



universidad
de león

TESIS DOCTORAL:

DEGRADACIÓN DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.
EVALUACIÓN DE PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS
E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICAS PARA LA OBTENCIÓN
DE ALCOHOLES POR FERMENTACIÓN.

*“Degradation of lignocellulosic material. Evaluation of chemical pretreatment
and enzymatic hydrolysis for the obtaining of alcohols by fermentation”*

Ana Isabel Paniagua García

Programa de Doctorado: “CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL”

Tutora:

Marta Elena Sánchez Morán

Directoras:

Mónica Coca Sanz
Marta Elena Sánchez Morán
María Hijosa Valsero

León, febrero 2020

Agradecimientos

Quiero mostrar mi especial agradecimiento a Rebeca Díez Antolínez, Responsable del Centro de I+D+i de Biocombustibles y Bioproductos del ITACyL, por su apoyo y ayuda constantes, sin los cuales esta Tesis Doctoral no se habría podido desarrollar. A mis compañeros del Centro de Biocombustibles: María, Jerson, Raquel, Nuria y Gerardo, por haberme ayudado tanto y ser unos excelentes profesionales que forman un equipo formidable. Deseo agradecer a mis directoras de tesis por su tutela y dedicación a lo largo de los años en los que se ha realizado este trabajo.

Agradezco también a mi familia, sobre todo a mis padres y hermana, por estar siempre cuando les necesito, a Eloy por su enorme paciencia y apoyo incondicional y a mis abuelos que, aunque ya no estén, siempre les tengo presentes.

Finalmente quiero agradecer a los organismos que han permitido que este trabajo haya sido posible mediante su financiación. En primer lugar, al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL). En segundo lugar, al Ministerio de Ciencia e Innovación y a los fondos FEDER, bajo el proyecto: Mejora de los sistemas agrícolas y racionalización de cultivos para optimizar la competitividad y sostenibilidad de las explotaciones agrarias (POCTEP Project Nº 0450_AGRI_SOS_E_6). Y, por último, a la Comisión Europea y a los fondos del Programa de Investigación e Innovación Horizon 2020 de la Unión Europea, bajo el proyecto: H2020-LCE-2015 Waste2Fuels project (Sustainable production of next generation biofuels from waste streams - Waste2Fuels. GA – 654623).

Índice general

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS / TABLE INDEX	VII
ÍNDICE DE FIGURAS / FIGURE INDEX	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIV
ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS	XVII
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1. Situación mundial actual	3
1.1.1. Combustibles fósiles: búsqueda de alternativas	3
1.1.2. Economía circular	5
1.1.3. Desarrollo de biorrefinerías	6
1.1.4. Biocombustibles	8
1.1.4.1. Biocarburantes líquidos	9
1.2. Biomasa lignocelulósica	12
1.2.1. Composición y estructura	12
1.2.1.1. Celulosa	13
1.2.1.2. Hemicelulosa	14
1.2.1.3. Lignina	15
1.2.1.4. Otros componentes	15
1.2.2. Tipos de biomasa lignocelulósica	16
1.2.2.1. Materiales de origen agrícola	16
1.2.2.2. Materiales de origen forestal	17
1.2.2.3. Materiales de origen industrial	17
1.2.2.4. Cultivos herbáceos	17
1.2.2.5. Materiales de origen urbano	17
1.3. Butanol	18
1.3.1. Antecedentes	18
1.3.2. Etapas del proceso de producción de biobutanol a partir de biombras lignocelulósicas	19
1.3.2.1. Pretratamiento	21

1.3.2.2. Hidrólisis enzimática	26
1.3.2.3. Fermentación ABE	28
1.4. Compuestos inhibidores y aumento de la fermentabilidad de los hidrolizados	35
1.4.1. Origen y tipos de compuestos inhibidores	35
1.4.1.1. Compuestos furánicos	36
1.4.1.2. Ácidos alifáticos	36
1.4.1.3. Compuestos fenólicos	37
1.4.1.4. Otros inhibidores	37
1.4.2. Métodos analíticos para la determinación de compuestos inhibidores de la fermentación ABE	38
1.4.3. Métodos de detoxificación	39
1.4.3.1. Métodos físico-químicos	39
1.4.3.2. Métodos biológicos	42
1.4.3.3. Métodos combinados	44
1.4.4. Utilización de cepas modificadas en la fermentación ABE	44
1.5. Retos a superar en la producción de butanol	45
1.6. Bibliografía	48
2. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y METODOLOGÍA GENERAL	61
2.1. Justificación	63
2.2. Objetivos	63
2.2.1. Objetivo general	63
2.2.2. Objetivos específicos	64
2.3. Metodología general	65
3. RESPONSE SURFACE OPTIMIZATION OF DILUTE SULFURIC ACID PRETREATMENT OF SWITCHGRASS (<i>Panicum virgatum</i> L.) FOR FERMENTABLE SUGARS PRODUCTION	69
3.1. Introduction	72
3.2. Material and methods	73
3.2.1. Raw material	73
3.2.2. Acid hydrolysis pretreatment	73
3.2.3. Severity factor	74
3.2.4. Enzymatic hydrolysis	74
3.2.5. Analytical methods	74
3.2.6. Experimental design	75

