celulósico por parte de las enzimas, es por ello que se debe eliminar para conseguir una ataque más eficaz sobre la celulosa (Lu et al., 2002). Dependiendo del pretratamiento utilizado, puede ocurrir una reagrupación o repolimerización de la lignina, o incluso la rotura de los enlaces lignina-carbohidratos (Laureano-Perez et al., 2005).

Las principales enzimas son:

Celulasas.

Las celulasas son un complejo enzimático compuesto típicamente por endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasa. Las fibras de celulosa son primeramente escindidas por la endoglucanasa, que libera pequeños fragmentos compuestos de extremos reductores y no-reductores, que a su vez son atacados por las exoglucanasas. Éstas, al interactuar con estos extremos, liberan un conjunto de oligosacáridos denominados celobiosa, que es transformada en glucosa a través de la acción de la β -glucosidasa, siendo esta enzima la limitante de la velocidad de la hidrólisis (Singhania et al., 2013).

Un esquema ilustrativo de la transformación de la celulosa en glucosa a través de la acción de las celulasas se puede apreciar en la Figura 12. La endoglucanasa inicia la hidrólisis de la región amorfa de la celulosa uniendo el



enlace β -1,4 de la celulosa con “ n ” moléculas de agua, formando “ n ” moléculas de celodextrina.

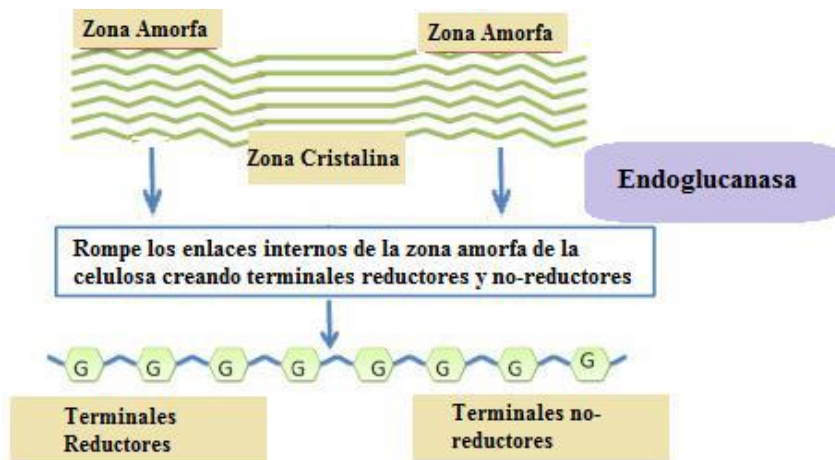


Figura 12: Actuación de las endoglucanastas (Gupta y Verma, 2015).

En esta transformación, ocurren la formación de extremos reductores y no reductores en los cuales actúa la exoglucanasa que, a través de 1,4- β -D glucano-celobiohidrolasa, transforma la celodextrina reductora y no-reductora en dos unidades de celobiosa, tal y como muestra la Figura 13.



Figura 13: Modo de acción de las exoglucanases (Gupta y Verma, 2015).

Como el azúcar al ser procesado por los microorganismos fermentativos tiene que estar en una forma más simple, la β -glucosidasa ataca la celobiosa y produce glucosa en forma de monómeros, conforme ilustra la Figura 14.

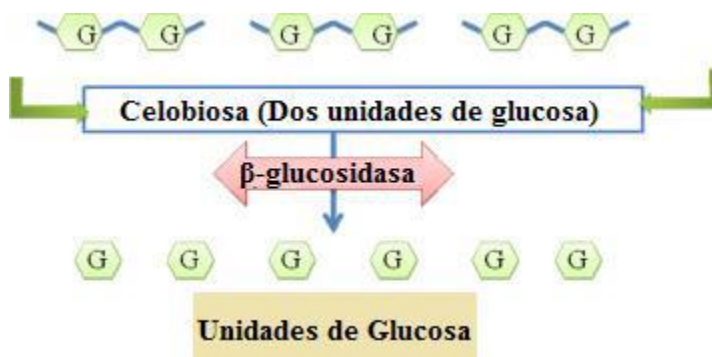


Figura 14: Modo de acción de la β -Glucosidasa (Gupta y Verma, 2015).



Hemicelulasas

La hidrólisis enzimática de la hemicelulosa es complicada, las enzimas que actúan sobre la estructura de la hemicelulosa son más complejas que las celulasas, pero son más específicas en modo de acción. Además de hidrolizar la hemicelulosa, las hemicelulasas favorecen la hidrólisis de la celulosa aumentando la accesibilidad del sistema celulolítico a las fibras de celulosa (Alvira et al., 2011). Las xilanasas son el conjunto enzimático que lleva a cabo las transformaciones de la cadena principal del xilano, estando constituida por la endo β 1,4-xilanasas y β -xilosidasas. Las endoxilanasas hidrolizan las principales cadenas de xilano y la β -xilano esterasa ataca los xilooligosacáridos y los convierte en xilosa. Las enzimas xilanolíticas son un conjunto de enzimas que actúan sobre las cadenas exteriores del xilano, incluyen la α -arabinofuranosidasa, α -glucuronosidasa, acetilxilano esterasa y α -4-O-metilglucuronosidasas xilosidasas (Zabed et al., 2017).

Actualmente, se tiende a utilizar altas cargas de sustrato, buscando traer una mayor rentabilidad económica, ya que para que el proceso de destilación sea económicamente viable, la concentración de etanol en el medio debe ser igual o superior a 4-5 % (Zacchi y Axelsson, 1989), lo que implica la obtención de concentraciones de azúcares iniciales en los hidrolizados enzimáticos de alrededor de 100 g/L (Huang et al., 2011).

Para ser considerado un proceso a altas cargas de sólido, la presencia de agua libre en el medio debe ser nula o muy baja, o tener presente una carga de sólido mayor o igual a 15 % p/p (Hodge et al., 2009). Dada la mayor carga enzimática presente, se reduce el tiempo de hidrólisis, así como el número de reactores y se reducen los problemas relacionados con la eliminación de desechos, por la menor utilización de agua (Modenbach y Nokes, 2013).



Sin embargo, hay muchos problemas con el uso de esta tecnología: no ocurre una relación lineal entre el aumento en la carga del sólido y un aumento en el rendimiento del proceso (Kristensen et al., 2009).

2.5.3 *Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento*

Durante la descomposición del material lignocelulósico, además de la solubilización de los azúcares se generan algunos compuestos que pueden afectar negativamente al proceso fermentativo, inhibiendo al microorganismo en la fermentación, o incluso a la hidrólisis enzimática, ya que puede afectar a la acción de las enzimas. Por ello, necesitan ser eliminados parcial o totalmente del material hidrolizado, a través de procesos de detoxificación. La naturaleza y la concentración de los inhibidores van a depender del tipo de biomasa, del propio pretratamiento, del empleo o no de catalizadores ácidos y condiciones del proceso (Romero-García, 2016).

2.5.3.1 *Compuestos inhibidores*

De acuerdo con Jönsson et al. (2013) los compuestos inhibidores se pueden clasificar atendiendo a su origen en tres grupos: compuestos fenólicos, derivados del furano y ácidos alifáticos (Figura 15). Sin embargo, Ko et al (2015) clasifican los compuestos inhibidores presentes en el *slurry* generado en el pretratamiento en cinco categorías: lignina, compuestos fenólicos solubles, aldehídos de furano, azúcares y ácidos débiles. Otra categoría de compuestos no incluidos por su pequeña presencia en las biomasas en general, pero que también poseen cierta importancia en los procesos de inhibición, son los extractos. Este grupo es diverso, compuesto de terpenos, grasas, ceras y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos, etc) (Rowell, 2012). Confieren a la planta propiedades como color, olor, protección contra parásitos. Su cantidad y composición varían mucho dependiendo de la especie, estación del año y localización de la planta.

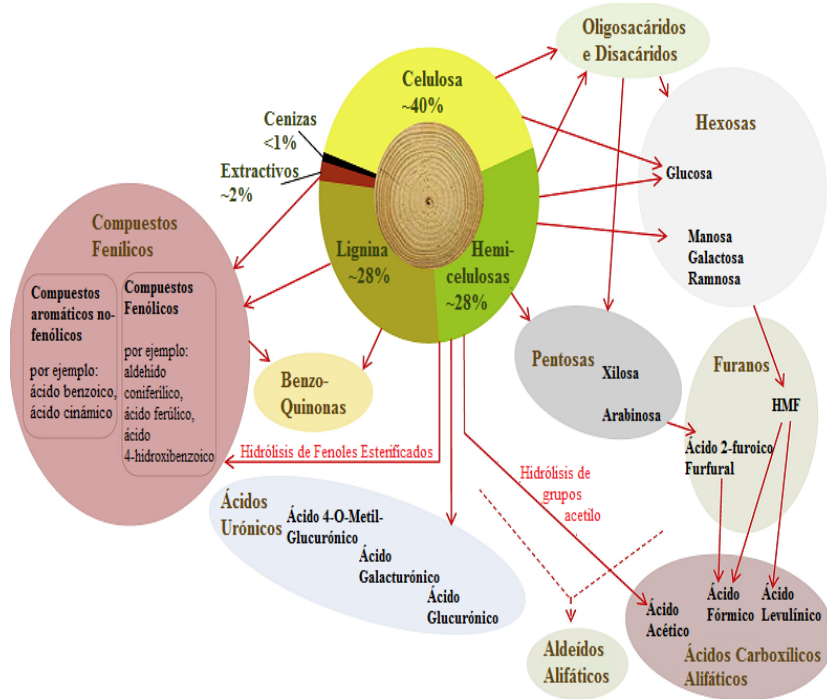


Figura 15: Clasificación según su origen de los compuestos inhibidores producidos durante el pretratamiento (Jönsson et al., 2013).

2.5.3.2 Lignina

La lignina tras el pretratamiento permanece en la fracción sólida del material, puede provocar la formación de barreras físicas y de enlaces llamados no-productivos con las celulasas que impiden que la hidrólisis enzimática fluya de manera satisfactoria. Estos enlaces en general son más fuertes en las maderas blandas que en las maderas duras, porque la estructura más condensada e hidrófoba de la lignina en las maderas blandas, da lugar a interacciones más consistentes con la celulosa (Ko et al., 2015). Su intensidad puede variar conforme el tipo y severidad del pretratamiento y dependiendo de la materia prima empleada.

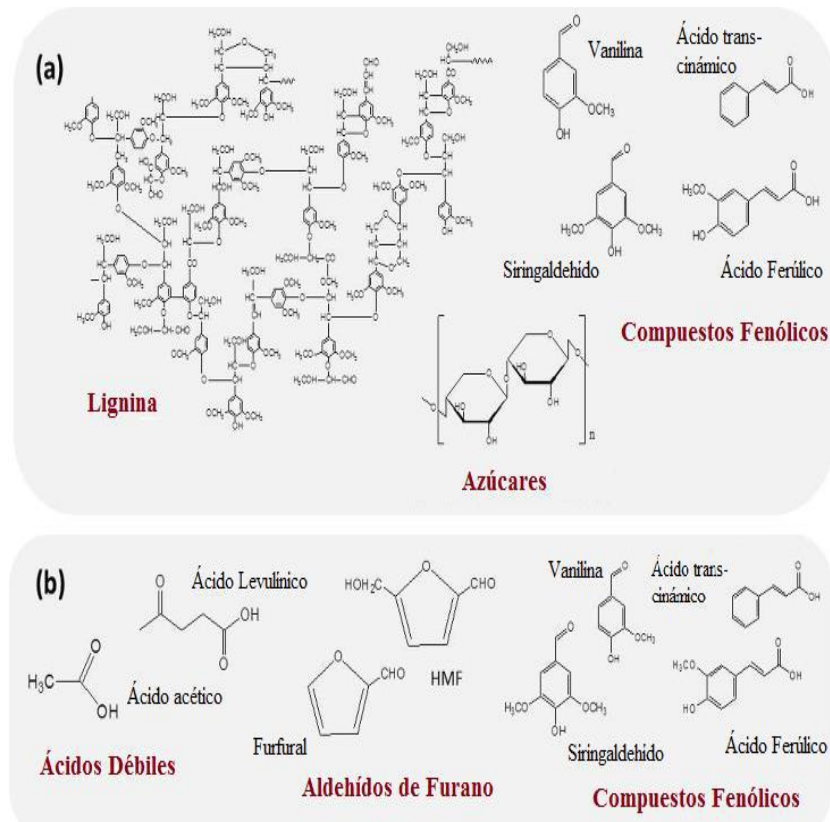


Figura 16: Compuestos que actúan como inhibidores en la hidrólisis enzimática con celulasa (a) y microorganismos fermentativos (b) (Ko et al., 2015).

2.5.3.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas. Además de inducir una inhibición de la actividad enzimática casi instantánea, los compuestos fenólicos también desactivan la celulasa a medida que pueden precipitar junto con ella, siendo esta precipitación directamente proporcional al tiempo de exposición entre los fenoles y las enzimas (Larsson, 2000).

Kim et al. (2011) obtuvieron una reducción en la mitad del rendimiento de la hidrólisis con una concentración de 1,3 g/L de compuestos fenólicos al trabajar con concentraciones enzimáticas de 1 a 25 mg de enzima por gramos



de glucano. También desactivan la celulasa a medida que pueden precipitar junto con ella, siendo esta precipitación directamente proporcional al tiempo de exposición entre los fenoles y las enzimas.

Los compuestos fenólicos no sólo son tóxicos para las celulasas, sino también para los microorganismos fermentativos por provocar la rotura de la membrana celular, afectando en su capacidad de actuar como barrera selectiva y como matriz de enzimas, modificando además su relación proteína-lípidos (Kim et al., 2013).

Compuestos fenólicos de bajo peso molecular, como siringaldehído, vanilina, ácido siríngico y aldehído coniferílico son fuertes inhibidores de la fermentación en concentraciones muy bajas. Por ejemplo, concentraciones por debajo de 0,2 g/L de aldehído coniferílico fueron capaces de inhibir el crecimiento y la producción de etanol a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Ko et al., 2015).

Existen microorganismos, tanto bacterias como *K.pneumoniae* o *Z.mobilis*, como levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Pachysolen* y *Candida* capaces de metabolizar algunos compuestos fenólicos en otros compuestos menos tóxicos (Jönsson et al., 2013).

-Derivados del furano

El furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) son derivados del furano producto de la degradación de las pentosas y hexosas, respectivamente, cuando son sometidas a condiciones de pretratamiento severas. El furfural es más tóxico porque inhibe la actividad de varias enzimas importantes en el metabolismo del carbono como la aldehído deshidrogenasa, alcohol



deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa (Sindhu et al., 2017).

Los furano aldehídos son conocidos por afectar de manera negativa a la fermentación, pero no tienen un efecto significativo sobre la hidrólisis enzimática. Estos compuestos actúan en la inhibición del crecimiento celular y consecuente en la producción de etanol, reduciendo la actividad enzimática y biológica del microorganismo al provocar daños sobre la estructura celular, inhibir a las enzimas glicolíticas y fermentativas y deteriorar el material genético y algunas proteínas (Almeida et al., 2007). Algunos microorganismos pueden convertir el furfural a productos menos tóxicos, como el ácido 2-furoico y alcohol furfurfílico.

-Ácidos débiles

El ácido fórmico y levulínico formados a partir de la degradación del HMF y furfural, y el ácido acético, formado de la degradación de los grupos acetilo de la hemicelulosa, son los principales representantes de este grupo de inhibidores.

Inhiben el crecimiento de la célula microbiana porque inducen un aumento en la acidez del citosol por la entrada de ácidos, resultando en un agotamiento del mecanismo microbiano al intentar expulsar los protones H⁺ para mantener el equilibrio de pH. El orden de toxicidad es el siguiente: ácido acético > ácido levulínico > ácido fórmico (Pereira et al., 2013). Las levaduras tienen una tolerancia de hasta aproximadamente 5 g/L de concentración de las formas no disociadas de ácido acético (Axe y Bailey, 1995).

Los mayores efectos inhibitorios del ácido fórmico se encuentran relacionados con su menor valor de pKa (3,75) en comparación con los del



ácido levulínico (4,64) y el ácido acético (4,76), lo que hace que se encuentre en su forma no disociada (es la única que puede atravesar la membrana celular), así como en menores tamaños de molécula.

Tienen amplia influencia sobre el proceso fermentativo, pero una baja acción sobre la actividad de las celulasas. Son responsables de inhibir el crecimiento de la célula microbiana al inducir un aumento en la acidez del citosol por la entrada de ácidos, resultando en un agotamiento del mecanismo microbiano al intentar expulsar los protones H⁺ para mantener el equilibrio de pH, llevando a la muerte celular cuando las concentraciones de ácido son demasiada elevadas.

Métodos de detoxificación

Los métodos convencionales de detoxificación son una de las técnicas más utilizadas para atacar el problema de los compuestos inhibidores. Requieren la adición de compuestos químicos y la utilización de equipamiento, lo que conlleva la producción de residuos adicionales y la pérdida de azúcares, y de un aumento del coste del proceso (22 % del coste total de la producción de bioetanol, (Sivers et al., 1994)).

La necesidad de detoxificación y el método utilizado dependen del tipo de inhibidores presentes en el hidrolizado y de la tolerancia de los microorganismos de fermentación hacia esos inhibidores (Taherzadeh y Karimi, 2011).