3.3. Results and discussion	75
3.3.1. Characterization of switchgrass	75
3.3.2. Effect of acid hydrolysis conditions on sugar recovery and inhibitor generation .	76
3.3.3. Statistical analysis	77
3.3.4. Optimization and response surface plots	78
3.4. Conclusions	80
3.5. Acknowledgements	81
3.6. References	82
4. ENZYMATIC HYDROLYSIS AND DETOXIFICATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS ARE NOT ALWAYS NECESSARY FOR ABE FERMENTATION: THE CASE OF <i>Panicum virgatum</i>	85
4.1. Introduction	88
4.2. Material and methods	90
4.2.1. Chemicals and reagents	90
4.2.2. Lignocellulosic biomass	90
4.2.3. Acid hydrolysis	90
4.2.4. Bacterial strains and culture conditions	91
4.2.5. Bacterial strain comparison	92
4.2.6. Detoxification of switchgrass acid hydrolysate and ABE fermentation	92
4.2.7. Effect of inhibitors	93
4.2.8. Analytical methods	94
4.2.9. Statistical analysis	96
4.3. Results and discussion	96
4.3.1. Bacterial strain comparison	96
4.3.2. Detoxification and fermentation of switchgrass acid hydrolysate	97
4.3.3. Effect of inhibitors on ABE fermentation	102
4.3.4. Challenges for ABE fermentation based on lignocellulosic feedstocks	106
4.4. Conclusions	107
4.5. Acknowledgements	107
4.6. References	108
5. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC-DAD METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MAIN POTENTIAL ABE FERMENTATION INHIBITORS IN AGRO-FOOD WASTES HYDROLYSATES	113
5.1. Introduction	116

5.2. Material and methods	118
5.2.1. Chemicals and reagents	118
5.2.2. Biomass description and processing	118
5.2.3. Hydrolysate preparation and chemical analysis	119
5.2.4. Analytical method for the identification of inhibitory compounds in hydrolysates	119
5.2.4.1. Extraction and derivatization procedures	119
5.2.4.2. GC-MS analysis	120
5.2.5. Quantitative HPLC-DAD analysis of phenolics and caffeine	121
5.2.6. HPLC-DAD method validation	121
5.3. Results and discussion	122
5.3.1. Raw materials and hydrolysates	122
5.3.1.1. Chemical composition of solid agro-food wastes	122
5.3.1.2. Chemical composition and selection of hydrolysates	123
5.3.2. Identification (GC-MS) of potential fermentation inhibitory compounds in hydrolysates	128
5.3.2.1. Non-aromatic compounds	132
5.3.2.2. Aromatic compounds	132
5.3.3. Development of a quantification method (HPLC-DAD)	133
5.3.3.1. Selection of the target compounds	133
5.3.3.2. Optimization of chromatographic conditions	135
5.3.4. Validation of the HPLC-DAD method	138
5.3.4.1. Linearity and range	138
5.3.4.2. Accuracy and precision	139
5.3.4.3. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)	139
5.3.5. Method application	139
5.3.5.1. Apple pomace (AP) hydrolysates	141
5.3.5.2. Potato peel (PP) hydrolysates	141
5.3.5.3. Brewers' spent grain (BSG) hydrolysates	141
5.3.5.4. Coffee silverskin (CS) hydrolysates	141
5.4. Conclusions	142
5.5. Acknowledgements	142
5.6. References	143

6. CONCLUSIONES Y PROPUESTAS /CONCLUSIONS AND PROPOSALS	147
6.1. Conclusiones	149
6.2. Propuestas	152
6.3. Conclusions	153
6.4. Proposals	156
7. ANEXOS	157
Anexos I: <i>Panicum virgatum</i>	157
7.1. Preparación de los hidrolizados	159
7.2. Microscopía electrónica de barrido	164
7.3. Metodología de superficie de respuesta (RSM)	167
Anexos II: Residuos de la industria agroalimentaria	171
7.4. Preparación de hidrolizados	173
Anexos III: Publicaciones	177

Índice de tablas / Table index

Tabla 1.1. Composición de diferentes materiales lignocelulósicos	13
Tabla 1.2. Propiedades de diésel, gasolina, etanol y butanol	18
Tabla 1.3. Producción de butanol y ABE a partir de hidrolizados lignocelulósicos utilizando diferentes pretratamientos y cepas	34
Table 3.1. Experimental design showing actual (and coded) values for independent variables; severity factors (SF) and observed and predicted values for responses	76
Table 3.2. ANOVA table for the adjusted model of different responses	77
Table 3.3. Predicted and observed responses at optimal conditions for the three-independent-variable model	79
Table 3.4. Predicted and observed responses at optimal conditions for the two-independent-variable model	80
Table 4.1. Chemical composition of the switchgrass acid hydrolysate	91
Table 4.2. Compositions of switchgrass acid hydrolysate non-detoxified and detoxified with different methods	98
Table 4.3. Residual sugars, ABE fermentation products (solvents and acids), yields of butanol and ABE and productivity of butanol and ABE after 120 h of fermentation of switchgrass acid hydrolysate non-detoxified or detoxified with different detoxification methods	100
Table 4.4. Residual sugars, ABE fermentation products (solvents and acids), yields of butanol and ABE and productivity of butanol and ABE after 96 h of fermentation of model medium AHS with or without inhibitors	103
Table 5.1. Chemical composition of biomass feedstock	122
Table 5.2. Total sugars released, fermentation inhibitors (formic, acetic and levulinic acids, 5-HMF, furfural and TPC) and sugars recovery contained in hydrolysates of AP, PP, BSG and CS obtained by pretreatment with chemical reagents and subsequent enzymatic hydrolysis	124
Table 5.3. Total sugars released, fermentation inhibitors (formic, acetic and levulinic acids, 5-HMF, furfural and TPC) and sugars recovery contained in the selected hydrolysates of AP, PP, BSG and CS obtained by pretreatment with chemical reagents and subsequent enzymatic hydrolysis	128
Table 5.4. Compounds identified (GC-MS) in ethyl acetate extracts of the selected hydrolysates of AP, PP, BSG and CS obtained by pretreatment with chemical reagents and subsequent enzymatic hydrolysis	129

Table 5.5. Chromatographic conditions of the HPLC-DAD method	136
Table 5.6. Retention time, maximum absorption wavelengths and validation parameters for the HPLC-DAD method	138
Table 5.7. Phenolic compounds and caffeine quantified in hydrolysates of AP, PP, BSG and CS obtained by pretreatment with chemical reagents and subsequent enzymatic hydrolysis	140
Tabla 7.1. Valores de las variables del pretratamiento de cada ensayo, factor de severidad (SF) y caracterización del <i>P. virgatum</i> pretratado	162

Índice de figuras / Figure index

Figura 1.1. Evolución del consumo mundial de las diferentes energías primarias en Mteq	4
Figura 1.2. Producción mundial de biocombustibles en Mteq	5
Figura 1.3. Esquema del proceso global de una biorrefinería	7
Figura 1.4. Esquema de productos tipo obtenidos en biorrefinerías	8
Figura 1.5. Estructura de la lignocelulosa	12
Figura 1.6. Estructura de la celulosa	14
Figura 1.7. Estructura de la hemicelulosa	14
Figura 1.8. Estructura de la lignina	15
Figura 1.9. Esquema del proceso de obtención de biobutanol	20
Figura 1.10. Esquema del proceso de hidrólisis enzimática de la celulosa	27
Figura 1.11. Ruta metabólica de producción de butanol por <i>C. acetobutylicum</i>	30
Figura 1.12. Formación de compuestos inhibidores a partir del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica	35
Figura 2.1. Esquema de la metodología general del trabajo	67
Figure 3.1. 2-D contour plots between coupled acid concentration (%) and hydrolysis time (min) for glucose (mg g^{-1}), xylose (mg g^{-1}), total sugars (mg g^{-1}) and total inhibitors (mg g^{-1})....	80
Figure 4.1. Butanol production and sugar consumption during a 90-h fermentation of model medium containing 20 g L^{-1} glucose, 20 g L^{-1} xylose and 4 g L^{-1} arabinose	97
Figure 4.2. ABE production and total sugar consumption during a 120-h fermentation of switchgrass acid hydrolysates with or without detoxification treatments	99
Figure 4.3. Effect of inhibitors on sugar consumption, final pH and bacterial density after 96 h of fermentation in the model medium AHS (initial sugars: 26 g L^{-1} xylose, 4 g L^{-1} arabinose , 4 g L^{-1} glucose).....	105
Figure 5.1. Structures of the compounds quantified with the developed HPLC-DAD method.	134
Figure 5.2. Simultaneous HPLC-DAD chromatograms (235, 254, 276 and 320 nm) of reference standards constituted in water (S) and hydrolysates of AP, PP, BSG and CS after a dilute nitric acid pretreatment and a subsequent enzymatic hydrolysis	137
Figura 7.1. Cultivo de <i>P. virgatum</i> en la parcela experimental del ITACyL	159
Figura 7.2. Filtración a vacío de los hidrolizados de <i>P. virgatum</i>	163
Figura 7.3. <i>P. virgatum</i> sin tratar (A), pretratado con H_2SO_4 diluido (B) y después de pretratamiento con H_2SO_4 diluido e hidrólisis enzimática (C)	166

Figura 7.4. Esquema del proceso de generación de hidrolizados a partir de cuatro residuos de la industria agroalimentaria: bagazo de manzana (AP), piel de patata (PP), bagazo de cerveza (BSG) y piel de grano de café (CS)	173
Figura 7.5. Esquema de la metodología de preparación de muestras para análisis mediante GC-MS/MS	175

Resumen

Durante los últimos años, ha habido un interés creciente en la producción de etanol y butanol como biocombustibles alternativos debido a dos razones fundamentales: la tasa finita de combustibles fósiles y el deterioro ambiental del planeta. Los residuos lignocelulósicos permiten la producción de biocombustibles de segunda generación (2G), ya que no se emplean en alimentación humana ni animal. El butanol como biocarburante tiene mayores ventajas que el etanol debido a su mayor poder calorífico y su seguridad en el manejo. Sin embargo, en la producción de biobutanol 2G todavía hay muchos desafíos que deben resolverse para que el proceso sea rentable y pueda competir con la ruta petroquímica convencional. Así, el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos para alterar su estructura recalcitrante, etapa crucial en la producción de biobutanol, presenta aún muchas posibilidades de mejora, así como la selección de microorganismos fermentadores eficaces y la identificación detallada de los compuestos presentes en los hidrolizados que pueden actuar como inhibidores de la fermentación.