Pueden ser clasificados en físicos, físico-químicos y biológicos, como puede apreciarse en la siguiente figura:

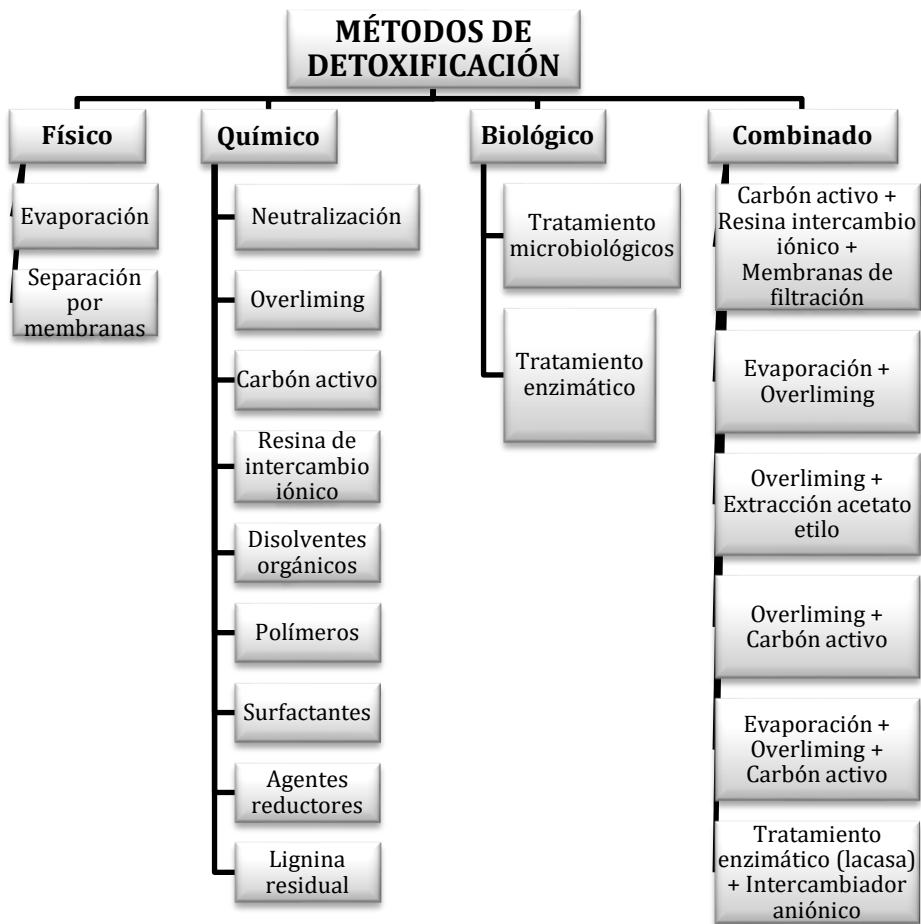


Figura 17: Diferentes métodos de detoxificación (Romero-García, 2016).



Seguidamente se describen los principales métodos convencionales de detoxificación utilizados en esta Tesis Doctoral:

Resinas de intercambio iónico

El uso de resinas de intercambio iónico se demuestra como uno de los procesos de detoxificación más eficientes, actuando en la eliminación de inhibidores derivados de la lignina, ácido acético y furfural.

Las resinas poliméricas son una de las principales representantes de este grupo, teniendo estabilidad química y mecánica, con alta capacidad de retención principalmente de compuestos fenólicos y HMF, pudiendo ser regenerada en condiciones suaves que no exigen aportación elevada de energía (Yu y Christopher, 2017). Para la separación de inhibidores en hidrolizados con un pH previamente ajustado a 10, las resinas de intercambio aniónico resultan más eficaces, lo cual requiere cantidades significativas de productos químicos alcalinos (Ranjan et al., 2009).

Las desventajas del uso de las resinas se resumen a los largos tiempos de proceso por la lenta difusión en los poros, dificultad en trabajar a nivel industrial y pérdidas de azúcares fermentables durante la purificación del medio (Canilha et al., 2012).

Recientemente, Kumar et al. (2018) detoxificaron con resina de intercambio aniónica un hidrolizado de mazorcas de maíz. Los resultados muestran que el tratamiento con resina eliminó eficientemente, los compuestos fenólicos y el 5-HMF (70 %).



Adsorción con carbón activo

La detoxificación de hidrolizados hemicelulósicos mediante el tratamiento con carbón activo es conocido como uno de los métodos de detoxificación químicos más importantes debido a su alta efectividad, bajo coste del carbón activo y su alta capacidad de adsorción de compuestos inhibidores no proporciona cambios significativos en los niveles de azúcares fermentables (Chyel et al., 2010; Canilha et al., 2008). Además, existe la posibilidad de reutilizar el carbón activo empleado a través de métodos de regeneración, lo que reduce los costes del proceso (Mateo et al., 2013).

La eficiencia en la eliminación de compuestos inhibidores, depende del pH, temperatura, tiempo de contacto y la concentración del carbón activo utilizado (Mussatto y Roberto, 2001).

El pH influye en la adsorción de ácidos orgánicos (fenoles o ácidos carboxílicos) y bases orgánicas, que son mejor adsorbidos en sus formas no-ionizadas, o sea, en soluciones ácidas y básicas, respectivamente.

Tiempos de contacto relativamente cortos (en torno a 20-30 min) resulta ser suficiente para obtener buenas adsorciones de compuestos inhibidores (Parajó et al., 1996; Mateo et al., 2013).

El aumento de temperatura aumenta la eliminación de compuestos inhibidores (principalmente productos de degradación de lignina), siendo una buena temperatura 40-50 °C (Bernardin, 1985).

A mayores valores de concentración de carbón activo se obtienen mayores reducciones de inhibidores (Gupta et al., 2017).

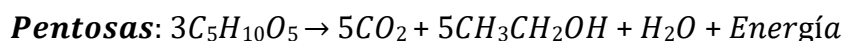
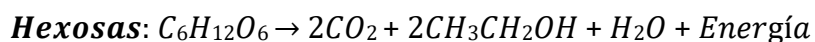


Así, por ejemplo, Sarawan et al. (2019) optimizaron, a través de un diseño Box-Behnken de cuatro factores (tiempo de contacto, temperatura de calentamiento, concentración de ácido y pH), la detoxificación con carbón activo en un prehidrolizado de desechos de hojas de sorgo, consiguiendo reducciones del 98 %, 88 % y 37 % en furfural, HMF y ácido acético, respectivamente y una menor pérdida de azúcares (7 % menos). Como demuestra este estudio, el tiempo de contacto y el pH son variables cruciales que afectan a la adsorción en los procesos de desintoxicación.

2.5.4 Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso de producción de energía en condiciones anaerobias mediante microorganismos, principalmente levaduras y algunas bacterias, que termina por generar alcohol y CO₂ a partir de monosacáridos y disacáridos.

Es la última etapa antes de la separación final del producto (que se realiza por destilación) y en ella, los azúcares liberados en forma monomérica durante la hidrólisis son transformados a etanol a través de microorganismos, principalmente levaduras y bacterias según las siguientes reacciones (Zabed et al., 2017):



La conversión estequiométrica de la glucosa y xilosa a etanol es de 0,51 gramos de etanol por gramo de azúcar (Quintero et al., 2011). Este rendimiento no se alcanza pues el 1 % de los azúcares son destinados al crecimiento celular y 4 % son convertidos a otros bioproductos como glicerol,



ácido succínico, ácido málico, aceite de fusel, ácido acético y otros productos minoritarios. Por ello, el máximo rendimiento en la producción de etanol es del 92 a 93 % (Zabed et al., 2017; Lopes et al., 2016).

Un buen microorganismo fermentador, debe presentar las siguientes características: buen crecimiento en un medio de cultivo simple y barato, rendimiento en etanol por encima del 90 % teórico, productividad en etanol por encima de 1 g/L/h, tolerancia a compuestos inhibidores y soporte a concentraciones de etanol mayores de 40 g/L (Zabed et al., 2017).

2.5.4.1 Principales microorganismos fermentativos

De entre los principales microorganismos etanologénicos conocidos, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* tienen reconocida capacidad para procesar azúcares con seis átomos de carbono, pero no consiguen utilizar la xilosa como fuente productora de etanol.

Algunas especies que naturalmente consiguen utilizar las pentosas son las del género *Pichia* y *Candida*, no tienen una productividad tan elevada, siendo por lo menos cinco veces menor que *S. cerevisiae*, además de necesitar oxígeno en cantidades reguladas y poseer sensibilidad a los inhibidores. Para las levaduras como *Scheffersomyces stipitis* o *Candida shehatae*, la tasa de absorción de glucosa es mucho mayor que la tasa de absorción de xilosa. Por lo tanto, la presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio inhibirá la utilización de xilosa hasta que la concentración de glucosa sea muy baja (Karagoz et al., 2019).

Para la viabilidad económica del proceso global resulta esencial el aprovechamiento tanto de hexosas como de pentosas potencialmente fermentables a etanol (Chyel et al., 2010).



En los últimos años los avances de la ingeniería genética han permitido el desarrollo de nuevos microorganismos capaces de cofermentar pentosas y hexosas. Para ello, se introducen genes implicados en el metabolismo de las pentosas en microorganismos fermentadores de hexosas (Zabed et al., 2017).

Algunas consideraciones sobre los microorganismos empleados en esta Tesis Doctoral serán realizadas en los apartados que siguen:

Saccharomyces cerevisiae

El género *Saccharomyces* (*Saccharomyces spp.*) es tolerante al estrés osmótico, a altas concentraciones de etanol y a condiciones anaerobias, lo que la hace adecuada para la fermentación alcohólica a escala industrial. Este género comprende cerca de siete especies (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevi*, *S. arboricolus* y *S. uvarum*) de entre las cuales destaca *S. cerevisiae* (Wimalasena et al., 2014; Brown et al., 2013).

La glucólisis es la ruta metabólica, utilizada por *S. cerevisiae* para la producción de etanol a partir de la glucosa. El tipo de glucólisis más común y más conocida es la vía de Embden-Meyerhof- Parnas, mostrada en la Figura 18, este proceso consiste en diez reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato. En ausencia de oxígeno, cada molécula de piruvato produce una molécula de etanol y otra de CO₂, generando globalmente 2 ATPs que es utilizado por la levadura para la biosíntesis de macromoléculas esenciales a su crecimiento.

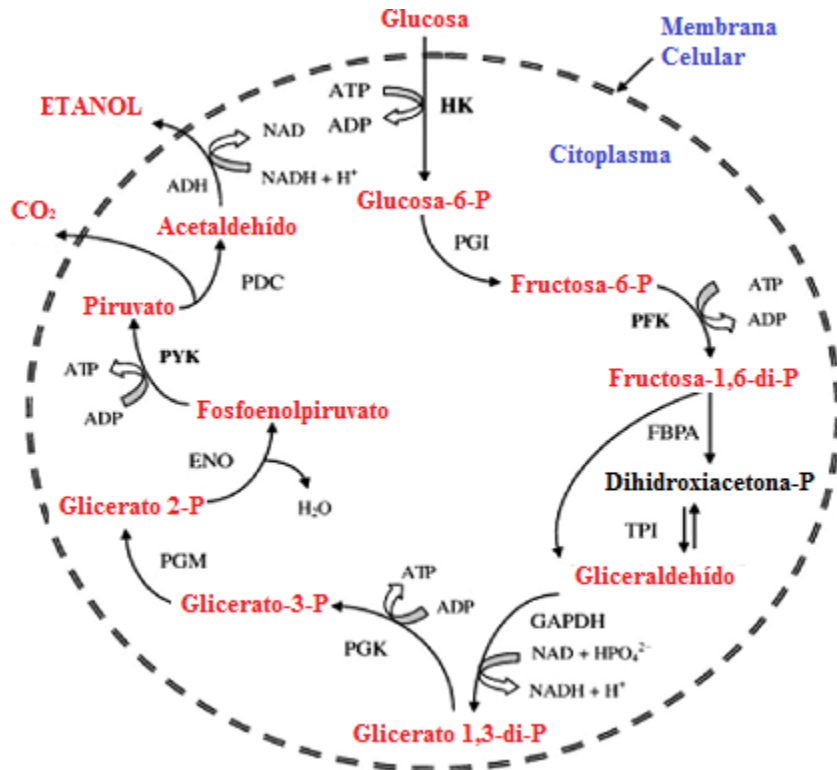


Figura 18: Ruta metabólica general de la *S. cerevisiae* para la producción de etanol a partir de la glucosa (Zabed et al., 2017).

Evidentemente, *S. cerevisiae* es incapaz de utilizar la xilosa en la producción de etanol, pero es capaz de metabolizar un isómero de xilosa, la xilulosa, siendo esto aplicado por la ingeniería recombinante para creación de cepas capaces de fermentar la xilosa.

Kuhad et al. (2011) fueron los primeros en crear con éxito una *S. cerevisiae* recombinante con la habilidad de fermentar xilosa y glucosa simultáneamente, a través de la transformación de un gen de la propia *S. cerevisiae* y de genes traídos de *P. stipitis*.



Ha sido desarrollada una cepa, denominada GS1.11-26 de un tipo de *S. cerevisiae* industrial bastante robusta y de altos rendimientos en etanol denominada “Ethanol Red”, y de ella han sido desarrolladas otras tres cepas, llamadas GSF335, GSF767 y GSE16. Estas tres cepas consiguieron fermentar 37 g/L de D-xilosa y 36 g/L de D-glucosa en 32 h, además de producir 23 % más etanol que el tipo “Ethanol Red”, siendo consideradas aptas para la aplicación a escala industrial (Jahnavi et al., 2017).

Scheffersomyces (Pichia) stipitis

S. stipitis es un género de levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*. Es una levadura facultativa que puede fermentar glucosa y xilosa tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Aunque es necesario establecer condiciones limitantes de oxígeno (microaerófilas), para estimular la producción de etanol a partir de xilosa (Fiaux et al., 2003; Klinke et al., 2004).

Con la eliminación previa de los compuestos fenólicos, *P. stipitis* fue capaz de producir el doble de etanol. Es por ello que esta levadura es sensible a la acción de los compuestos fenólicos, pues ataca las membranas celulares provocando daños irreversibles (Wang et al., 2017).

En la Figura 19, se muestra la ruta metabólica de *S. stipitis* a partir de glucosa, xilosa y arabinosa.

La etapa más difícil en la conversión de xilosa a etanol es la conversión de xilosa a xilulosa que se lleva a cabo mediante dos reacciones:

- Reducción de xilosa a xilitol.
- Oxidación de xilitol a xilulosa.

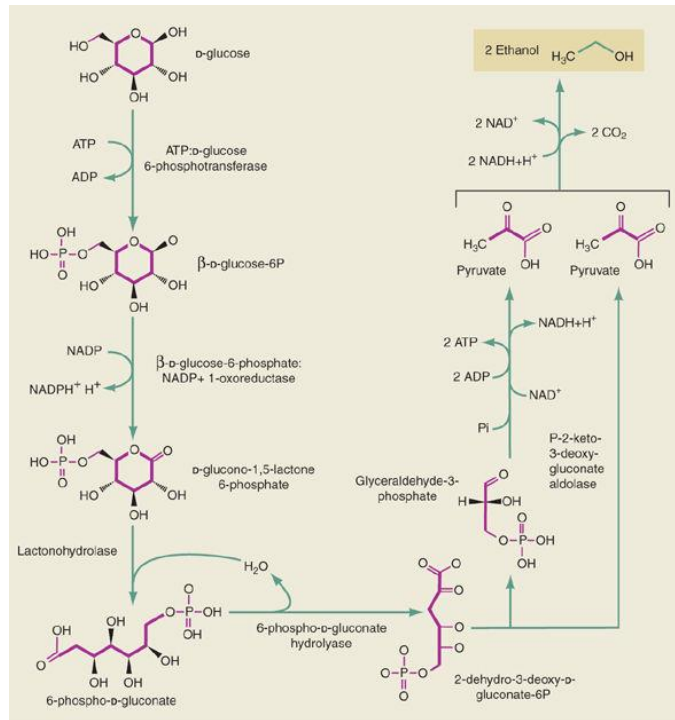


Figura 19: Ruta metabólica de *S. stipitis* (Jeffries, 2006).

Una cepa de *Pichia kudriavzevii* ha sido transformada para expresar un gen del *Aspergillus aculeatus*, siendo sometida a configuración tipo SFS con fermentación a 40 °C y convirtiendo una concentración de 100 g/L de celulosa microcristalina en 29 g/L en 72 h (Kitagawa et al., 2010).

Escherichia coli etanológicas

Escherichia coli es uno de los microorganismos que tiene descifrado su mapa genético. Se ha convertido en el organismo mejor caracterizado ampliamente utilizado en los laboratorios debido a la facilidad de cultivo, su rápido crecimiento, la trazabilidad genética, las condiciones de crecimiento favorables y la disponibilidad de herramientas versátiles de manipulación genética (Pontrelli et al., 2018).



Para mejorar el rendimiento de etanol se han usado diferentes estrategias, tales como el uso clones dentro del cromosoma de *E.coli* o impedir la producción de otros metabolitos (Orencio-Trejo et al., 2010).

Grandes avances en ingeniería genética para la producción de etanol han sido realizados por el equipo del Dr. Lonnie Ingram, de la Universidad de Florida, en EE.UU. Inicialmente trabajaron para modificar la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa combinando genes de la *Zymomonas mobilis*, creando la cepa ATC 11303. Esta sufrió mutaciones para aumentar el nivel de producción de etanol, creándose la cepa KO4. A través de la supresión del gen que codifica la generación de ácido succínico, uno de los principales co-productos generados por *E. coli*, se formó una nueva cepa, denominada KO11, cuya ruta metabólica se puede apreciar en la Figura 20, que era capaz de convertir la glucosa y xilosa a etanol próximos a valores del 100% teórico. Para mejorar aún más la producción de etanol a partir de pentosas, esta cepa ha sufrido nuevas mutaciones, donde dos nuevas cepas, la SL28 y SL40, fueron seleccionadas por producir 20% más etanol tanto con pentosas cuanto con hexosas.

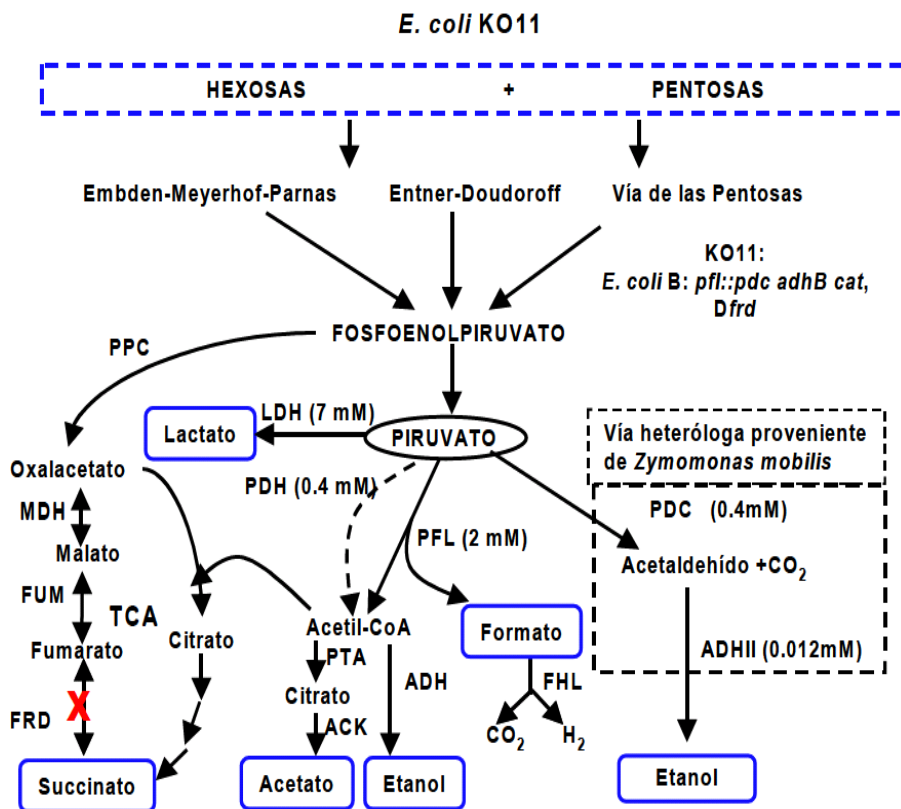


Figura 20: Ruta metabólica de *E. coli* KO11 (Huerta-Beristain, 2004).