La presente Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio del proceso de hidrólisis de distintos tipos de biomásas lignocelulósicas: un cultivo energético (*Panicum virgatum*) y cuatro residuos de la industria agroalimentaria (bagazo de manzana, piel de patata, bagazo de cerveza y piel de grano de café). Así, se ha comparado la eficacia de diferentes pretratamientos físico-químicos (basados en el uso de ácidos, álcalis, solventes orgánicos y compuestos surfactantes), seguidos de una etapa de hidrólisis enzimática, para recuperar azúcares fermentables que se puedan utilizar en la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) con *Clostridium* spp.

En la primera parte de este trabajo, se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para investigar el efecto de las principales condiciones de operación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido de *P. virgatum*. Se aplicó un diseño rotativo central compuesto (CCRD) para evaluar el efecto de la concentración de ácido (0,16 – 1,84%, p/p), la carga de biomasa (4,9 – 30,0%, p/p) y el tiempo de hidrólisis (9,6 – 110,5 min) a 121 °C, en el rendimiento de la recuperación de azúcares fermentables y de inhibidores totales generados (ácido acético, ácido levulínico, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) y furfural) con el fin de alcanzar un compromiso entre ambas respuestas. Los resultados mostraron que la recuperación total de azúcares fermentables y la generación de inhibidores de la fermentación dependen

fuertemente de la concentración de ácido mientras que la dependencia es menos significativa para la carga de sólido y el tiempo de hidrólisis. Las condiciones de hidrólisis óptimas calculadas por el modelo fueron 1,72% (p/p) de concentración de ácido sulfúrico y 112,0 min de tiempo de hidrólisis a 121 °C, para un valor fijo de 10,0% (p/p) de carga de biomasa. Bajo estas condiciones de pretratamiento, y una posterior etapa de hidrólisis enzimática, se obtuvo una cantidad de azúcares hidrolizados de 502,2 mg g⁻¹ (78,8% de rendimiento de recuperación de azúcares) y una cantidad total de compuestos inhibidores generados de 42,9 mg g⁻¹.

A continuación, se procedió a estudiar la producción de biobutanol a partir del hidrolizado ácido hemicelulósico de *P. virgatum*, obtenido en las condiciones óptimas descritas en el párrafo anterior. La cepa *Clostridium beijerinckii* CECT 508 se seleccionó entre ocho cepas silvestres como la más eficiente para producir butanol a partir de mezclas de glucosa / xilosa. Además, se analizó el efecto de inhibición en la fermentación ABE producido por los compuestos presentes en el hidrolizado ácido. Para ello, se utilizaron medios de fermentación modelo y se observó que los inhibidores que más interfieren en la fermentación, cuando se encuentran en las concentraciones detectadas en el hidrolizado ácido (indicadas entre paréntesis), fueron: ácido acético (3,30 g L⁻¹) > compuestos fenólicos (1,00 g L⁻¹) > sulfatos (16,87 g L⁻¹) > furfural (0,60 g L⁻¹), mientras que el 5-HMF (0,20 g L⁻¹) y el ácido levulínico (0,30 g L⁻¹) no mostraron tener ningún efecto sobre la fermentación. Se evaluaron varios tratamientos físico-químicos de detoxificación, incluida la evaporación, la detoxificación con cal y la adsorción con carbón activado, para eliminar los inhibidores del hidrolizado ácido de *P. virgatum*. Aunque el carbón activado fue el método más efectivo en cuanto a la reducción de compuestos fenólicos, furfural, 5-HMF y ácido levulínico, no se observaron diferencias significativas en la producción de butanol entre los hidrolizados no detoxificados y los detoxificados. *C. beijerinckii* CECT 508 fermentó con éxito el hidrolizado ácido de *P. virgatum* no detoxificado (que contenía 26 g L⁻¹ de xilosa, 4 g L⁻¹ de glucosa y 4 g L⁻¹ de arabinosa) y se obtuvo una producción de butanol de 4,00 ± 0,71 g L⁻¹ (rendimiento 0,184 ± 0,032 g g⁻¹) y una producción de solventes ABE de 4,70 ± 0,91 g L⁻¹ (rendimiento 0,216 ± 0,041 g g⁻¹).

Por último, se analizó la presencia de compuestos inhibidores en los hidrolizados de cuatro residuos de la industria agroalimentaria (bagazo de manzana, piel de patata, bagazo de cerveza y piel de grano de café) obtenidos después de la aplicación de diferentes pretratamientos químicos basados en el uso de ácidos, álcalis, solventes orgánicos y compuestos surfactantes, bajo idénticas condiciones de operación (121 °C, 2 h). Se

identificaron sesenta y siete compuestos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), y se clasificaron en compuestos no aromáticos (ácidos alifáticos, compuestos que contienen nitrógeno, furanos y ácidos grasos) y compuestos aromáticos (fenólicos y no fenólicos). Después, se desarrolló y validó un método de cromatografía líquida de alta resolución con detección de matriz de diodos (HPLC-DAD) para la cuantificación de los inhibidores potenciales de la fermentación ABE más frecuentemente identificados en los hidrolizados de los residuos agroalimentarios (es decir, ácido gálico, 3,4-dihidroxibenzoico, 2,5-dihidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico, 3-hidroxibenzoico, vainílico, cafeico, siríngico, *p*-cumárico y ferúlico, vainillina, siringaldehído y cafeína). El método desarrollado mediante HPLC-DAD es simple, rápido y robusto, permite la inyección directa de las muestras sin tratamiento previo y hace posible la cuantificación simultánea de los compuestos mencionados anteriormente.