Geddes et al (2011), utilizaron una cepa de *E. coli* denominada MM160, derivada de la LY180. La nueva cepa fue capaz de resistir con una mayor efectividad al furfural, 5-HMF y acetato producidos durante el pretratamiento. Además, fue capaz de producir 0,21 g de etanol por gramo de bagazo de caña de azúcar después de 122 h de fermentación.

Nieves et al (2011) emplearon *E. coli* MM170, derivada de la cepa MM160, que es capaz de producir etanol como producto primario de la fermentación. La nueva cepa posee genes derivados de la *Zymomonas mobilis* relacionados a la expresión de la enzima piruvato descarboxilasa y de dos tipos de alcohol deshidrogenasa, además de la supresión de genes ligados a distintos caminos fermentativos. Esta nueva cepa fue capaz de producir entre



0,25 a 0,27 gramos de etanol por cada gramo de bagazo de caña de azúcar en 80 litros de medio de fermentación, incluso disminuyendo el tiempo de fermentación con la suplementación de aire.

Geddes et al (2013) trabajaron con una evolución de la cepa MM170, denominada de *E. coli* SL100. Esta nueva cepa fue seleccionada a partir de diversos cultivos en un medio preparado con 50 % de hidrolizado y la otra mitad de AM1, y también lleva incorporados algunos genes de la *Zymomonas mobilis* conjuntamente con la anulación de algunos propios genes que actúan en competición con la ruta fermentativa. Los rendimientos alcanzaron entre 0,27 a 0,28 g de etanol por gramo de bagazo de caña de azúcar. Una cepa etanológica de *E. coli* SL100 se ha utilizado en esta Tesis Doctoral.



2.5.5 Integración del proceso

Para que el proceso de conversión de biomasa en bioetanol sea eficiente requiere que el proceso se realice con el menor consumo de energía, así como con una eficiente hidrólisis y fermentación de los azúcares. Para alcanzar estos objetivos son necesarias altas concentraciones de sólidos iniciales en el medio de fermentación que permitan obtener altas concentraciones finales de producto, junto con una eficiente integración de las etapas de proceso que permita alcanzar altos rendimientos y baja inversión en equipos (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

Dependiendo de las distintas configuraciones en las que se lleve a cabo la hidrólisis enzimática y la fermentación, los procesos de conversión de las hexosas o pentosas a bioetanol se pueden realizar en una o varias etapas secuenciales o simultáneas, en donde podemos distinguir:

- 1) Hidrólisis y fermentación secuenciales (HFS).
- 2) Hidrólisis y cofermentación por separado (HCFS).
- 3) Sacarificación y fermentación simultánea (SFS).
- 4) Sacarificación y co-fermentación simultánea (SCFS).
- 5) Bioproceso consolidado (BCP).

2.5.5.1 Hidrólisis y fermentación secuenciales (HFS)

El proceso de hidrólisis y fermentación por separado se realiza en dos etapas consecutivas, primero, la celulosa, contenida en el RSI (Residuo sólido insoluble), se hidroliza a glucosa usando enzimas celulolíticas. Después, la glucosa liberada (que generalmente se encuentra mezclada con otros azúcares, fundamentalmente hexosas y pentosas), se fermenta, convirtiéndose en etanol (Paulova et al., 2015).



Una de las principales ventajas de este proceso es que las dos etapas se realizan en sus respectivas condiciones óptimas. Sin embargo, el principal inconveniente es la acumulación de azúcares que pueden inhibir a las enzimas, que afecta en última instancia al rendimiento de etanol (Jambo et al., 2016).

La variante es la co-fermentación de hexosas y pentosas (HCFS). En esta variante, en la que se podría aprovechar también el prehidrolizado, se necesita un microorganismo con capacidad de fermentar pentosas y hexosas; o un co-cultivo con dos microorganismos uno para pentosas y hexosas, los cuales deben ser capaces de operar en las mismas condiciones de pH y temperatura; o una fermentación secuencial en la que se consuman primero las hexosas por un microorganismo y después las pentosas por otro microorganismo (Gírio et al., 2010).

Una modificación de esta configuración es aquella en la que se realiza la hidrólisis enzimática del *slurry*. El *slurry* se puede definir como el conjunto de las fracciones sólida (rica en celulosa y lignina) y líquida (rica en azúcares hemicelulósicos, celulósicos y compuestos inhibidores) que no se ha separado por filtración, resultantes del pretratamiento. Al finalizar la hidrólisis enzimática del *slurry*, se filtra, separando el sólido hidrolizado y el líquido. Posteriormente y si fuese necesario se puede detoxificar para llevar a cabo la fermentación. Esta modificación ha sido empleada en esta Tesis Doctoral.



2.5.5.2 Sacarificación y fermentación simultánea (SFS)

En esta configuración, la hidrólisis y la fermentación tienen lugar simultáneamente en un mismo reactor, siendo sometido el residuo sólido insoluble (RSI) a la acción de las enzimas, y la glucosa producida consumida por los microorganismos fermentativos presentes. Una típica SFS tarda de 3 a 6 días (Jahnavi et al., 2017).

Se presenta como un método viable y eficiente, además esta configuración elimina el problema de inhibición de las enzimas por acumulación de azúcares, es más económico por reducir el número de equipos y la presencia de etanol en el caldo reduce las posibilidades de contaminación (Lan et al., 2013).

La principal desventaja es que enzimas y microorganismos fermentadores en general no trabajan en sus condiciones óptimas, una vez que la hidrólisis enzimática funciona mejor alrededor de los 50 °C mientras la fermentación entre 28 y 37°C.

Hay dos posibles soluciones para este problema. Una opción sería la utilización de microorganismos termotolerantes como *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces fragilis*, que son capaces de trabajar cerca de la temperatura óptima de la enzima (42 °C). (Fonseca et al., 2013). La otra solución sería bajar la temperatura óptima de las enzimas a través de Ingeniería de proteínas, aunque actualmente es más viable la primera opción.

Otro gran inconveniente del proceso de SFS es la inhibición de la enzima celulasa por el etanol producido después de la fermentación, lo que podría suponer un factor limitante en la obtención de altos rendimientos de etanol (Binod et al., 2011).



2.5.5.3 Sacarificación y co-fermentación simultánea (SCFS)

En esta configuración se orienta a la asimilación completa por los microorganismos de todos los azúcares, tanto hexosas como pentosas, llevado a cabo a través de un conjunto de microorganismos capaces de fermentar hexosas y pentosas separadamente, o un único microorganismo capaz de fermentar ambos azúcares (Ohgren et al., 2006).

Sin embargo, la capacidad de fermentar pentosas junto con hexosas, no está muy extendida entre los microorganismos, siendo la afinidad por la glucosa 200 veces mayor que por la xilosa. Ventajas como bajo coste, menor tiempo de operación, menor riesgo de contaminación, menos efectos inhibitorios y eliminación del problema de crecimiento desigual en el medio hacen con que la tecnología de un solo microorganismo esté en creciente investigación (Rastogi y Shrivastava, 2017).

2.5.5.4 Bioproceso consolidado

En esta configuración un único microorganismo, en un solo paso del proceso lleva a cabo las tres etapas biológicas necesarias para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulosa en un único reactor: la producción de las celulasas y hemicelulasas, la hidrólisis y la fermentación.

La principal ventaja es que su aplicación evita los costes involucrados en la compra o producción de enzimas. Las desventajas son: los bajos rendimientos de bioetanol, causados por la formación de subproductos, la baja tolerancia del microorganismo al bioetanol y el crecimiento limitado en los licores de los hidrolizados.

Los microorganismos termófilos pueden soportar altas temperaturas, pero tienen baja tolerancia al bioetanol (<2 % v/v). A pesar de esto, una cepa



de levadura termotolerante *K. marxianus* crece bien a temperaturas de hasta 48 ° C y produce etanol a partir de β -glucano (material celulósico) con un rendimiento de 0,47 g de etanol por gramo de carbohidrato consumido (Rastogi y Shrivastava, 2017).

La Tabla 6 resume algunas de las principales características de los de los procesos de aprovechamiento de biomasa lignocelulósica



Tabla 6: Ventajas y desventajas de distintas configuraciones de hidrólisis por vía enzimática y fermentación (adaptada de Carrillo-Nieves et al., 2019).

	SFS	SCFS	BCP
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> -Amplia disponibilidad de microorganismos eficientes para este tipo de procesos -Disminución de costes de inversión y empleo de menores concentraciones de enzimas - Se minimiza la inhibición por producto final lo que se refleja en rendimientos de hidrólisis más altos <ul style="list-style-type: none"> - Reducción del tiempo total de proceso y productividades mayores - Permite el empleo de mayores concentraciones de sustrato 	<ul style="list-style-type: none"> - Las mismas que SFS -Puede aumentar el rendimiento de hidrólisis enzimática - Aprovechamiento de la mayoría de azúcares presentes en la materia prima 	<ul style="list-style-type: none"> - No se necesita enzimas externas para realizar la hidrólisis - Reducción de costes de producción
Inconvenientes	<ul style="list-style-type: none"> -Proceso en dos etapas con el consiguiente incremento de costes de inversión y de tiempo total de procesamiento - Inhibición por producto final durante la hidrólisis enzimática - Posibilidad de contaminación microbianas - No hay fermentación de las pentosas. Se soluciona si se utiliza HCFS 	<ul style="list-style-type: none"> - Las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para hidrólisis y fermentación - Imposibilidad de reciclar las células - No hay fermentación de las pentosas 	<ul style="list-style-type: none"> - No existen actualmente microorganismos con todas las características requeridas para un eficiente proceso - Bajos rendimientos y baja tolerancia a los productos, y crecimiento limitado - Se encuentra en etapa de investigación



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



La hipótesis de partida es que el bagazo de cerveza se genera cada año en grandes cantidades y actualmente, la principal aplicación de este subproducto es la alimentación animal. Debido a su alto contenido en humedad (~80 %), una vez producido, si no se usa dentro de los cinco días posteriores, el crecimiento microbiano causa un rápido deterioro. Por lo tanto, sino hay salida comercial para el bagazo, necesariamente tiene que ir al vertedero.

Debido a su composición, esta biomasa resulta ser una materia prima adecuada para la producción de etanol. La valorización y aprovechamiento de esta biomasa tendría beneficios medioambientales, sociales y económicos.

El objetivo general es proponer un esquema eficiente de producción de etanol a partir de bagazo de cerveza. Para ello, se evaluará, en primer lugar, el pretratamiento con los ácidos fosfórico y sulfúrico. Seguidamente, se compararán distintas estrategias de sacarificación y fermentación para el bagazo pretratado empleando diferentes microorganismos.

Para alcanzar este objetivo general, se pretende la consecución de los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la composición de la materia prima y de los líquidos y sólidos obtenidos tras los diferentes pretratamientos estudiados.
- Optimizar el pretratamiento con ácido fosfórico maximizando la recuperación global de azúcares.
- Optimizar el pretratamiento con ácido sulfúrico, evaluando sus ventajas frente al empleo de ácido fosfórico.
- Determinar la configuración de hidrólisis enzimática y fermentación más apropiada para obtener etanol a partir de los sólidos pretratados en las condiciones óptimas de cada pretratamiento.



- Evaluar la eficacia de distintas técnicas de detoxificación (carbón activo y resinas de intercambio iónico) sobre la eliminación de compuestos tóxicos en el prehidrolizado.
- Producir etanol de forma eficiente a partir de los azúcares hemicelulósicos de las fracciones líquidas obtenidas en condiciones óptimas de ambos pretratamientos.
- Evaluar el rendimiento de los procesos fermentativos a través del empleo de microorganismos con distintas características metabólicas: *Saccharomyces cerevisiae* "Ethanol Red", *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 y *Escherichia coli* SL100
- Verificar la viabilidad de un esquema alternativo para el aprovechamiento conjunto del material resultante del pretratamiento (*slurry*).



4. RESUMEN DE RESULTADOS



Los resultados obtenidos durante la realización de la presente Tesis Doctoral han dado lugar a los siguientes artículos, que se recogen como anexos y se enumeran a continuación:

1. Autores: José A. Rojas-Chamorro, Cristóbal Cara, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Juan M. Romero-García, Solange Mussatto, Eulogio Castro.

Título: Ethanol production from Brewers' Spent Grain pretreated by dilute phosphoric acid.

Publicación: *Energy & Fuels*, 32, 5226-5233 (2018)

2. Autores: José Antonio Rojas-Chamorro, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Cristóbal Cara y Eulogio Castro.

Título: Comparison of fermentation strategies for ethanol production from pretreated brewers spent grain.

Publicación: *Chemical Engineering Transactions*. 61, 637-642 (2017).

3. Autores: José Antonio Rojas-Chamorro, Inmaculada Romero, Juan Carlos López-Linares, Eulogio Castro.

Título: Brewer's spent grain as a source of renewable fuel through optimized dilute acid pretreatment.

Publicación: *Renewable Energy* (en revisión por pares).

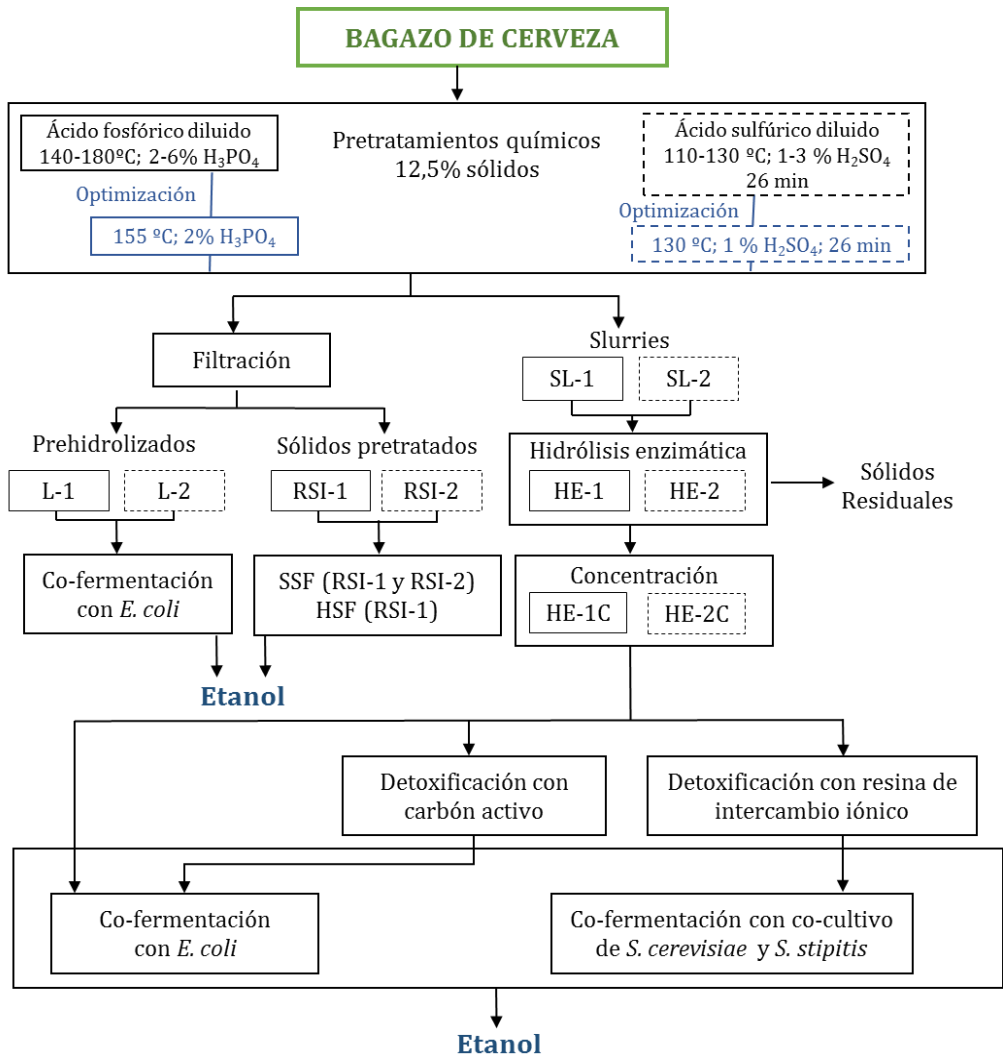
4. Autores: José Antonio Rojas-Chamorro, Juan Miguel Romero García, Inmaculada Romero, Cristóbal Cara y Eulogio Castro.

Título: Improved ethanol production from the *slurry* of pretreated brewer's spent grain through different co-fermentation strategies.

Publicación: *Bioresource Technology*. *In press*.



De forma global, el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se esquematiza en la Figura 21. En primer lugar, se abordó el estudio del pretratamiento del bagazo de cerveza con ácido fosfórico diluido, con la consiguiente caracterización de las fracciones líquidas y sólidas resultantes, así como la realización de ensayos de hidrólisis enzimática sobre los sólidos pretratados. Esto permitió evaluar el pretratamiento y determinar sus condiciones óptimas (Artículo 1). A continuación, se evaluó la producción de etanol a partir del licor de pretratamiento (Artículo 1) y a partir del sólido pretratado, obtenidos en condiciones óptimas, mediante diferentes estrategias de sacarificación y fermentación para obtención de etanol celulósico (Artículo 2). Igualmente, se evaluó el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido determinando sus condiciones óptimas para esta biomasa (Artículo 3). Finalmente, se trabajó con una nueva estrategia de proceso que conlleva la hidrólisis enzimática de los *slurries* de ambos pretratamientos generados en las condiciones previamente optimizadas, y la posterior co-fermentación de los hidrolizados resultantes mediante el empleo de diferentes microorganismos (Artículo 4).