Como conclusión general de la Tesis Doctoral es preciso destacar que, para cada biomasa lignocelulósica, la selección del tipo y las condiciones del pretratamiento es una etapa crucial en el aumento de la rentabilidad de la producción de butanol mediante fermentación ABE, ya que condiciona tanto la concentración de azúcares fermentables obtenida en el hidrolizado, como la cantidad y tipo de los compuestos inhibidores presentes. Además, es también fundamental la selección de una cepa productora de butanol adecuada para cada hidrolizado.

Abstract

During the last years, there has been an increasing interest in the production of ethanol and butanol as alternative biofuels because of two fundamental reasons: the finite rate of fossil fuels and the environmental deterioration worldwide. Lignocellulosic materials enable the production of second generation biofuels (2G), since they are not employed as human or animal food. Butanol has greater advantages compared to ethanol as a fuel due to its greater calorific value and handling safety. However, in the production of 2G biobutanol there are still many challenges that must be solved in order for the process to be profitable and to compete with the conventional petrochemical route. Thereby, the pretreatment of lignocellulosic materials to disrupt their recalcitrant structures, a crucial step on biobutanol production, still has many options for improvement, as well as the selection of effective fermenting microorganisms and the detailed identification of the potential inhibitory compounds for ABE fermentation that are contained in the hydrolysates.

This doctoral thesis has focused on the study of the hydrolysis process of different types of lignocellulosic biomass: one energy crop (*Panicum virgatum*) and four agro-food industrial wastes (apple pomace, potato peel, brewers' spent grain and coffee silverskin). Thus, the efficiency of different physicochemical pretreatments (focused on the use of acids, alkalis, organic solvents and surfactant compounds), followed by enzymatic hydrolysis, to recover fermentable sugars that can be further used for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation with *Clostridium* spp., was compared.

In the first step of this work, response surface methodology (RSM) was used to investigate the effects of the main operating conditions of the pretreatment with dilute sulfuric acid on *P. virgatum*. A central composite rotatable design (CCRD) was applied to assess the effect of acid concentration (0.16 – 1.84%, w/w), solid load (4.9 – 30.0%, w/w) and hydrolysis time (9.6 – 110.5 min) at 121 °C, on fermentable sugars recovery yield and total inhibitors generated (acetic acid, levulinic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and furfural) in order to reach an optimization of both responses. The results showed a strong dependence of total sugars recovery and total fermentation inhibitors on acid concentration and a weaker dependence on solid load and acid hydrolysis time. The optimized hydrolysis conditions predicted by the model were 1.72% (w/w) of sulfuric acid concentration and 112.0 min of acid hydrolysis time at 121 °C, for a fixed value of 10.0% (w/w) of biomass load. Under these

pretreatment conditions, and a subsequent enzymatic hydrolysis, an amount of hydrolyzed sugars of 502.2 mg g⁻¹ (78.8% sugar recovery yield) and a total amount of generated inhibitory compounds of 42.9 mg g⁻¹, were obtained.

Then, the hemicellulosic acid hydrolysate of *P. virgatum*, obtained under the optimized conditions described above, was assessed for biobutanol production. *Clostridium beijerinckii* CECT 508 was selected among eight wild strains as the most efficient to produce butanol from glucose/xylose mixtures. Moreover, the effect of inhibitory compounds from the acid hydrolysate on ABE fermentation were studied. In this way, model fermentation media were used, and it was observed that the inhibitors that most interfere with fermentation, when they are in the concentrations detected in the hydrolysates (in brackets), were: acetic acid (3.30 g L⁻¹) > phenolic compounds (1.00 g L⁻¹) > sulfates (16.87 g L⁻¹) > furfural (0.60 g L⁻¹), while 5-HMF (0.20 g L⁻¹) and levulinic acid (0.30 g L⁻¹) seemed to have no effect on fermentation. Several physicochemical detoxification treatments, including evaporation, overliming and activated charcoal adsorption, were evaluated to remove inhibitors from *P. virgatum* acid hydrolysate. Although activated charcoal was the most effective method for the reduction of phenolic compounds, furfural, 5-HMF and levulinic acid, there were no significant differences in butanol production between non-detoxified and detoxified hydrolysates. The non-detoxified *P. virgatum* acid hydrolysate (containing 26 g L⁻¹ xylose, 4 g L⁻¹ glucose and 4 g L⁻¹ arabinose) was successfully fermented by *C. beijerinckii* CECT 508 and a butanol production of 4.00 ± 0.71 g L⁻¹ (yield 0.184 ± 0.032 g g⁻¹) and an ABE solvent production of 4.70 ± 0.91 g L⁻¹ (yield 0.216 ± 0.041 g g⁻¹) were obtained.