- L-1: Licor del pretratamiento con ácido fosfórico.
- L-2: Licor del pretratamiento con ácido sulfúrico.
- RSI-1: Residuo sólido insoluble del pretratamiento con ácido fosfórico.
- RSI-2: Residuo sólido insoluble del pretratamiento con ácido sulfúrico.
- SL-1: *Slurry* del pretratamiento con ácido fosfórico.
- SL-2: *Slurry* del pretratamiento con ácido sulfúrico.
- HE-1: Hidrolizado enzimático del *slurry* de ácido fosfórico.
- HE-2: Hidrolizado enzimático del *slurry* de ácido sulfúrico.
- HE-1C: Hidrolizado enzimático del *slurry* de ácido fosfórico concentrado.
- HE-2C: Hidrolizado enzimático del *slurry* de ácido sulfúrico concentrado.

Figura 21: Esquema simplificado del proceso experimental.



4.1 MATERIA PRIMA

La biomasa utilizada como materia prima en la presente Tesis Doctoral ha sido el bagazo de cerveza, el cual fue suministrado amablemente por la planta de fabricación de cerveza Cruzcampo-Jaén (Heineken España, S. A., España). Una vez en el laboratorio, este subproducto de la industria cervecera se lavó con agua hasta alcanzar pH neutro y posteriormente se secó en una estufa a 50^o C hasta alcanzar un contenido total de sólidos de alrededor del 90 %. Esta materia prima se almacenó a 4^o C hasta su uso.

La caracterización de la materia prima se ha realizado de acuerdo con los métodos para biomasa del NREL de EE.UU (Sluiter et al., 2010). Esta metodología incluye una extracción en dos etapas para determinar el contenido total en extractivos (componentes no estructurales de la biomasa como ceras, grasas, taninos, azúcares, resinas, colorantes, etc...) mediante dos extracciones en Soxhlet consecutivas de 24 h cada una, una acuosa y otra etanólica.



La etapa siguiente en la caracterización es una hidrólisis ácida en dos etapas, primero con ácido concentrado y después con ácido diluido, con objeto de solubilizar todos los carbohidratos estructurales para su determinación. Los hidrolizados obtenidos se analizan por HPLC para determinar las concentraciones de monómeros (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) y a partir de estos se calcula el contenido en polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) dividiendo por un factor (0,90 para hexosas y 0,88 para pentosas) para tener en cuenta las moléculas de agua generadas al romperse los enlaces durante la hidrólisis. En estos hidrolizados, también mediante HPLC, se determina el contenido en grupos acetilo (ácido acético/1,43) y mediante espectrofotometría el contenido en lignina ácido soluble (LAS). Finalmente, a partir del sólido se determina el contenido en lignina ácido insoluble (LAI) y las cenizas ácido insoluble (CAI). En la Figura 22 se recogen los resultados de la caracterización del bagazo empleado en esta Tesis Doctoral. Los resultados mostrados corresponden a los valores medios de seis mediciones.

Los azúcares, estructurados en forma de celulosa, hemicelulosa y almidón representan un 46 % del peso seco del bagazo. La glucosa está principalmente en forma de celulosa, aunque una fracción menor, alrededor del 26 % es glucosa en forma de almidón, que representa el 5,25 % de la composición del bagazo. El azúcar hemicelulósico principal es la xilosa, aunque también hay que resaltar el alto contenido del bagazo en arabinosa, que representa el 25 % de los azúcares hemicelulósicos totales. Con respecto al contenido en lignina, el bagazo analizado se puede considerar como un material con un contenido relativamente bajo (12,5 %). Destaca también el porcentaje de extractos, relativamente alto (18,5 %), de los cuales el 25 % eran componentes solubles en agua y el 75 % materiales solubles en etanol.



Además, se ha determinado la presencia de lípidos (8,6 %), tras 6 h de extracción con hexano. Este subproducto es rico en proteínas, con un contenido de 21,2 % (9 % insoluble en ácido). Junto con la proteína, el material insoluble en ácido (10,13 %), incluye principalmente lignina y cenizas.

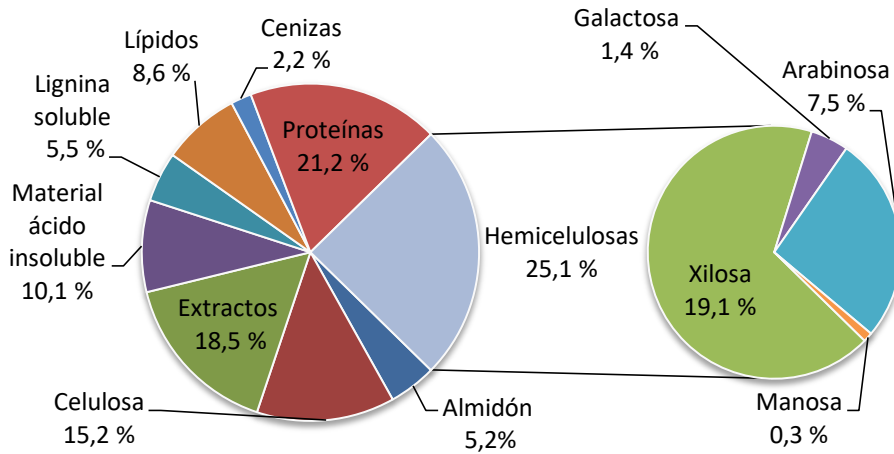


Figura 22: Composición del bagazo de cerveza (valores medios de seis determinaciones).



4.2 COMPARATIVA DE PRETRATAMIENTOS

El pretratamiento es una de las etapas cruciales para hacer viable una plataforma de bioproductos a partir de la biomasa, y cuenta con aproximadamente el 40 % del coste involucrado en la producción de bioetanol (Sindhu et al., 2016).

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se han evaluado dos pretratamientos ácidos para el bagazo a fin de producir azúcares fermentables. En la Tabla 7 se resumen los pretratamientos aplicados a esta biomasa lignocelulósica residual así como las variables estudiadas y sus rangos.

El pretratamiento con ácido fosfórico se llevó a cabo en un reactor Parr, de acuerdo con un diseño de experimentos central compuesto rotable (13 experimentos) mientras que el pretratamiento con ácido sulfúrico se realizó



en un autoclave a temperaturas más suaves, por debajo de 130°C, siguiendo un diseño experimental Box-Behnken (17 experimentos). En ambos casos, se determinaron las condiciones óptimas que maximizan simultáneamente la recuperación de azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado y la recuperación de glucosa por hidrólisis enzimática del sólido pretratado.

Tabla 7: Condiciones de operación empleadas en los pretratamientos aplicados al bagazo.

Pretratamiento	Condiciones de operación	
	Diseño y parámetros fijos	Variables
Ácido fosfórico (Artículo 1)	Central compuesto rotatable S/L: 12,5 % (p/p) t: 0 min	T: 140–180 °C C _A : 2–6 % (p/v)
Ácido sulfúrico (Artículo 3)	Box-Behnken S/L: 12,5% (p/p)	T: 110–130 °C C _A : 1–3 % (p/v) t: 10-40 min

C_A: concentración de ácido; T: temperatura; t: tiempo; S/L: relación sólido/líquido.

4.2.1 Composición de los sólidos pretratados

Al tratar el bagazo con ácido fosfórico diluido se alcanzaron recuperaciones de sólido comprendidas entre 32 % y 43 % (Tabla 5, Artículo 1). En el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, se recuperó entre un 37 % y un 57 % de la biomasa inicial (Tabla 2, Artículo 3).

Como se puede apreciar, en el pretratamiento con ácido fosfórico más del 60 % del bagazo se solubilizó en todas las condiciones analizadas. Sin embargo, la solubilización fue menor en el pretratamiento con ácido sulfúrico, entorno al 50 % en la mayoría de los casos, salvo alguna excepción (Run 1, 45 % y Run 6, 43 %, Tabla 1, Artículo 3). Este hecho puede ser atribuido al empleo de temperaturas más bajas en comparación con el pretratamiento con ácido fosfórico.



En general, los altos niveles de solubilización alcanzados en ambos pretratamientos están relacionados con la presencia de fracciones fácilmente hidrolizables, como extractos, hemicelulosa, almidón o incluso proteínas. En ambos pretratamientos, la hemicelulosa se solubilizó casi por completo, exceptuando algunos sólidos pretratados con ácido sulfúrico (contenido inferior al 6 %). La solubilización de las fracciones de hemicelulosa y extractos, durante el pretratamiento, conduce a un incremento en el contenido de celulosa de los sólidos pretratados. Si tenemos en cuenta que el bagazo original contenía un 15 % de celulosa, en ambos pretratamientos se logró obtener sólidos con casi el doble de contenido en celulosa en la mayoría de las condiciones ensayadas, entre 29 % y 43 % en el caso del ácido fosfórico (Tabla 5, Artículo 1) y entre 25 % y 33 % para el pretratamiento con ácido sulfúrico (Tabla 2, Artículo 3).

Con respecto a la proteína, cabe resaltar que el pretratamiento con ácido fosfórico consiguió una solubilización superior al 60 % en todas las condiciones ensayadas, incluso llegó al 80 % con la concentración máxima de ácido (6,83% H_3PO_4). De igual forma, la proteína se solubilizó parcialmente, durante el pretratamiento con ácido sulfúrico, logrando sólidos pretratados con un contenido en proteína que oscila entre el 11 % y el 30 % (Tabla 2, Artículo 3)



4.2.2 Composición de las fracciones líquidas

Los azúcares presentes en los licores de ambos pretratamientos, en ambos pretratamientos, se encontraron mayoritariamente en forma de monómeros, a excepción de los experimentos realizados a las concentraciones más bajas de ácido fosfórico en los que se determinó entre 20% y 30% de azúcares en forma oligomérica (Run 10 y 12, Tabla 3, Artículo 1).

El pretratamiento con ácido fosfórico permitió obtener soluciones de azúcar con concentraciones que oscilan entre 9 y 43,4 g/L. En cambio, las concentraciones obtenidas en el caso del pretratamiento con ácido sulfúrico fueron superiores, 33,2 - 45,6 g/L. En todos los casos, el azúcar mayoritario fue la xilosa, representando alrededor de un 50 % del total de azúcares hemicelulósicos presentes en los prehidrolizados. Como segundo azúcar hemicelulósico mayoritario se encuentra la arabinosa, que supone en torno al 25 % de los azúcares hemicelulósicos, debido al alto contenido de arabinano presente en esta biomasa. Además, la glucosa también estuvo presente en todos los prehidrolizados, con concentraciones que variaban entre 4 g/L y 11 g/L (Tabla 3, Artículo 1; Tabla 2, Artículo 3). Esta glucosa procede fundamentalmente de la fracción de almidón del bagazo (5,25 g/100 g de bagazo seco) ya que el almidón se hidroliza a glucosa en condiciones más suaves que la celulosa.

Uno de los objetivos del pretratamiento es la hidrólisis de la fracción de hemicelulosa, que se ha evaluado determinando la recuperación de azúcares hemicelulósicos (porcentaje de azúcares solubilizados en relación al total de azúcares presentes en la fracción de hemicelulosa de la biomasa inicial). En el caso del pretratamiento con ácido fosfórico, se determinaron valores altos, superiores al 70 %, alcanzado un máximo de 89,4 % en las siguientes



condiciones: 140 °C, 6 % H₃PO₄. Sin embargo, a temperaturas superiores a 180 °C, la recuperación de azúcares hemicelulósicos disminuyó drásticamente, debido a la degradación de azúcares. En cambio, en el pretratamiento con ácido sulfúrico, la recuperación de azúcares hemicelulósicos máxima se logra al nivel más alto de temperatura y al nivel más bajo de concentración de ácido. En este pretratamiento, se alcanzaron recuperaciones de azúcares hemicelulósicas más altas, superiores al 80 % en todas las condiciones analizadas con un valor máximo del 98 % (Run 7, Tabla 1, Artículo 3). Esto pone de manifiesto el efecto perjudicial de la temperatura sobre los azúcares solubilizados, llegando a degradarlos hacia compuestos que resultan tóxicos para los microorganismos fermentativos.

La Figura 23 muestra la concentración de azúcares en los licores obtenidos en las condiciones óptimas de cada pretratamiento. Igualmente, se recoge el porcentaje de recuperación de azúcares alcanzado en cada caso, expresado como g azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado/100 g azúcares hemicelulósicos en el bagazo original.

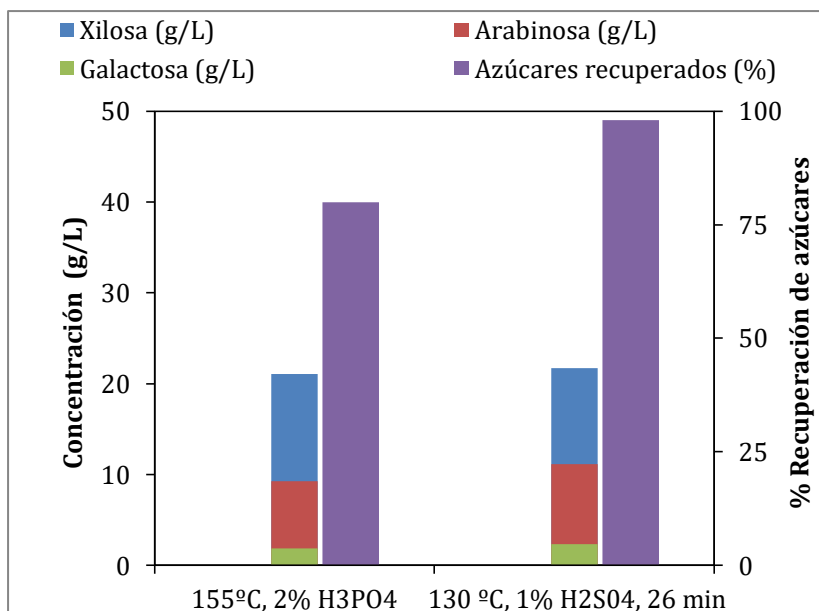


Figura 23: Concentración y recuperación de azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado bajo las condiciones óptimas de cada pretratamiento.

En ambos prehidrolizados, el azúcar hemicelulósico mayoritario es la xilosa, seguido de la arabinosa. Cabe destacar que el pretratamiento del bagazo con ácido sulfúrico, en condiciones óptimas, consiguió la solubilización casi completa de su fracción hemicelulósica, con una recuperación de azúcares del 98 %. En el caso del pretratamiento con ácido fosfórico la recuperación de azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado alcanzó el 80% (Figura 23).

Las mayores concentraciones de compuestos inhibidores, en general, se detectaron en los líquidos obtenidos por pretratamiento con ácido fosfórico. En estos prehidrolizados se encuentran presentes furfural e hidroximetilfurfural, formados por deshidratación de pentosas y hexosas respectivamente, con concentraciones máximas de 4,4 g/L y 1,7 g/L, respectivamente. Asimismo, forma parte de la composición típica de estos líquidos, el ácido acético procedente de la solubilización de las hemicelulosas



(máxima concentración 1,5 g/L). En estos prehidrolizados también fue detectada la presencia de compuestos fenólicos (concentración máxima 3,6 g/L), procedentes de los extractivos y de la degradación de la fracción de lignina. Los líquidos obtenidos por pretratamiento con ácido sulfúrico presentaron concentraciones significativamente más bajas de todos estos compuestos. De hecho, las concentraciones de ácido acético, furfural y fenoles en estos líquidos fueron inferiores a 1,2, 0,9 y 2,2 g/L, respectivamente, y no llegó a detectarse presencia de hidroximetilfurfural.

4.2.3 Hidrólisis enzimática

A pesar de que una pequeña porción de celulosa también puede hidrolizarse a glucosa durante el pretratamiento, la mayor parte de esta fracción permanece intacta y requiere una hidrólisis adicional (Hamelinck et al., 2005).

Para evaluar la efectividad de los pretratamientos, se realizaron ensayos de hidrólisis enzimática con todos los sólidos resultantes de ambos pretratamientos. Las pruebas se realizaron en condiciones estándar (5 % de carga de sustrato, 50 °C, pH 4,8) con el complejo enzimático Cellic CTec3. Esto permitió conocer la digestibilidad enzimática del bagazo tras el pretratamiento mediante el parámetro de “eficacia de sacarificación” expresado como g de glucosa obtenida por hidrólisis enzimática por cada 100 g de glucosa en el bagazo pretratado.

Los sólidos pretratados con ácido fosfórico rindieron hidrolizados enzimáticos con concentraciones de glucosa que oscilan en un rango estrecho, de 16 g/L (Run 13) a 21 g/L (Run 7) (Tabla 6, Artículo 1) alcanzando la conversión completa de la celulosa en el segundo caso. En el caso de la hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados con ácido sulfúrico, se



obtuvieron concentraciones de glucosa que oscilaron entre 9,4 g/L (Run 6) y 16 g/L (Run 7) (datos no mostrados), con 70% y 100% de sacarificación, respectivamente. El bagazo pretratado, en las diferentes condiciones ensayadas, resultó fácilmente hidrolizable por las enzimas. Así, la concentración de glucosa se incrementó rápidamente al principio de la hidrólisis, y en las seis primeras h de hidrólisis el porcentaje de glucosa generada fue superior al 70 % en todos los casos, alcanzando un 86 % en las siguientes condiciones: 130°, 3% H₂SO₄, 25 min. El proceso hidrolítico había terminado después de solo 24 h en todos los casos.