Finally, the release of inhibitory compounds in the hydrolysates of four agro-food industrial wastes (apple pomace, potato peel, brewers' spent grain and coffee silverskin) obtained after the application of different chemical pretreatments focused on the use of acids, alkalis, organic solvents and surfactant compounds, under the same operational conditions (121 °C, 2 h), was analyzed. Sixty-seven compounds were identified by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and were classified into non-aromatic compounds (aliphatic acids, nitrogen-containing compounds, furans and fatty acids) and aromatic compounds (phenolics and non-phenolics). Then, a high performance liquid chromatography method with diode array detection (HPLC-DAD) was developed and validated for the quantification of the most frequently potential inhibitory compounds identified in the agro-food wastes hydrolysates (i.e. gallic, 3,4-dihydroxybenzoic, 2,5-dihydroxybenzoic, 4-

hydroxybenzoic, 3-hydroxybenzoic, vanillic, caffeic, syringic, *p*-coumaric, and ferulic acids, vanillin, syringaldehyde and caffeine). The developed HPLC-DAD method is simple, fast, and robust, allows direct injection of samples without previous treatment and enables the simultaneous quantification of the abovementioned compounds.

As the main conclusion of this Doctoral Thesis, it should be noted that, for each lignocellulosic biomass, the selection of the type and conditions of pretreatment is a crucial step to increase the profitability of butanol production by ABE fermentation, since it affects both the concentration of fermentable sugars and the amount and type of the inhibitory compounds released in the hydrolysates. In addition, for each type of hydrolysate, the selection of a suitable butanol producing strain is also essential.

Abreviaturas / Abbreviations

2G	Segunda generación
3R	Reusar, reutilizar y reducir
5-HMF	5-Hidroximetilfurfural
ABE	Acetona-Butanol-Etanol
AFEX	Explosión fibrilar con amoníaco (Ammonia fiber explosion)
AHS	Hidrólisis ácida de <i>P. virgatum</i> (Acid hydrolysate of switchgrass)
AIL	Lignina insoluble en ácido (Acid insoluble lignin)
ANOVA	Análisis de varianza (Analysis of variance)
AP	Bagazo de manzana (Apple pomace)
ASL	Lignina soluble en ácido (Acid soluble lignin)
ATCC	American Type Culture Collection
BP	British Petroleum
BSG	Bagazo de cerveza (Brewers' spent grain)
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)
CBU	Unidades de celobiosa (Cellobiose units)
CCRD	Diseño rotativo central compuesto (Central composite rotatable design)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CS	Piel del grano de café (Coffee silverskin)
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio (Cetyltrimethylammonium bromide)
DDGS	Granos secos de destilería con solubles (Dried distillers grains with solubles)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
E100	Carburante 100% etanol
E5, E10, E15	Porcentaje de mezcla (5%, 10% y 15%) de etanol en gasolina
EFC	Control del flujo electrónico (Electronic flow control)
EI	Impacto electrónico (Electronic impact)
FPU	Unidades de papel de filtro (Filter paper units)
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (Gas chromatography – flame ionization detection)
GC-MS	Cromatografía de gases con espectrometría de masas (Gas chromatography – mass spectrometry)

GC-MS/MS	Cromatografía de gases con espectrometría de masas en tándem (Gas chromatography – tandem mass spectrometry)
GEI	Gases de efecto invernadero
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de matriz de diodos (High performance liquid chromatography – diode array detection)
HPLC-RID	Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de índice de refracción (High performance liquid chromatography – refractive index detection)
ICH	International Conference on Harmonization
IPPC	Prevención y Control Integrados de la Contaminación (Integrated Pollution Prevention and Control)
ITACyL	Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León
LOD	Límite de detección (Limit of detection)
LOQ	Límite de cuantificación (Limit of quantification)
MEB	Microscopía electrónica de barrido
Mteq	Millones de toneladas equivalentes de petróleo
NCIMB	National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria
NIST	National Institute of Standards and Technology
NREL	National Renewable Energy Laboratory
P _i	Productividad (Productivity)
PEG	Polietilenoglicol (Polyethylene glycol)
PP	Piel de patata (Potato peel)
RSD	Desviación típica relativa (Relative standard deviation)
RSM	Metodología de superficie de respuesta (Response surface methodology)
SF	Factor de severidad (Severity factor)
SHF	Hidrólisis y fermentación separadas (Separate hydrolysis and fermentation)
SSF	Sacarificación y fermentación simultáneas (Simultaneous saccharification and fermentation)
TMCS	Trimetilclorosilano (Trimethylchlorosilane)
TPC	Compuestos fenólicos totales (Total phenolic compounds)
UE	Unión Europea
UV-Vis	Ultravioleta-visible
WWF	World Wide Fund for Nature
Y _i	Rendimiento (Yield)