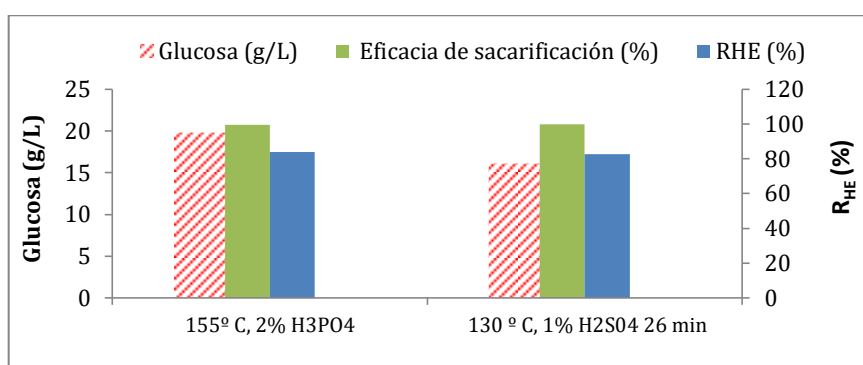
En general, la eficacia de sacarificación fue superior al 70 % en los sólidos pretratados con ácido sulfúrico (datos no mostrados), llegando al 80 % en el caso de los sólidos pretratados con ácido fosfórico. Previamente, se realizó un test de hidrólisis enzimática utilizando bagazo sin pretratar como control con una producción de glucosa de 4,0 ± 0,11 g/L después de 48 h, que equivale a un 35% de sacarificación enzimática. Este aumento notable en el rendimiento indica que el pretratamiento logró desorganizar la estructura de celulosa incrementando su digestibilidad, por lo tanto, el coctel enzimático pudo actuar sobre las cadenas de celulosa.

Igualmente, se determinó la cantidad de glucosa celulósica del bagazo original recuperada por hidrólisis enzimática mediante el “rendimiento de hidrólisis, R_{HE}”, expresado en g de glucosa obtenidos por hidrólisis enzimática por cada 100 g de glucosa celulósica en el bagazo original. De este modo, el pretratamiento con ácido fosfórico permitió recuperar más del 70 % de glucosa celulósica por hidrólisis enzimática en todos los casos, con un valor máximo de R_{EH} de 94,5 % (Run 6; 160 °C, 6,83 % H₃PO₄). En cambio, los valores experimentales en el pretratamiento con ácido sulfúrico oscilaron entre 54,2 % (Run 13) y 82,7 % (Run 7). El rendimiento más alto se obtuvo en



las mismas condiciones de pretratamiento que produjeron el valor máximo de eficacia de sacarificación (Run 7, 130 °C, 1 % de H₂SO₄, 25 min).

La Figura 24 muestra los rendimientos de hidrólisis enzimática del bagazo pretratado en las condiciones óptimas de ambos pretratamientos. Como se observa, aunque la producción de glucosa fue mayor en el caso del ácido fosfórico, 19,8 g/L *versus* 16 g/L, en ambos casos se hidrolizó la celulosa completamente (eficacia de sacarificación superior al 99%) alcanzando rendimientos de hidrólisis muy similares, 84 % y 83% respectivamente.



Eficacia de sacarificación: g glucosa obtenidos por hidrólisis/100 g glucosa en el sólido pretratado. R_{HE}: Rendimiento de hidrólisis enzimática, g glucosa obtenidos por hidrólisis /100 g glucosa en el bagazo original.

Figura 24: Producción de glucosa y rendimientos de hidrólisis a partir del bagazo pretratado en las condiciones óptimas de cada pretratamiento.

Para conocer la eficacia global de ambos pretratamientos sobre el bagazo, se determinó la cantidad total de azúcares recuperados tanto por el pretratamiento como por la posterior hidrólisis enzimática de los sólidos resultantes. Este parámetro se denominó “rendimiento global de azúcares” y se calculó como la suma de azúcares recuperados en el líquido y la glucosa recuperada por hidrólisis enzimática a partir de 100 g de bagazo original. Se



determinaron rendimientos globales superiores a 40 g azúcar/100 g bagazo en ambos pretratamientos, excepto en los experimentos realizados a temperaturas superiores a 180 °C, independientemente de la concentración de ácido.

En la Tabla 8 se recogen, a efectos comparativos, los azúcares del bagazo original que se han recuperado en el licor de pretratamiento o prehidrolizado, la glucosa recuperada en la hidrólisis enzimática y los rendimientos globales en azúcares obtenidos con las condiciones óptimas para cada pretratamiento.

Tabla 8: Recuperación y rendimientos globales de azúcares en las condiciones óptimas de los distintos pretratamientos (expresados como g azúcares/100 g bagazo).

Pretratamiento y condiciones óptimas	Azúcares recuperados en prehidrolizado	Glucosa recuperada por hidrólisis	*Rendimiento global
Con ácido fosfórico C _A : 2 % (p/v) T: 155 °C	31,8	14,6	46,4
Con ácido sulfúrico C _A : 1 % (p/v) T: 130 °C t: 26 min	33,8	13,8	47,6

*Suma de los azúcares recuperados en el prehidrolizado y en el hidrolizado enzimático. C_A: concentración de ácido; T: temperatura; t: tiempo.

Comparando ambos pretratamientos, se puede apreciar que la cantidad de azúcares recuperados en el prehidrolizado fue superior en el pretratamiento con ácido sulfúrico lo que dio lugar a un mayor rendimiento global, puesto que la recuperación de glucosa por sacarificación del sólido pretratado fue prácticamente la misma en ambos pretratamientos.

Por otra parte, en el artículo 4, se recoge el estudio de una novedosa estrategia de sacarificación y fermentación ensayada con el bagazo que



incluyó la hidrólisis enzimática de los *slurries* (fracciones sólidas y líquidas resultantes del pretratamiento sin separar) obtenidos en las condiciones previamente optimizadas para los pretratamientos con ácido fosfórico (Artículo 1) y ácido sulfúrico diluido (Artículo 3). Las condiciones experimentales de la hidrólisis del *slurry* fueron las siguientes: 4,5 y 5,3 % de carga sólida insoluble para el sólido resultante del pretratamiento con ácido fosfórico y sulfúrico respectivamente, 50 °C y pH 5, con el complejo enzimático Cellic CTec2 en ambos casos.

La sacarificación enzimática del *slurry* de ácido fosfórico produjo 31 g/L de glucosa en las primeras 6 h, y a las 24 h ya había superado el 90 % de la concentración máxima, 34,2 g/L (21,2 g/L corresponden a glucosa por hidrólisis enzimática y el resto corresponde a azúcares solubilizados durante el pretratamiento). En el caso del *slurry* del pretratamiento con ácido sulfúrico, el 82 % de la glucosa se había liberado a las 6 h y el nivel más alto, 29 g/L, se alcanzó después de solo 12 h (20 g/L corresponde a glucosa de celulosa).

Vale la pena destacar el poco tiempo requerido para la sacarificación de la celulosa del bagazo, que contrasta con la duración de la hidrólisis enzimática del *slurry* de otros materiales lignocelulósicos como la paja de colza (López-Linares et al., 2016) o Agave lechuguilla (Díaz-Blanco et al., 2018) que requirieron tiempos superiores usando la misma carga enzimática.



Los rendimientos de hidrólisis enzimática logrados en este trabajo corresponden a eficacias de sacarificación (referidas a glucosa en sólidos pretratados) cercanas al 100 % en ambos casos, lo que significa que el medio no resultó tóxico para las enzimas. Esto se justifica por las bajas concentraciones de compuestos inhibidores en el medio (Tabla 1, Artículo 3)



4.3 ETANOL DE CELULOSA

Tras la etapa de pretratamiento, y una vez determinadas las condiciones óptimas para cada uno de ellos, se ensayaron dos configuraciones de hidrólisis y fermentación diferentes, una secuencial (hidrólisis y fermentación secuencial, HFS) y otra simultánea (sacarificación y fermentación simultáneas, SFS) para la conversión a etanol de la celulosa presente en las fracciones sólidas resultantes del pretratamiento. En ambas configuraciones, el microorganismo fermentativo empleado fue *Sacharomyces cerevisiae* cepa “Ethanol Red”.

A modo de resumen, la Tabla 9 muestra los resultados de producción de etanol obtenidos mediante las diferentes configuraciones de proceso ensayadas en cada caso con el bagazo pretratado.



Tabla 9: Resultados de las configuraciones de proceso llevadas a cabo para la obtención de bioetanol a partir del bagazo pretratado en condiciones óptimas

Pretratamiento	Proceso	Carga sustrato (%)	C _E (g/L)	R _E (%)	P (g /L/h)	
Ácido fosfórico	HFS	5	7,3	37,5	0,305	
		10	15,1	38,7	0,629	
		15	22,6	38,6	0,940	
	SFS	5	7,2	36,9	0,285	
		10	14,6	37,5	0,544	
		15	18,5	31,7	0,595	
		SFS con xilanasas	5	7,3	39,8	0,268
			10	14,6	38,7	0,558
			15	18,5	37,6	0,829
Ácido sulfúrico	SFS	5	5,7	36,8	0,237	
		15	15,9	34,0	0,662	
		20	21,1	33,9	0,879	
		25	26,7	34,4	1,112	

C_E: Concentración de etanol (g/L); R_E: Rendimiento en etanol (g etanol/100 g glucosa consumida); P: Productividad determinada a 24 h (g/L/h)

Para el bagazo pretratado con ácido fosfórico, se evaluaron las dos configuraciones de proceso (HFS y SFS) con cargas de sólidos del 5, 15 y 20 % (p/v). También se evaluó el empleo de xilanasas en la configuración simultánea. Comparando las tres configuraciones de proceso estudiadas, los mejores resultados se obtuvieron con el proceso secuencial, con una mayor



producción de etanol, así como rendimiento y productividad. Sin embargo, esta configuración requirió tiempos de proceso más largos para lograr producciones máximas de etanol, 96 h (72 h de hidrólisis más 24 h de fermentación), frente a las 30 h empleadas en el proceso simultáneo con xilanasas. No obstante, la mayor productividad en etanol se alcanzó en el proceso secuencial al 15 % de sólidos, 0,940 g/L/h.

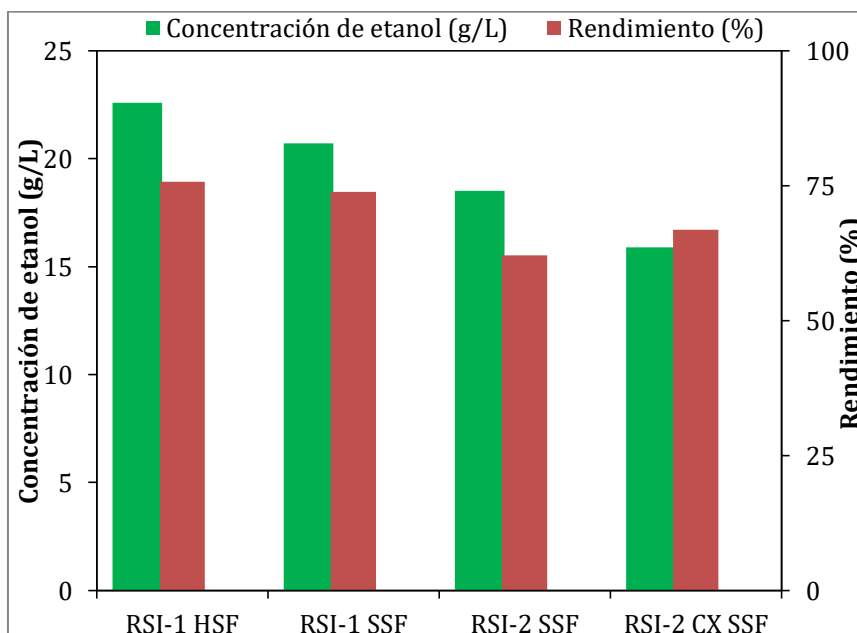
Como se muestra en la Tabla 9, el empleo de xilanasas supuso una mejora significativa en el rendimiento en etanol cuando el proceso se realizó con la mayor carga de sustrato, 15 %, con un incremento del 11 %, además de acortar el tiempo de proceso, mejorando considerablemente su productividad (0,595 g/L/h *versus* 0,829 g/L/h).

La producción de etanol a partir del bagazo pretratado con ácido sulfúrico en condiciones óptimas, solo se evaluó mediante un proceso simultáneo. Como era esperable, el aumento de la concentración de sustrato dio lugar a disoluciones etánolicas más concentradas, alcanzando un valor máximo de 27 g/L de etanol cuando el proceso de SSF se realizó con un 25 % de sólidos (Tabla 9). Aunque, en general, el rendimiento en etanol suele caer al incrementar la carga de sólidos, en este caso, no se produjo un descenso importante. A modo de ejemplo, en la SSF realizada al 5% de sólido pretratado con ácido sulfúrico, el rendimiento fue de 0,37 g etanol/g glucosa (72 % del rendimiento teórico) frente a 0,34 g/g al 25 % sólidos (68% del rendimiento teórico). Este hecho puede considerarse muy ventajoso porque, además de conseguir altos rendimientos, también se requiere producir disoluciones etánolicas muy concentradas, para mejorar la viabilidad del proceso.

La Figura 25 muestra las concentraciones y rendimientos en etanol obtenidos, a partir de bagazo pretratado con ácido fosfórico y sulfúrico, en



condiciones óptimas, mediante diferentes configuraciones de hidrólisis y fermentación al 15% de sólidos. Como puede apreciarse, el bagazo pretratado con ácido fosfórico permitió alcanzar concentraciones y rendimientos superiores en etanol mediante una configuración secuencial de proceso (HSF) con igual carga de sólidos, 15 % (p/v). No obstante, el empleo de xilanasas en la SSF del bagazo pretratado con ácido sulfúrico permitió alcanzar un rendimiento en etanol muy similar, aunque con una menor producción.



RSI-1: bagazo pretratado con ácido fosfórico; RSI-2: bagazo pretratado con ácido sulfúrico; HFS: Hidrólisis y fermentación secuencial; SSF: Sacarificación y fermentación simultánea; SSF-xil: Sacarificación y fermentación simultánea con xilanasas.

Figura 25: Concentraciones de etanol y rendimientos (referidos al teórico, 0,51 g etanol/g glucosa) para las configuraciones de proceso ensayadas con 15 % de carga de sustrato.

Los sólidos resultantes del proceso de SSF se caracterizaron para determinar su contenido residual en celulosa, que oscilaba entre un 10 %,



cuando la SSF se realizó con 5 % de sólidos y un 13%, con 25 % de sólidos. Sin embargo, el contenido residual de celulosa fue menor en los sólidos pretratados con ácido fosfórico resultantes del proceso de SSF, el contenido en celulosa fluctuó entre 4 % y 11 % cuando la SSF se realizó con 5 % y 15 % de sólidos, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con la caída en los rendimientos de etanol al aumentar la concentración de sustrato y pone de manifiesto que las enzimas no fueron capaces de hidrolizar toda la celulosa ya que las altas concentraciones de sólidos en el medio dificultan las interacciones enzima-sustrato necesarias para una hidrólisis eficiente (Koppram et al., 2014).



4.4 FERMENTACIÓN DE LICORES DE PRETRATAMIENTO

Los azúcares solubilizados durante el pretratamiento, principalmente azúcares hemicelulósicos y glucosa procedente de la fracción de almidón, se fermentaron con *Escherichia coli* SL100 (Artículo 1 y 3) y con *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 (Artículo 3).

Debido a las bajas concentraciones de compuestos inhibidores presentes en ambos prehidrolizados, estos resultaron fermentables sin ser previamente detoxificados. En la Tabla 10 se recoge un resumen de los principales resultados obtenidos para las distintas fermentaciones llevadas a cabo.



Tabla 10: Principales resultados de la fermentación de prehidrolizados de bagazo.

	Cazúcar (g/L)	Cetanol (g/L)	t (h)	¹ R _{EtOH} (g/g)	P (g/L/h)
Licores de pretratamiento	<i>E. coli</i> SL 100				
L1	40,2	16	55	0,40 (78 %)	0,290 (55 h)
L2	43,4	17	41	0,38 (76 %)	0,414 (41 h)
	<i>S. stipitis</i> CBS 6054				
L2	43,4	11,4	41	0,27 (53 %)	0,278 (41 h)

L1: licor del pretratamiento de ácido fosfórico.

L2: licor del pretratamiento de ácido sulfúrico.

¹Rendimiento en etanol expresado como g etanol/g azúcar consumido. Los datos entre paréntesis se refieren al rendimiento en etanol expresado como porcentaje respecto al máximo teórico (0,51 g etanol/g azúcar).

P: productividad en etanol determinada en cada caso al tiempo que se indica entre paréntesis.

El licor del pretratamiento con ácido fosfórico, se fermentó con *E. coli* SL100, con un consumo prácticamente completo de azúcares a las 55 h y una producción máxima de etanol de 16 g/L, lo que corresponde a un rendimiento del 78 % (Tabla 10). La glucosa se consumió a las 7 h, mientras que el resto de azúcares se asimilaron de manera más gradual (Figura 3, Artículo 1).

Si comparamos la fermentación de ambos licores (fosfórico y sulfúrico), en términos de concentración y rendimiento son relativamente similares (16 g/L versus 17 g/L) y (78 % versus 76 %) respectivamente. Sin embargo, la productividad es menor en la fermentación del licor del pretratamiento con ácido fosfórico, puesto que requirió 14 h más para consumir por completo los azúcares presentes en el medio.



Al comparar la fermentación del licor de sulfúrico (L2) con *E. coli* y *S. stipitis*, se puede apreciar que *E. coli* asimiló la glucosa más rápido que *S. stipitis*, 8 h frente a 30 h, (Figuras 4a-4b, Artículo 3). Sin embargo, a diferencia de *S. stipitis* con un consumo secuencial de azúcares, *E. coli* comenzó a asimilar todos los azúcares simultáneamente desde el principio. *E. coli* alcanzó una mayor producción de etanol, 17 g/L a las 41 h, lo que corresponde a un 76 % del rendimiento teórico de etanol, mientras que la concentración máxima de etanol obtenida por *S. stipitis* fue de 11,4 g/L (53 % de rendimiento en etanol) al mismo tiempo de fermentación. Además, la productividad de etanol lograda por *E. coli* a las 41 h también fue mayor, 0,414 g/L/h versus 0,278 g/L/h.



4.5 FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE SLURRIES

Además de los prehidrolizados, también se fermentaron con *Escherichia coli* SL100 (Artículo 4) los hidrolizados resultantes de la hidrólisis enzimática de los *slurries* de pretratamiento, tras una etapa de concentración realizada a fin de disponer de una única disolución de azúcares con una mayor concentración inicial. Estos hidrolizados enzimáticos contienen azúcares hemicelulósicos y glucosa de almidón (solubilizados durante el pretratamiento) junto con la glucosa generada en la hidrólisis enzimática de la celulosa.

Como ya se ha indicado anteriormente, a fin de obtener soluciones de azúcar altamente concentradas y lograr así una concentración mínima de bioetanol del 4 % p/v (Alvira et al., 2011), ambos hidrolizados (del pretratamiento con ácido fosfórico, HE-1 y con ácido sulfúrico, HE-2) se concentraron por evaporación en torno a 1,5 veces, dando como resultado hidrolizados con 103 g/L (HE-1C) y 93 g/L (HE-2C), respectivamente. Además de concentrar, la evaporación consiguió eliminar de los hidrolizados el furfural por completo y más del 30 % del ácido acético. Sin embargo, la concentración



de compuestos fenólicos aumentó un 40 % en ambos hidrolizados, alcanzando valores de 3,54 g/L (HE-1C) y 2,55 g/L (HE-2C) (Tabla 1, Artículo 4).

Una vez concentrados, los hidrolizados se detoxificaron con carbón activo con el objetivo principal de reducir su concentración en compuestos fenólicos. Este tratamiento permitió reducir los niveles de fenoles de forma considerable, eliminando más del 80 % de sus concentraciones iniciales (Tabla 1, Artículo 4). La Tabla 1 recoge los resultados de co-fermentación para estos hidrolizados concentrados, antes y después de la detoxificación con carbón activo, con la bacteria *E. coli*.



Tabla 11: Principales resultados de la fermentación de hidrolizados obtenidos tras la hidrólisis enzimática del slurry del bagazo

	C _{azúcar} inicial (g/L)	C _{etanol} (g/L)	Azúcar sin consumir (%)	R _{EtOH} (g/g)	t (h)	P (g/L/h)
Monocultivo de <i>E.coli</i> SL100						
Hidrolizado enzimático del slurry						
HE-1C	103,2	38,6	9,5	0,41 (81%)	100	0,62 (56 h)
HE-1C detox. con carbón activo	104	36,7	10,3	0,39 (76%)	100	0,53 (56 h)
HE-2C	92,5	37,6	8,5	0,44 (86%)	91	0,58 (48 h)
HE-2C detox. con carbón activo	95,7	37,2	6,7	0,43 (84%)	68	0,73 (44 h)
Co-cultivo de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. stipitis</i>						
HE-1C detox. con resina	94,3	22,2	11,5	0,30 (58%)	48	0,96 (20 h)
HE-2C detox. con resina	76,8	21,3	0	0,31 (61%)	48	1,02 (20 h)

HE-1C: Hidrolizado enzimático del *slurry* de ácido fosfórico concentrado.

HE-2C: Hidrolizado enzimático del *slurry* de ácido sulfúrico concentrado.

R_{EtOH}: Rendimiento en etanol expresado como g etanol/g azúcar consumido. Los datos entre paréntesis corresponden a rendimientos, en porcentaje, referidos al máximo teórico (0,51g etanol/g azúcar).

P: productividad en etanol determinada al tiempo indicado entre paréntesis.

En la fermentación de los hidrolizados de ácido sulfúrico, el consumo de glucosa fue más rápido una vez detoxificado, 30 h frente a 48 h. Además, la velocidad de consumo de glucosa fue mayor en estos hidrolizados en comparación con la fermentación de los hidrolizados de ácido fosfórico, que tardó menos de 56 h en consumirse en ambos hidrolizados, detoxificado y sin detoxificar (Figura 3a-3b, Figura 4a-4b, Artículo 4).



Cabe mencionar que en todas las fermentaciones realizadas se observó que *E. coli* no consiguió asimilar todos los azúcares presentes en los hidrolizados. Así, después de 100 h de fermentación, en torno al 10 % de azúcares quedaron sin consumir en la fermentación de los hidrolizados de ácido fosfórico. Sin embargo, en la fermentación del hidrolizado con ácido sulfúrico sin detoxificar el consumo de azúcares hemicelulósicos fue más completo, quedando en el medio un 6,7 % de los azúcares iniciales después de 100 h de fermentación. Realmente, la detoxificación sólo supuso una mejora en la fermentación del hidrolizado de ácido sulfúrico. Así, aunque se obtuvo prácticamente la misma concentración de etanol en la fermentación del hidrolizado con y sin detoxificación, la fermentación del hidrolizado detoxificado con carbón activo requirió menor tiempo, 68 h frente a 91 h para alcanzar prácticamente la misma concentración de etanol (Figuras 3a-3b, Artículo 4), con una productividad de 0,73 g/L/h frente a 0,58 g/L/h para el hidrolizado sin detoxificar.

En definitiva, el rendimiento de fermentación y la concentración de etanol alcanzada en los hidrolizados procedentes del pretratamiento con los ácidos fosfórico y sulfúrico fueron muy similares. Sin embargo, se alcanzaron valores más altos de productividad de etanol en el caso de los hidrolizados de ácido sulfúrico lo que puede estar relacionado con una menor concentración inicial de azúcar. Como se mencionó anteriormente, la concentración inicial de azúcares presentes en los hidrolizados de ácido fosfórico fue superior a 100 g/L y la relación glucosa/xilosa fue de 1,84. Por consiguiente, la utilización de xilosa por *E. coli* pudo verse obstaculizada debido a la presencia de altas concentraciones iniciales de xilosa (Romero-García et al., 2016) y altas proporciones de glucosa/xilosa en el cultivo (Nieves et al., 2011b).



En el artículo 4, se estudia la co-fermentación de estos hidrolizados enzimáticos de bagazo de cerveza empleando un co-cultivo de dos levaduras, *S. cerevisiae* “Ethanol Red” y *S. stipitis* CBS 6054.

Previamente, los hidrolizados fueron detoxificados con resina de intercambio iónico. Cabe mencionar que la velocidad de consumo de glucosa fue mayor en la fermentación del hidrolizado de ácido fosfórico, 2,5 g/L/h *versus* 1,56 g/L/h a las 20 h de proceso (Figuras 4a-4b, Artículo 4). En el caso de los azúcares, xilosa, galactosa y manosa (XGM), su consumo comienza desde el principio en ambas fermentaciones, aunque con menor velocidad en el hidrolizado de ácido fosfórico (0,33 g/L/h frente a 0,42 g/L/h). Además, 18 % de los azúcares XGM permanecieron en el medio después de 72 h de fermentación en el medio de ácido sulfúrico. Y en este medio, la arabinosa se agotó mientras que en el medio de ácido fosfórico quedó casi un 44 % sin ser asimilada por *S. stipitis*.

En lo que respecta a la concentración de etanol, la más alta fue alcanzada con el hidrolizado de ácido fosfórico (22,2 g/L *versus* 21,3 g/L a las 48 h), aunque el rendimiento fue menor (58 % frente a 61 %). Esta caída en el rendimiento puede ser debida a que el consumo de azúcares no se dirigió a la producción de etanol sino a la supervivencia y crecimiento del microorganismo. No obstante, la productividad máxima en etanol fue ligeramente superior en la fermentación del hidrolizado de ácido sulfúrico (1,02 g/L/h frente a 0,96 g/L/h a las 20 h).



Si comparamos las dos estrategias usadas para la co-fermentación de hexosas y pentosas, se puede apreciar que los mejores resultados de fermentación se han obtenido con el empleo de *E. coli*, que alcanzó una concentración de etanol superior a 38 g/L, frente a los 22,2 g/L obtenidos con el co-cultivo de *S. cerevisiae* y *S. stipitis* y un rendimiento superior al 81 % frente a 58 % del co-cultivo.



4.6 RENDIMIENTO GLOBAL EN ETANOL

En la Tabla 12 se recogen los rendimientos globales en etanol (expresados como gramos de etanol producidos a partir de 100 g de bagazo original) para varias de las configuraciones de proceso llevadas a cabo en esta Tesis Doctoral. Entre paréntesis se indican los tiempos de sacarificación y fermentación requeridos en cada caso para alcanzar esa producción de etanol.

Se puede observar que el mayor rendimiento global se alcanzó al pretratar el bagazo con ácido sulfúrico, en condiciones óptimas, seguido de la hidrólisis enzimática del slurry y la fermentación del hidrolizado resultante con *E. coli*. Con esta configuración se obtuvieron 19,3 g de etanol/100 g de bagazo, lo que quiere decir que el 74 % de los azúcares del bagazo se convirtieron en etanol.



No obstante, el resto de configuraciones ensayadas dieron lugar a resultados de producción de etanol muy similares aunque con diferentes tiempos de proceso. Por ello, resulta de gran interés utilizar la configuración de proceso basada en la hidrólisis enzimática del *slurry* seguida de la fermentación con *E. coli* ya que, de esta forma, se evita la etapa de filtración y además se favorece la etapa última de destilación al conseguir disoluciones más concentradas en etanol.

Tabla 12: Rendimientos globales en etanol respecto a la materia prima (g etanol/100 g bagazo original).

	Etanol a partir del RSI	Etanol del prehidrolizado	Rendimiento global en etanol
<i>SSF del RSI y fermentación del prehidrolizado con E. coli</i>			
RSI-1, L1	5,0 (72 h)	12,8 (55 h)	17,8 (127 h)
RSI-2, L2	4,6 (72 h)	13,5 (41 h)	18,1 (113 h)
<i>Hidrólisis del slurry y fermentación del hidrolizado con E. coli</i>			
HE-1C	-	-	17,5 (124 h)
HE-1C detox. con carbón activo	-	-	15,2 (124 h)
HE-2C	-	-	19,3 (112 h)
HE-2C detox. con carbón activo	-	-	17,9 (112 h)

RSI-1: Residuo sólido insoluble del pretratamiento con ácido fosfórico

RSI-2: Residuo sólido insoluble del pretratamiento con ácido sulfúrico.

L1: Licor del pretratamiento con ácido fosfórico.

L2: Licor del pretratamiento con ácido sulfúrico.

HE-1C: Hidrolizado enzimático del *slurry* de ácido fosfórico concentrado.

HE-2C: Hidrolizado enzimático del *slurry* de ácido sulfúrico concentrado.

SSF: Sacarificación y fermentación simultánea.

En la fermentación de los hidrolizados enzimáticos de ácido sulfúrico, aunque la detoxificación con carbón activo supuso un menor tiempo de fermentación (68 h frente a 91 h), la producción global en etanol, expresada como g etanol/100 g bagazo, fue superior en el caso del hidrolizado sin



detoxificar (19,3 frente a 17,9). Esto es debido a las pérdidas de azúcares que tuvieron lugar en el tratamiento del hidrolizado con carbón activo.

A modo de ejemplo, se muestran los balances de materia de la configuración de proceso basada en la hidrólisis enzimática de los *slurries* resultantes del pretratamiento, en condiciones óptimas, con ácido fosfórico sin detoxificación (Figura 25) y con ácido sulfúrico, tras detoxificación con carbón activo (Figura 26).

El balance de materia correspondiente a la Figura 25 muestra el proceso para la producción de etanol a partir de un pretratamiento del bagazo con ácido fosfórico al 2% a 155 °C seguido de la hidrólisis enzimática del *slurry* resultante durante 24 h. Estas dos etapas del proceso, el pretratamiento y la hidrólisis, consiguieron recuperar el 92% de los azúcares del bagazo original. Seguidamente, el hidrolizado resultante se separó del sólido residual y se concentró para obtener una concentración total de azúcar superior a 90 g/L y a continuación, se fermentó con *E. coli* SL100 durante 100 h. La co-fermentación de esta disolución azucarada con mezcla de hexosas y pentosas rindió 17,5 g de etanol a partir de 100 g de bagazo, lo que significa que, con esta configuración de proceso, a partir de una tonelada de bagazo se pueden obtener 222 L de etanol sin necesidad de detoxificación.

El otro balance de materia (Figura 26) incluye el pretratamiento del bagazo con ácido sulfúrico al 1% a 130 °C durante 26 min, seguido de la hidrólisis enzimática de la suspensión entera durante 12 h, con una recuperación de casi el 94% de los azúcares iniciales. El hidrolizado enzimático, después de concentrarse hasta 93 g/L, se sometió a una detoxificación con carbón activo y se fermentó con *E. coli* SL100 durante 102 h dando como resultado 17,9 g de etanol por 100 g de bagazo, que equivale a



227 L de etanol por tonelada de bagazo. No obstante, la configuración de proceso sin detoxificación dio lugar a la mayor producción de etanol obtenida en esta Tesis Doctoral, 19,3 g de etanol por 100 g de bagazo, lo que significa que a partir de una tonelada de bagazo de cerveza se podrían obtener 245 L etanol.

Finalmente, para determinar qué configuración de proceso resulta más interesante para la producción comercial de etanol a partir de bagazo de cerveza, sería necesaria la realización de un análisis tecnoeconómico y ambiental que evalúe también cuál sería el pretratamiento ácido más adecuado para esta biomasa.

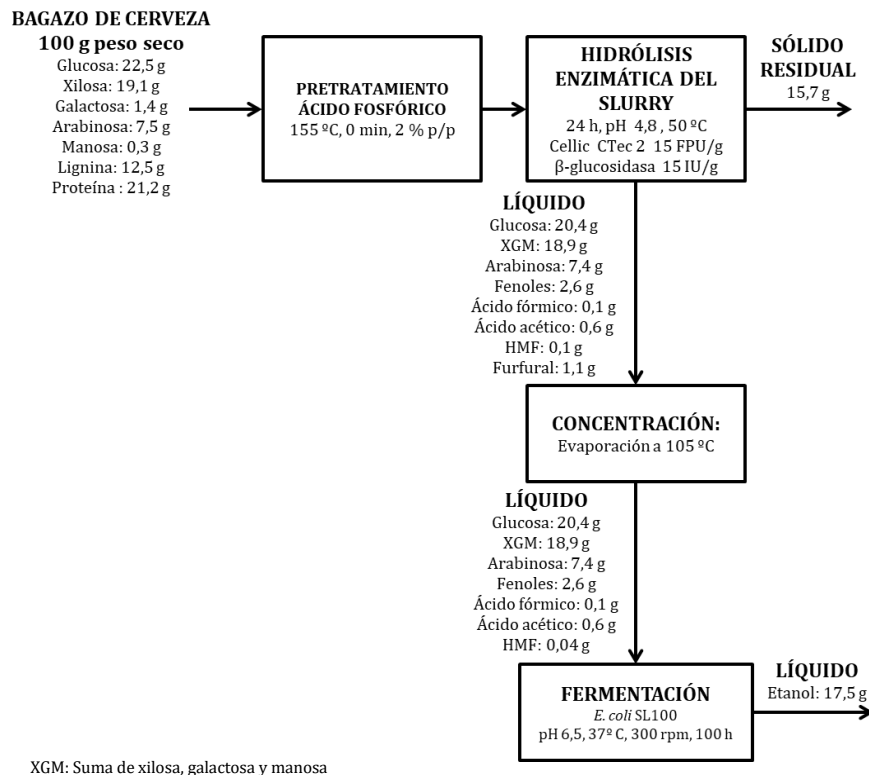


Figura 26: Balance de materia de la configuración de proceso basada en la hidrólisis enzimática del *slurry* resultante del pretratamiento del bagazo con ácido fosfórico en condiciones óptimas.

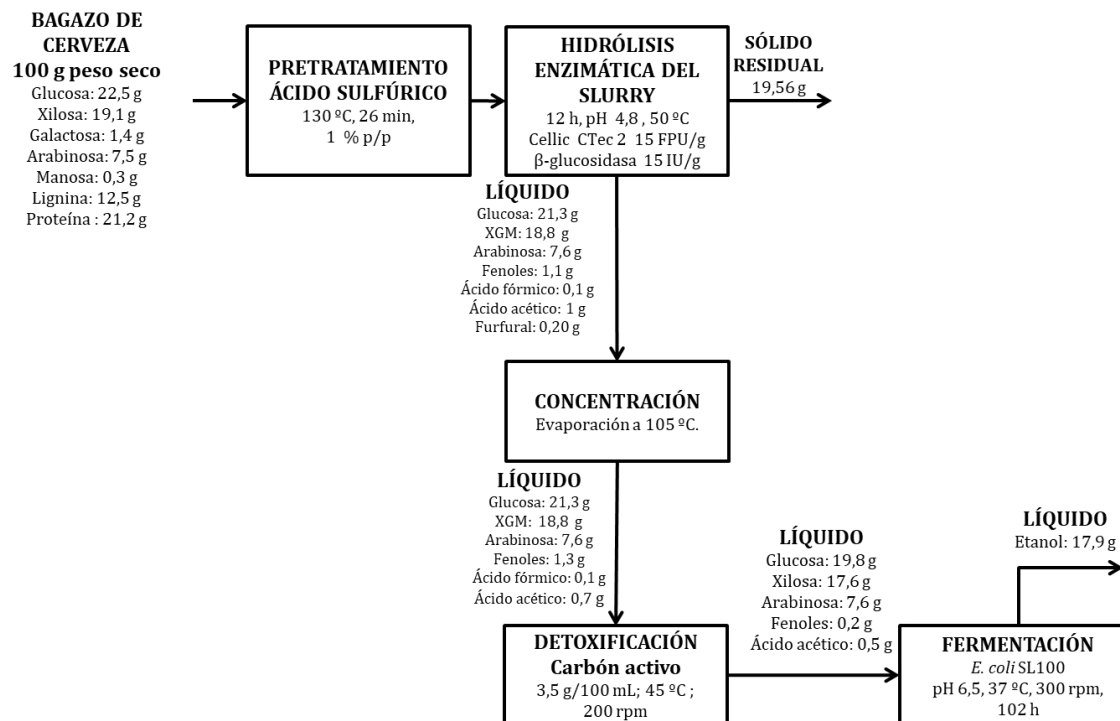


Figura 27: Balance de materia de la configuración basada en la hidrólisis enzimática del *slurry* resultante del pretratamiento del bagazo con ácido sulfúrico en condiciones óptimas, incluyendo detoxificación del hidrolizado con carbón activo.