Capítulo/Chapter 1

1. Introducción y antecedentes

1.1. Situación mundial actual

1.1.1. Combustibles fósiles: búsqueda de alternativas

Desde comienzos del siglo XX, el consumo de energía ha ido aumentando continuamente a la vez que también lo han hecho la población mundial y la industrialización de los países. En el año 2017, los combustibles fósiles cubrieron el 82% de la demanda de energía a nivel mundial (petróleo: 32%, gas natural: 23% y carbón: 27%), mientras que las energías renovables y otras fuentes de energía alternativa lograron satisfacer sólo el 18% de dicha demanda mundial estimada en 14035 Mtep (millones de toneladas equivalentes de petróleo) (International Energy Agency, 2019). Hay claras evidencias científicas de que las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI), principalmente dióxido de carbono, metano y óxido nitroso, procedentes, fundamentalmente, de la combustión de combustibles fósiles y del uso intensivo de fertilizantes nitrogenados en la agricultura, están produciendo efectos graves en el clima de la Tierra (IPCC, 2007). Además, las reservas de combustibles fósiles son limitadas y se agotarán en un futuro próximo como consecuencia de la tasa de consumo actual. Por todo ello hay un gran interés en explorar otras fuentes de energía alternativas entre las que se encuentran las energías eólica, solar, hidráulica, nuclear y los biocombustibles (Chapman, 2014).

En la Figura 1.1 se muestra, según el informe estadístico publicado por British Petroleum (BP, 2019), cómo ha aumentado la demanda mundial de energía, desde el año 1993 al 2018, desglosada por tipo de fuente energética. Se aprecia que, aunque la tendencia en el uso de las fuentes de energía de tipo renovable es positiva, el consumo de petróleo, carbón y gas natural sigue experimentado un notable aumento (BP, 2019).

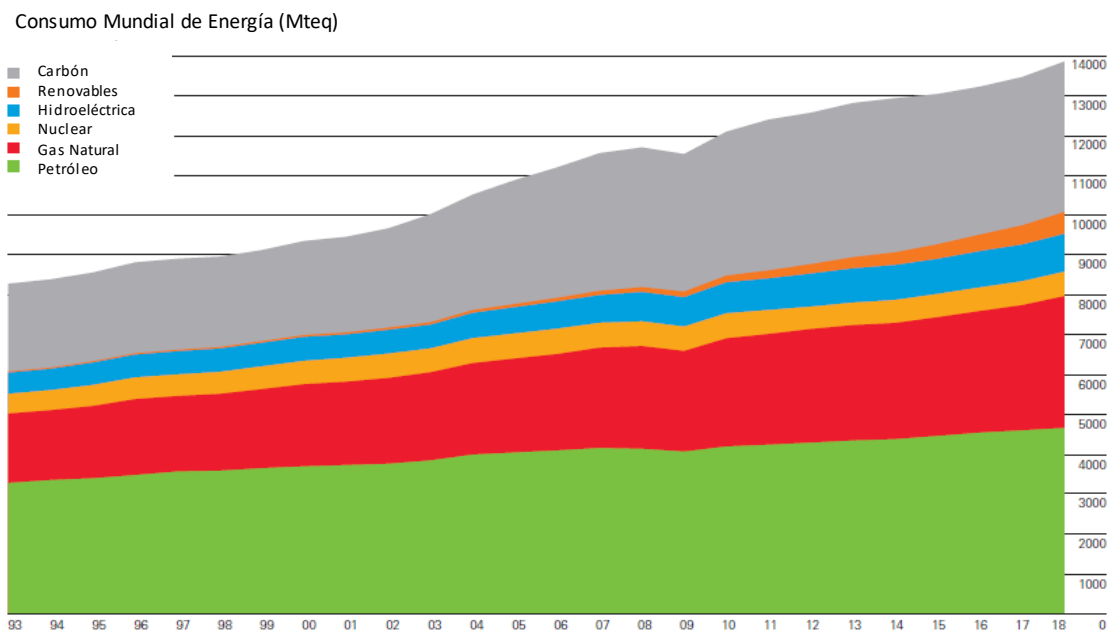


Figura 1.1. Evolución del consumo mundial de las diferentes energías primarias en Mteq (millones de toneladas equivalentes de petróleo) (BP, 2019).

Los biocombustibles, combustibles obtenidos a partir de biomasa, representan la alternativa más prometedora al petróleo como biocarburantes empleados en los medios de transporte (Amiri y Karimi, 2018). La producción de biocombustibles creció de media un 9,7% en el 2018, lo que representa el mayor crecimiento desde el 2010 y es ligeramente superior al promedio de los últimos 10 años (BP, 2019). Los recursos de obtención de biomasa tales como cosechas, cultivos herbáceos, madera, residuos agrícolas y de la industria alimentaria y otros residuos orgánicos, son muy abundantes, por lo que es posible seguir aumentando la producción de energía a partir de esos materiales (Cheng, 2018).

La Figura 1.2 muestra la tendencia de producción mundial de biocombustibles (bioetanol y biodiésel, ya que son los de mayor producción a nivel mundial) en Mtep. Como puede verse, la producción de bioetanol en 2018 fue de 60,4 Mtep de las que el 56% se obtuvieron en Norte América. En cuanto al biodiésel, su producción ascendió a 34,9 Mtep y el 37% de esa cantidad se produjo en Europa (BP, 2019). Así, puede observarse que, al contrario de lo que sucede en el resto del mundo, en Europa la producción de biodiésel es más importante que la producción de bioetanol.