5. CONCLUSIONES



Como resultado del trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral, se puede concluir que:

1. El bagazo de cerveza resulta una materia prima con potencial para la obtención de etanol a partir de sus fracciones de celulosa, hemicelulosa y almidón.
2. Los pretratamientos con ácido fosfórico y sulfúrico resultan adecuados para el fraccionamiento del bagazo, hidrolizando la fracción de hemicelulosa, con un alto grado de recuperación de azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado. Así, en las condiciones optimizadas para cada pretratamiento: 155°C, 2% H₃PO₄ y 130°C, 1% H₂SO₄, 26 min, se recuperaron 80% y 97% azúcares en forma de monómeros, respectivamente.
3. La conversión a etanol de la celulosa del bagazo pretratado con ácido fosfórico, en condiciones óptimas, alcanza un rendimiento en etanol del 76% (referido al teórico) mediante una configuración de hidrólisis enzimática y fermentación secuencial, con una carga de sólidos del 15%, frente al 62% del proceso simultáneo, aunque con 24 h más de proceso.
4. El empleo de xilanasas en esa configuración simultánea de proceso, al 15% de sustrato, mejora la producción de etanol, incrementando el rendimiento un 12 %, y también la productividad, 0,595 g/L/h *versus* 0,829 g/L/h.
5. La estrategia que incluye la hidrólisis enzimática de los *slurries* de pretratamiento es una opción interesante para esta materia prima ya que además de lograr la conversión completa de la celulosa en menos de 24 h, rinde disoluciones azucaradas más concentradas al incluir la glucosa de las fracciones de celulosa y almidón junto con los azúcares



- hemicelulósicos. Esto permite la conversión a etanol de todos los azúcares del bagazo en una única etapa de fermentación.
6. Tanto los licores de pretratamiento como los hidrolizados de la sacarificación enzimática de los slurries ácidos del bagazo resultan fermentables sin detoxificación previa.
 7. *Escherichia coli* SL100 es capaz de fermentar las mezclas de hexosas y pentosas presentes en los prehidrolizados del bagazo, alcanzando un rendimiento máximo de conversión a etanol del 78 %, respecto del teórico, en un tiempo inferior a 60 h.
 8. En la co-fermentación de los hidrolizados enzimáticos de los slurries, *E. coli* rinde mejores resultados que el co-cultivo de *S. cerevisiae* y *S. stipitis*, con rendimientos máximos en etanol de 86% y 61%, respectivamente. De igual forma, *E. coli* resultó más eficiente que *S. stipitis* en la co-fermentación de los prehidrolizados de ácido sulfúrico.
 9. La configuración de proceso que incluye el pretratamiento del bagazo de cerveza con ácido sulfúrico, en condiciones óptimas, seguido de la hidrólisis del slurry y posterior fermentación del hidrolizado con *E. coli*, dio lugar al mayor rendimiento global en etanol, 19,3 g etanol/100 g de bagazo, que equivale a 245 L de etanol a partir de 1 tonelada de bagazo.
 10. El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en la producción de etanol a partir de las fracciones azucaradas (celulosa, hemicelulosa y almidón) del bagazo de cerveza; el aprovechamiento integral de este residuo agroindustrial incluiría también la valorización de la fracción de proteína así como la lignina presente en los sólidos resultantes de la hidrólisis enzimática. Todos estos procesos podrían integrarse en una biorrefinería basada en esta materia prima.



6. BIBLIOGRAFÍA



Adeniran H.A., Abiose S.H., Ogunsua A.O. (2008). Production of fungal β -amylase and amyloglucosidase on some Nigerian agricultural residues. *Food Bioprocess Technol* 3, 693-698.

Aditiya H.B., Mahlia T.M.I., Chong W.T., Nur H., Sebayang A.H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review, *Renewable y Sustainable Energy Reviews* 66, 631-653.

Aliyu S., Bala M. (2011). Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *Afr J Biotechnol* 20, 324-331.

Almeida J.R.M., Modig T., Petersson A., Hähn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 82 (4), 340-349.

Alvira P., Negro M.J., Ballesteros M. (2011). Effect of endoxylanase and α -l-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresour Technol* 102 (6), 4552-4558.

Alvira P., Tomas-Pejo E.F., Ballesteros M. Fau, Negro M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol* 101(13), 4851-4861.

Ammons M.C.B., Ward L.S., Dowd S., James G.A. (2011). Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with lactoferrin and xylitol inhibits the ability of bacteria to respond to damage resulting from lactoferrin iron chelation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37, 316-323.

Axe D.D., Bailey J.E. (1995). Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol* 47(1), 8-19.



Balat M., Balat H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy*. 86, 2273-2282.

Bartolomè B., Faulds C., Sancho A. (2002). Mono- and dimeric ferulic acid release from brewers spent grain by fungal feruloyl esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 489-493.

Behera S., Arora R., Nyhagopal N., Kumar S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 36, 91-106.

Beldman G., Hennekam J., Voragen A.G.J. (1987). Enzymatic hydrolysis of beer brewers' spent grain and the influence of pretreatments. *Bioresour Technol* 30 (5), 668-671.

Bernardin J.F.E. (1985). Experimental design and testing of adsorption and adsorbates. *Adsorption technology: a step-by-step approach to process evaluation and application*. *Bioresour Technol* 2, 37-90.

Bhaskar T., Bhavya B., Singh R., Naik D.V., Kumar A., Goyal H.B., (2011). Thermochemical conversion of biomass to biofuels. , 51-77.

Bibi R., Ahmad Z., Imran M., Hussai S., Ditta A., Mahmood S., Khalid A. (2017). Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development. *Bioresour Technol* 71, 976-985.

Binod P., Janu K.U., Sindhu R., Pyey A. (2011). Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Biofuels: Alternative feedstocks y conversion processes* 10, 229-250.

Brewers of Europe (2016). *Beer statistics 2016 edition*.



Brown N.A., De Castro P. F., Pimentel Figueiredo B.F., Savoldi M. F., Buckeridge Marcos S. (2013). Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. *FEMS yeast research* 13, 277-290.

Brown R.M. (2003). Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 2nd century? *J Polym Sci Pol Chem.* 42, 487-495.

Buranov A.U., Mazza G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 28 (3), 237-259.

Can Şener ŞE., Sharp J.L., Anctil A. (2018). Factors impacting diverging paths of renewable energy: A review, *Renewable y Sustainable Energy Reviews* 81, 2335-2342.

Canilha L., Carvalho W., Felipe M.G.A., Silva J.B.A. (2008). Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. *Brazilian J Microbiol* 39, 333-336.

Cara C., Ruiz E., Ballesteros M., Manzanares P., Negro M.J., Castro E. (2008). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel* 87 (6), 692-700.

Carvalho F., Duarte L.C., Lopes S., Parajó J.C., Pereira H., Girio F.M. (2006). Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33, 646-654.

Carvalho F., Duarte L.C., Lopes S., Parajó J.C., Pereira H., Gírio F.M. (2005). Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for



xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Process. Biochem.* 40, 1215-1223.

Carvalho F., Esteves M.P., Parajó J.C., Pereira H., Gírio F.M. (2004). Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresour Technol* 91, 93-100.

Čater M., Fanel L., Malovrh Š, Marinšek Logar, R. (2015). Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria, *Bioresour. Technol.* 186, 261-269.

K. Maniatis, I. Lyäl, L. Waldheim, E. Van den Heuvel y S. Kalligeros. Comisión Europea (2017). Final Report. Building up the future. Sub Group on Advanced Biofuels. Sustainable Transport.

Chyel A.K., Singh O.V., Chyrasekhar G., Rao L.V., Narasu M.L. (2010). Key-drivers influencing the commercialization of ethanol based biorefineries. *J Comm Biotechnol.* 16, 239-257.

Chen Y., Xiong C. (2016). Adsorptive removal of As(III) ions from water using spent grain modified by polyacrylamide. *Journal of Environmental Sciences.* 45, 124-130.

Cheng G., Varanasi P., Li C., Liu H., Melnichenko Y.B., Simmons B.A., Kent M.S., Singh S. (2011). Transition of cellulose crystalline structure and surface morphology of biomass as a function of ionic liquid pretreatment and its relation to enzymatic hydrolysis. *Biomacromolecules.* 12 (4), 933-941.

Chiang P., Chang P., You J. (1992). Innovative technology for controlling VOC emissions. *Bioresour Technol* 31, 19-28.



Chovau S., Degrauwe D., Van der Bruggen B. (2013). Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 26, 307-321.

Cruz J.M., Domínguez J.M., Domínguez H., Parajó J.C. (2000). Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. *Bioresour Technol* 14 (1-2), 79-97.

Dagnino E.P., Chamorro E.R., Romano S.D., Felissia F.E., Area M.C., (2013). Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Industrial Crops y Products* 42, 363-368.

Danhauer J.L., Kelly A., Johnson C.E. (2011). Is mother-child transmission a possible vehicle for xylitol prophylaxis in acute otitis media 50, 661-672.

DeSong T., YingJuan T., YuanZhe H., Lin L., SongQing H., Bing L. (2010). Optimisation of ultrasonic-assisted protein extraction from Brewer's spent grain. *Bioresour Technol* 28 (1), 9-17.

Díaz-Blanco D.I., de La Cruz J.R., López-Linares J.C., Morales-Martínez T.K., Ruiz E., Rios-González L.J., Romero I., Castro E. (2018). Optimization of dilute acid pretreatment of Agave lechuguilla and ethanol production by co-fermentation with *Escherichia coli* MM160. *Ind Crops Prod* 114, 154-163.

Directiva 2003/30/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de mayo de 2003, relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 17.5.2003.

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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 5.6.2009.



Edelstein S., Smith K., Worthington A., Gillis N., Bruen D., Kang S.H., Gilpin K., Ackerman J., Guiducci G. (2008). Comparisons of six new artificial sweetener gradation ratios with sucrose in conventional-method cupcakes resulting in best percentage substitution ratios. *Bioresour Technol* 61, 61–74.

EPA 2016. Global Greenhouse Gas Emissions Data. (2016). Disponible en <<https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data>>. Acceso en 30/04/2019.

Ezeonu F.C., Okaka A.N.C. (1996). Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG). *Process Biochemistry* 31, 7-12.

FAOSTAT (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics. Acceso en 18/11/2019.

Fau W.Y., Fau P.J., Van Eys J. (1971). The potential use of xylitol in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency anemia. *The Journal of clinical investigation* 50 (7), 1421–1428.

Fengel D., Wegener G. (1983). Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition* 23, 601-602.

Fiaux J., Çakar Z.P., Sonderegger M., Wüthrich K., Szyperski T., Sauer U. (2003). Metabolic-flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *S. stipitis*. *Eukaryotic Cell*, 2(1), 170-180.

Figuroa-González I., Quijano G., Gerardo G., Ramírez Cruz-Guerrero A. (2011). Probiotics and prebiotics—Perspectives and challenges. *Journal of the science of food y agriculture* 9, 1341-1348.



Fonseca G.G., De Carvalho N., Gombert A.K. (2013). Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Bioresour. Technol* 97, 5055-5067.

Geddes C.C., Peterson J.J., Roslyer C., Zacchi G., Mullinnix M.T., Shanmugam K.T., Ingram L.O. (2010). Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresour Technol* 101(6), 1851-1857.

Geddes C.C., Mullinix M.T., Nieves I.U., Hoffman R.W., Sagues W.J., York S.W., Shanmugam K.T., Erickson J.E., Vermerris W.E., Ingram, L.O. (2013). Seed train development for the fermentation of bagasse from sweet sorghum and sugarcane using a simplified fermentation process. *Bioresour Technol* 128, 716-724.

Geddes C.C., Mullinix M.T., Nieves I.U., Peterson J.J., Hoffman R.W., York S.W., Yomano L.P., Miller E.N., Shanmugam K.T., Ingram L.O., (2011). Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160. *Bioresour Technol* 102, 2702-2711.

Gírio F.M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L.C., Marques S., Bogel-Lukasik R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol* 101, 4775-4800.

Gomez L.D., Steele-King C.G., McQueen-Mason S.J. (2008). Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytol* 178(3), 473-485.

Gullón B., Gullón P., Tavaría F., Pintado M., Gomes A.M., Alonso J.L., Parajó J.C. (2014). Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinoxylooligosaccharides from wheat bran. *Journal of Functional Foods* 6, 438-449.



Gupta A., Verma J.P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review, *Bioresour Technol* 41, 550-567.

Gupta R., Hemansi Gautam, S. Shukla, R. Kuhad R.C. (2017). Study of charcoal detoxification of acid hydrolysate from corncob and its fermentation to xylitol. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5, 4573-4582.

Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Lidén G., Zacchi G. (2006). Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Bioresour Technol* 24, 549-556.

Hamelinck C.N., Hooijdonk G.V., Faaij A.P. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term. *Bioresour Technol* 28 (4), 384-410.

Harris D., DeBolt S. (2010). Synthesis, regulation and utilization of lignocellulosic biomass. *Plant Biotechnol J* 8(3), 244-262.

Hassona H.Z. (1993). High fibre bread containing brewer's spent grains and its effect on lipid metabolism in rats. *Nahrung* 37 (6), 576-582.

Hodge D.B., Karim M.N., Schell D.J., McMillan J.D. (2009). Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresour Technol* 152, 88-107.

Howard R.L., Abotsi E., Van Rensburg E.L., Howard S. (2003). Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *Bioresour Technol* 2(12), 702-733.

Huang X., Wang Y.M., Liu W., Bao J. (2011). Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresour Technol* 102, 9705–9709.



Huige NJ (1994). Brewery by-products and effluents, in: Hardwick, W.A. (Ed.), Handbook of Brewing. Marcel Dekker, New York, pp. 501-550.

Imazato S., Ikebe K., Nokubi T., Ebisu S., Walls A.W.G. (2006). Prevalence of root caries in a selected population of older adults in Japan. *J Oral Rehabil.* 33 (2), 137-143.

IRENA (2018). Bioenergy for sustainable development. Disponible en: <https://www.irena.org/Statistics/View-Data-by-Topic/Benefits/Employment-Time-Series>. Acceso en: 22/08/2019.

Ishiwaki N., Murayama H., Awayama H., Kanauchi O., Sato T. (2000). Development of high value uses of spent grain by fractionation technology. *Bioresour Technol* 37, 261-265.

Islam M.S. (2011). Effects of xylitol as a sugar substitute on diabetes-related parameters in nondiabetic rats. *Journal of medicinal food* 14, 505-511.

Jahnvi G., Prashanthi G.S., Sravanthi K., Rao L.V. (2017). Status of availability of lignocellulosic feed stocks in India: Biotechnological strategies involved in the production of Bioethanol. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 73, 798-820.

Jambo S.A., Abdulla R., Azhar S.H.M., Marbawi H., Gansau J.A., Ravindra P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 65, 756-769.

Jayant M., Hassan M.A., Srivastava P.P., Meena D.K., Kumar P., Kumar A., Wagde M.S. (2018). Brewer's spent grains as feedstuff for striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* fingerlings: An approach to transform waste into wealth. *Journal of Cleaner Production.* 199, 716-722.



Jeffries T.W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. *Bioresour Technol* 17(3), 320-326.

Jönsson L.J., Alriksson B., Nilvebrant N. (2013). Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* 6 (1), 16.

Kajaste R. (2014). Chemicals from biomass, managing greenhouse gas emissions in biorefinery production chains. *Journal of Cleaner Production* 75, 1-10.

Karagoz P., Bill R.M., Ozkan M. (2019). Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. *Renewable Energy* 143, 741-752.

Keshav P.K., Shaik N., Koti S., Linga V.R. (2016). Bioconversion of alkali delignified cotton stalk using two-stage dilute acid hydrolysis and fermentation of detoxified hydrolysate into ethanol. *Industrial Crops and Products* 91, 323-331.

Kim J.H., Na J., Yang J., Chang Y.K. (2013). Separation of galactose, 5-hydroxymethylfurfural and levulinic acid in acid hydrolysate of agarose by nanofiltration and electrodialysis. *Bioresour Technol* 140, 64-72.

Kim Y., Ximenes E., Mosier N.S., Ladish M.R. (2011). Soluble inhibitors/deactivators of cellulose enzymes from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 48, 408-415.

Kitagawa T., Tokuhiko K., Sugiyama H., Kohda K., Isono N., Hisamitsu M. (2010). Construction of β -glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. *Bioresour Technol* 87, 1841-1853.



Klímek P., Wimmer R., Kumar Mishra P., Kúdela J. (2017). Utilizing brewer's-spent-grain in wood-based particleboard manufacturing, *Bioresour Technol* 141, 812-817.

Klinke H.B., Thomsen A.B., Ahring B.K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 10–26.

Ko J.K., Um Y., Park Y., Seo J.H., Kim K.H. (2015). Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. *Bioresour Technol* 99, 4201-4212.

Koppram R., Tomas-Pejo E., Xiros C., Olsson L. (2014). Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. *Bioresour Technol* 32, 46-53.

Kristensen J.B., Felby C., Jorgensen H. (2009). Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour Technol* 2, 11.

Kuhad R.C., Gupta R., Khasa Y.P., Singh A., Zhang Y.P. (2011). Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15, 4950-4962.

Kunze W. (1996). *Technology Brewing and Malting*. International Edition, VLB, Berlin.

Lan T.Q., Gleisner R., Zhu J.Y., Dien B.S., Hector R.E. (2013). High titer ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine by simultaneous enzymatic saccharification and combined fermentation. *Bioresour Technol* 127, 291–297.

Larsson S. (2000). Ethanol from lignocellulose-fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance. Tesis doctoral. Lund. Suecia.



Laureano-Perez L., Teymouri F.F., Alizadeh H.F., Dale Bruce E. (2005). Underlying factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. *Bioresour Technol* 121, 1081-1099.

Lee S., Choi B., Kim Y. (2012). The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus* mutans in biofilm formation with salivary bacteria. *Archives of Oral Biology* 57, 697-703.

Liobikiene G., Butkus M. (2017). The European Union possibilities to achieve targets of Europe 2020 and Paris agreement climate policy. *Renewable Energy* 106, 298-309.

Lopes M.L., Paulillo S.C.L., Godoy A., Cherubin R.A., Lorenzi M.S., Giometti F.H.C., Bernardino C.D., Neto H.B.A., Amorim, H.V. (2016). Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 64-76.

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.

López-Linares J.C., Romero I., Cara C., Castro E. (2016). Bioconversion of rapeseed straw: enzymatic hydrolysis of whole slurry and cofermentation by an Ethanologenic *Escherichia coli*. *Energy Fuels* 30 (11), 9532-9539.

Lu S., Gibb S.W. (2008). Copper removal from wastewater using spent-grain as biosorbent. *Bioresour Technol* 99, 1509-1517.

Lu Y., Yang B., Gregg D., Saddler J.N., Mansfield S.D. (2002). Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Bioresour Technol* 98 (1), 641-654.



Manochio C., Yrade B.R., Rodriguez R.P., Moraes B.S. (2017). Ethanol from biomass: A comparative overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 80, 743-755.

Manzanares P., Ballesteros I., Negro M.J., González A., Oliva J.M., Ballesteros M. (2020). Processing of extracted olive oil pomace residue by hydrothermal or dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis in a biorefinery context. *Renew Energy* 145, 1235-1245.

Mateo S., Roberto I.C., Sánchez S., Moya A.J. (2013). Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. *Ind Crop Prod* 49, 196– 203.

Mattila P.T., Kangasmaa H., Knuutila M.L.E. (2005). The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption, *Metabolism* 54, 548-551.

Michalena E., Hills J.M. (2012). Renewable energy issues and implementation of European energy policy: The missing generation? *Bioresour Technol* 45, 201-216.

Modenbach A.A., Nokes S.E. (2013). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings. A review. *Biomass and Bioenergy*. 56, 526-544.

Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J Cereal Sci* 43 (1), 1-14.

Mussatto S.I., Fernyes M., Dragone G., Mancilha I., Roberto IC. (2007). Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbruecki*. *Biotechnol Lett* 29(12), 1973-1976



Mussatto S.I., Roberto I.C. (2001). Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Bioresour Technol* 23 (20), 1681-1684.

Mussatto S.I., Fernyes M., Mancilha I.M., Roberto I.C. (2008). Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochem Eng J* 40 (3), 437-444.

Mussatto S.I., Fernyes M., Roberto I.C. (2007). Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor. *Carbohydr Polym* 70 (2), 218-223.

Mussatto S.I., Roberto I.C. (2008). Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida Guilliermondii*. *Process Biochemistry* 43 (5), 540-546.

Nueva Genesis. La celulosa ¿Qué es? Disponible en <https://clavesdesalud.blogspot.com/2012/02/la-celulosa-que-es.html> (2012)

Nieves I.U., Geddes C.C., Mullinix M.T., Hoffman R.W., Tong Z., Castro E., Shanmugam K.T., Ingram L.O. (2011a). Injection of air into the headspace improves fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by *Escherichia coli* MM170. *Bioresour Technol* 102, 6959-6965.

Nieves I.U.; Geddes C.C; Miller E.N.; Mullinix M.T.; Hoffman R.W.; Fu Z.; Tong Z.; Ingram L.O. (2011b). Effect of reduced sulfur compounds on the fermentation of phosphoric acid pretreated bagasse by ethanologenic *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 102 6959-6965.

Nigam P.S., Singh A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Bioresour Technol* 37, 52-68.



Novik G., Wawrzynczyk J., Norrlow O., Szwajcer-Dey E. (2007). Fractions of barley spent grain as media for growth of probiotic bacteria 76, 804-808.

Oh Y., Hwang K., Kim C., Kim J.R., Lee J. (2018). Recent developments and key barriers to advanced biofuels: A short review. *Bioresour Technol* 257, 320-333.

Ohgren K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund, M.F., Galbe, M., Hahn-Hagerdal B., Zacchi G., (2006). Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 127, 488-498.

Okamoto H., Sato K., Yagi N., Inoue M., Yamasaki S., Ishida S., Shibata J. (2002). Development of production process of charcoal bricks from spent grain. *Kagaku Kogaku Ronbunshu* 28 (2), 137-142.

Oliva J.M., Saez F.F., Ballesteros I., Gonzalez A., Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros M. (2003). Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*, *Bioresour Technol* 105, 141-153.

Orencio-Trejo M., Utrilla J., Fernyey-Syoval, M.F., Huerta-Beristain G.F., Gosset G.F., Martinez A. (2010). Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. *Bioresour Technol* 121, 71-107.

Özdenkçi, K., De Blasio C., Muddassar H.R., Melin K., Oinas P., Koskinen J., Sarwar G., Järvinen M. (2017). A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. *Energy Conversion and Management* 149, 974-987.

Pablo J. Arauzo, Maciej P., Olszewski Yrea Kruse (2018). Hydrothermal carbonization brewer's spent grains with the focus on improving the degradation of the feedstock 11, 3226.



Panagiotou G., Granouillet P., Olsson L. (2006). Arabinoxylan degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72, 1117-1124.

Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1996). Study of charcoal adsorption for improving the production of xylitol from wood hydrolysates. *Bioprocess Eng* 16 (1), 39-43.

Paulova L., Patakova P., Branska B., Rychtera M., Melzoch K. (2015). Lignocellulosic ethanol: technology design and its impact on process efficiency. *Bioresour Technol* 33, 1091-1107.

Payen, A. (1838). Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 7, 7.

Paz A., Outeiriño D., Pérez Guerra N., Domínguez J.M. (2019). Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. *Bioresour Technol* 275, 402-409.

Peng F., Peng P., Xu F., Sun R. (2012). Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Bioresour Technol* 30, 879-903.

Pereda C.F. (2017). Qué ocurre con el Acuerdo de París. <https://elpais.com/internacional/2017/05/31/estados_unidos/1496238308_555328.html>. Acceso en 11/05/2019.

Pereira S.R., Portugal-Nunes D.J., Evtuguin D.V., Serafim L.S., Xavier A.M.R.B. (2013). Advances in ethanol production from hardwood spent sulphite liquors. *Process Biochemistry* 48, 272-282.

Phitsuwan P., Sakka K., Ratanakhanokchai K. (2013). Improvement of lignocellulosic biomass in plant: A review of feedstocks, biomass



recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass Bioenergy* 58, 390-405.

Pinheiro T., Coelho E., Romaní 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.

Pontrelli S., Chiu T., Lan E.I., Chen F.Y., Chang P., Liao J.C. (2018). *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 50, 16-46.

Qin F., Johansen A.Z., Mussatto S.I. (2018). Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products* 125, 443-453.

Quintero J.A., Rincón L.E., Cardona C.A. (2011). Production of bioethanol from agroindustrial residues as feedstocks. *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes*. 251-285.

Raele R., Boaventura J.M.G., Fischmann A.A., Sarturi G. (2014). Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. *Bioresour Technol* 87, 205-223.

Ragauskas A.J., Beckham G.T., Biddy M.J., Chyra R., Chen F., Davis M.F. (2014). Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. *Science*. 344(6185).

Ranjan R., Thust S., Gounaris C.E., Woo M., Floudas C.A., Keitz M., Valentas K.J., Wei J., Tsapatsis M. (2009). Adsorption of fermentation inhibitors from lignocellulosic biomass hydrolysates for improved ethanol yield and value added product recovery. *Microporous Mesoporous Mat* 122, 143-148.



Rastogi M., Shrivastava S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 80, 330-340.

Reinold, M.R. (1997). *Manual práctico de cervejaria*, Aden Editora e Comunicacoes.

RFA (2017). Ethanol biorefinery locations-coast to coast, <http://www.ethanolrfa.org/resources/biorefinery-locations>.

Rodríguez-Antón L.M., Gutiérrez-Martín F., Martínez-Arevalo C., (2015). Physical properties of gasoline, isobutanol and ETBE binary blends in comparison with gasoline ethanol blends. *Fuel* 166, 81-86.

Romero-García J.M. (2016). *La biomasa del olivar como fuente energética y de bioproductos. Avances hacia la Biorrefinería del Olivar*. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.

Romero-García J., Martínez-Patiño C., Ruiz E., Romero I., Castro E., (2016). Ethanol production from olive stone hydrolysates by xylose fermenting microorganisms. *Bioethanol* 2 (1), 51-65.

Roukas T. (1999). Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*. *World J Microbiol Biotechnol* 15, 447-450.

Rowell R.M. (2012). *Hybook of wood chemistry and wood composites* CRC press. Second edition. CRC Press.

Russ W., Mörtel H., Meyer-Pittroff R. (2005). Application of spent grains to increase porosity in bricks, construction and building *Materials* 19, 117-126.



Sánchez O.J., Cardona C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol* 99, 5270-5295.

Santos J.I., Fillat U., Martín-Sampedro R., Eugenio M.E., Negro M.J., Ballesteros I., Rodríguez A., Ibarra D. (2017). Evaluation of lignins from side-streams generated in an olive tree pruning-based biorefinery: bioethanol production and alkaline pulping. *International Journal of Biological Macromolecules* 105, 238-251.

Sarawan C., Suinyuy T.N., Sewsynker-Sukai Y., Gueguim Kana E.B., (2019). Optimized activated charcoal detoxification of acid-pretreated lignocellulosic substrate and assessment for bioethanol production. *Bioresour Technol* 286, 121-124.

Schulze E. (1891). Zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der pflanzlichen Zellmembranen. *Ber Dtsch Chem.Ges* 24 (2), 2277-2287.

Sergio F., Eliseu M., Paulo B., Carlos C., Luís C., Cândida V. (2019). Experimental analysis of brewers' spent grains steam gasification in an allothermal batch reactor 12, 912.

Silva J.P., Sousa S., Rodrigues J., Antunes H., Porter J.J., Gonçalves I., Ferreira D.S. (2004). Adsorption of Acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains. *Bioresour Technol* 40, 309-315.

Sindhu R., Binod P., Mathew A.K., Abraham A., Gnansounou E., Ummalyma S.B., Thomas L., Pyey A. (2017). Development of a novel ultrasound-assisted alkali pretreatment strategy for the production of bioethanol and xylanases from chili post harvest residue. *Bioresour Technol* 242, 146-151.

Sindhu R., Binod P., Pyey A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass. An overview. *Bioresour Technol* 199, 76-82.



Singh J., Suhag M., Dhaka A. (2015). Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Bioresour Technol* 117, 624-631.

Singhania R.R., Patel A.K., Sukumaran R.K., Larroche C., Pandey A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology* 127, 500-507.

Sivers M.V., Zacchi G., Olsson L., Hahn-Hägerdal B. (1994). Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Echerichia coli*. *Biotechnol Prog* 10, 555-560.

Sluiter J.B., Ruiz R.O., Scarlata C.J., Sluiter A.D., Templeton D.W., (2010). Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. Review and description of methods. *J Agric Food Chem* 58, 9043-9053.

Szponar B., Pawlik K.J., Gamian A., Dey E.S. (2003). Protein fraction of barley spent grain as a new simple medium for growth and sporulation of soil actinobacteria. *Biotechnol Lett* 25, 1717-1721.

Taherzadeh M.J., Karimi K. (2011). Chapter 12: Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. *Bioresour Technol*, 287-311.

Teresa M.M., Tomás F. T., Sónia M., Nídia S. C. (2015). Bioethanol from brewers' spent grain: pentose fermentation. *Chemical Engineering Transactions*. 43.

Tran D., Chang J., Lee D. (2017). Recent insights into continuous-flow biodiesel production via catalytic and non-catalytic transesterification processes. *Bioresour Technol* 185, 376-409.



- Vasconcelos S.M., Santos A.M.P., Rocha G.J.M., Souto-Maior A.M. (2013). Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. *Bioresour Technol* 135, 46-52.
- Vieira E., Rocha M.A.M., Coelho E., Pinho O., Saraiva J.A., Ferreira I. (2014). Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Industrial Crops and Products* 52, 136-143.
- Waldron Rahmanian N., Jafari S.M., Wani T.A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Bioresour Technol* 42(2), 150-172.
- Wang X., Tsang Y.F., Li Y., Ma X., Cui S., Zhang T., Hu J., Gao M. (2017). Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *S. stipites*. *Bioresour Technol* 244, 1059-1067.
- Wigley T.M.L., Richels R., Edmonds J.A. (1996). Economic and environmental choices in the stabilization of atmospheric CO₂ concentrations. *Nature*. 379 (6562), 240-243.
- Wijaya Y.P., Putra R.D.D., Widayaya V.T., Ha J., Suh D.J., Kim C.S., (2014). Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 164, 221-231.
- Wilkinson S., Smart K.A., Cook D.J. (2014). A comparison of dilute acid and alkali-catalyzed hydrothermal pretreatments for bioethanol production from brewer' spent grains. *J Am Soc Brew Chem* 72, 143-153.



Wimalasena T.T., Greetham D., Marvin M.E., Liti G., Chyelia Y., Hart A., Louis E.J., Phister T.G., Tucker G.A., Smart K.A. (2014). Phenotypic characterisation of *Saccharomyces* spp. yeast for tolerance to stresses encountered during fermentation of lignocellulosic residues to produce bioethanol. *Microbial cell factories* 14, 1-13.

Winkelhausena E., Malinovskaa R.J., Velickovaa E., Kuzmanovaa S., (2007). Sensory and microbiological quality of a baked product containing xylitol as an alternative sweetener. *Int J Food Prop* 10, 639-649.

Wyman C.E., Dale B.E., Elyer R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol* 96, 1959-1966.

Xiros C., Katapodis P., Christakopoulos P. (2010). Factors affecting cellulose and hemicellulose hydrolysis of alkali treated brewers spent grain by *Fusarium Oxysporum* enzyme extract. *Bioresour Technol* 102, 1688-96

Yee K.F., Mohamed A.R., Tan S.H. (2013). A review on the evolution of ethyl tert-butyl ether (ETBE) and its future prospects, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 22, 604-620.

Yu Y., Christopher L.P. (2017). Detoxification of hemicellulose-rich poplar hydrolysate by polymeric resins for improved ethanol fermentability. *Fuel* 203, 187-196.

Zabed H., Sahu J.N., Suely A., Boyce A.N., Faruq G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renew Sustain Energy Rev* 71, 475-501.

Zacchi G., Axelsson A. (1989). Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnol Bioeng* 34, 223-233.



Zhang H.Y., Lynd L.R. (2004). Toward an aggregated understyng of enzymatic hydrolysis of cellulose: non complexed cellulose systems. *Biotechnol Bioeng* 88, 797-779.

Zhang J., Zang L. (2016). Enhancement of biohydrogen production from brewers' spent grain by calcined-red mud pretreatment. *Bioresour Technol* 209, 73-79.



7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

ARTÍCULO 1

Título: Ethanol Production from Brewer' Spent Grain by dilute phosphoric acid.

Autores: José A. Rojas-Chamorro, Cristóbal Cara, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Juan M. Romero- García, Solange I. Mussatto, Eulogio Castro.

Publicación: Energy & Fuels, 32, 5226-5233
(2018).

DOI: 10.1021/acs.energyfuels.8b00343.

Resumen:

This paper deals with a new approach for using olive tree pruning biomass as raw material for ethanol and other chemical production. This process includes a water extraction step, followed by a high solids loading dilute phosphoric acid pretreatment and an ethanologenic *Escherichia coli* fermentation for the conversion of all of the sugars released. Results show that the operational conditions leading to the maximal hemicelulosic sugar recovery in the liquid fraction (near 70%) are 170 °C and 0.5% (w/v) phosphoric acid concentration. The fermentation of the mixed sugars found in the detoxified prehydrolysates by ethanologenic *E. coli* MS04 led to an ethanol concentration of 23 g/L and an ethanol yield of 0.46 g of ethanol/g of sugars consumed. When the ethanol production from the pretreated solids after enzymatic hydrolysis is also taken into account, 13.2 g of ethanol/100 g of original material was obtained. The production of other interesting compounds is also considered.

ARTÍCULO 2

Título: Comparison of Fermentation Strategies for Ethanol Production from Pretreated Brewers Spent Grain.

Autores: José A. Rojas-Chamorro, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Cristóbal Cara, Eulogio Castro.

Publicación: Chemical Engineering Transactions 61, (2017).

DOI: 10.3303/CET1761104.

Resumen:

Brewers spent grain (BSG) is an important co-product derived from beer making process with limited practical applications. The bioconversion into ethanol of this renewable resource can be interesting because of its carbohydrate content. Untreated brewers spent grain contains 20.5 % glucans and 25 % hemicellulose, mainly xylose and arabinose. This work focuses on the bioethanol production from this feedstock after phosphoric acid pretreatment at previously determined optimal conditions. The sequential and simultaneous process configurations for saccharification and fermentation were compared at different solid loadings, 5 %, 10 % and 15 % (w/v). In the sequential process, the enzymatic hydrolysis showed good performance. The cellulose saccharification was almost complete even when the enzymatic hydrolysis was performed at the highest solid loading (15 % w/v).

The final ethanol concentrations and yields did not differ significantly between both process configurations tested at 5 % and 10 % solid loading. However, at the highest solid loading the separate process appears to be more favourable. Thus, the best results were achieved when the pretreated BSG was saccharified and fermented by a sequential process with maximum bioethanol production of 22.5 g/L. This ethanol concentration corresponds to a yield of 37 g ethanol/100 g glucose in pretreated BSG and 72 % of the theoretical ethanol yield.

ARTÍCULO 3

Título: Brewer's spent grain as a source of renewable fuel through optimized dilute acid pretreatment.

Autores: José A. Rojas-Chamorro, Inmaculada Romero, Juan C. López-Linares, Eulogio Castro.

Publicación: Renewable Energy, Volume 148, (2020).

DOI: doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.030.

Resumen:

In this work, a dilute sulfuric acid pretreatment at mild conditions was employed to fractionate brewer's spent grain (BSG) with the aim of achieving high carbohydrate recovery. A Box-Behnken experimental design was used with temperature (110–130°C), acid concentration (1–3% w/v) and time (10–40 min) as independent factors, the objective being to determine the best conditions for the release of glucose (following enzymatic hydrolysis of the pretreated solids) along with that of hemicellulosic sugars in the liquors. The optimal pretreatment conditions were found to be 130°C, 1% H₂SO₄ and 26 min, which allowed the recovery of 94% of the sugars in raw BSG. Next, the effect of substrate concentration on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process of the pretreated solid was studied. Likewise, the fermentability of the resulting prehydrolysate was evaluated with two xylose fermenting microorganisms, *Scheffersomyces stipitis* and *Escherichia coli*. The overall proposed BSG bioconversion process yielded 22.9 L bioethanol from 100 kg of dry biomass.

ARTÍCULO 4

Título: Improved ethanol production from the slurry of pretreated brewers' spent grain through different co-fermentation strategies.

Autores: José A. Rojas-Chamorro, J.M. Romero-García, C.Cara, I. Romero, E. Castro.

Publicación: Bioresource Technology, Volume 296, (2020).

DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122367

Resumen:

The aim of this work was to bioconvert all sugars in BSG into ethanol using a process scheme that includes the enzymatic hydrolysis of the whole slurry resulting from the pretreatment of BSG with phosphoric and sulfuric acid using previously optimised conditions, followed by the co-fermentation of the mixed sugars. More than 90% of the sugars in raw BSG were recovered in the pretreatment and the subsequent enzymatic hydrolysis of the whole slurry. The co-fermentation of the enzymatic hydrolysates with *ESCHERICHIA coli* was then compared with that the co-culture of *Scheffersomyces stipitis* and *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, which resulted in lower ethanol production. The co-fermentation strategy with a single microorganism (*E. coli*) when BSG was pretreated with phosphoric acid resulted into the highest ethanol concentration, 39 g/L, which means that 222 L of ethanol can be obtained from a ton of BSG without detoxification requirements.