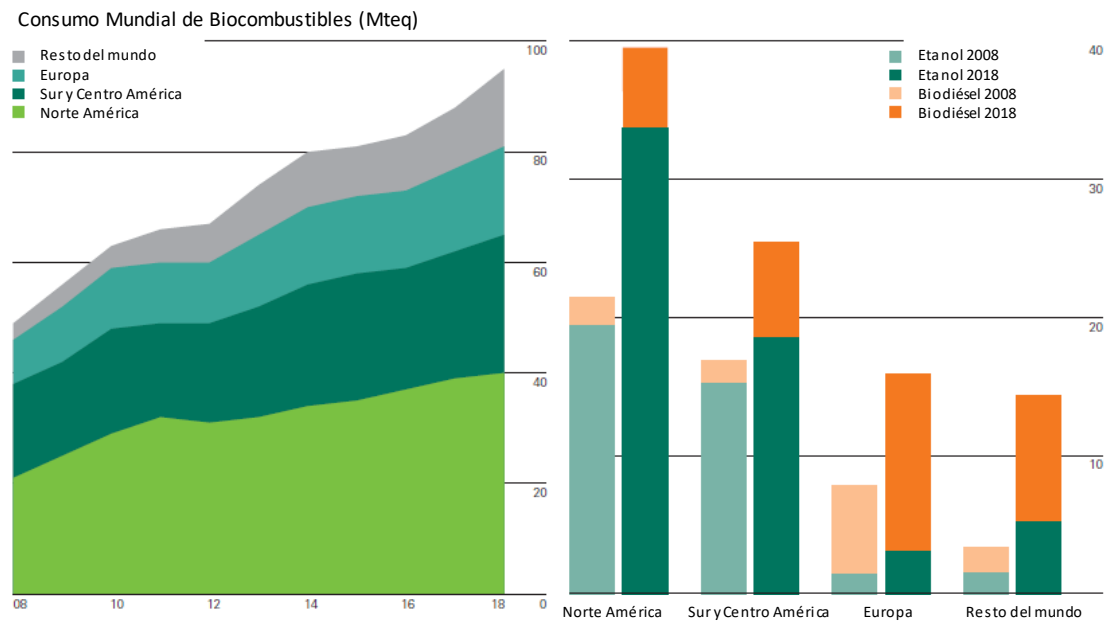


Figura 1.2. Producción mundial de biocombustibles en Mteq (BP, 2019).

1.1.2. Economía circular

La mayoría de los residuos producidos a nivel mundial están destinados a vertederos o, en el peor de los casos, a la eliminación incontrolada, causando daños ambientales y pérdidas económicas. Se han calculado unos costes por inacción en la gestión de residuos de 5 a 10 veces superiores a los que supondría una gestión adecuada, debido a efectos secundarios como la crisis del turismo y el alto coste que implica llevar a cabo una limpieza posterior del medio ambiente contaminado (Wilson y Velis, 2015). Por lo tanto, existe la necesidad urgente de desarrollar una gestión sostenible de residuos enfocada a la mejora del medio ambiente. De este modo, el crecimiento sostenible, basado en una economía más verde, más eficaz en la gestión de recursos y más competitiva, está definido como uno de los puntos clave de la Estrategia Europa 2020 (Comisión Europea, 2010).

La economía circular se define como un sistema regenerativo cuyo objetivo es minimizar tanto la entrada de materiales como la producción de residuos, emisiones y pérdidas de energía cerrando así bucles, flujos económicos y ecológicos de los recursos. Esto se puede lograr mediante diseños duraderos, operaciones de mantenimiento, reparación, reutilización, remanufactura, reformas y reciclaje (Geissdoerfer y col., 2017). El concepto de economía circular ha ganado importancia tanto para responsables políticos como para investigadores y empresas, al verse como una posible solución a problemas ambientales tales como pérdida de

biodiversidad, contaminación de agua, aire y suelo, agotamiento de recursos y excesivo uso del suelo, que están poniendo en peligro el soporte de la vida en la tierra (WWF, 2014).

La economía circular se adapta bien a la gestión futura de los recursos globales, ya que respalda la preservación de recursos vírgenes, optimizando los rendimientos a través de la fabricación de productos más reutilizables, reduciendo la generación de residuos y explotando los recursos renovables (Liguori y Faraco, 2016). Este modelo económico permite realizar el enfoque de las 3R (reusar, reciclar y reducir), lo que proporciona una prevención, minimización y valorización de los residuos, y se recomienda su implementación para resolver el problema de los vertederos y la escasez de los recursos fósiles (Zorpas y col., 2014).

1.1.3. Desarrollo de biorrefinerías

La preocupación actual por la dependencia mundial de los combustibles fósiles junto con las crecientes emisiones de CO₂ a la atmósfera, han llevado a un impulso global de las energías renovables y las tecnologías ecológicas. En este contexto ha surgido la biorrefinería como posible alternativa a las refinerías basadas en el petróleo, potenciando el uso de biomasa no comestible como materia prima para obtener biocombustibles, productos bioquímicos, biomateriales y biopolímeros de gran importancia comercial (Clark y Deswarte, 2015). La biorrefinería basada en residuos lignocelulósicos (agrícolas, forestales, alimentarios, de papel y residuos sólidos urbanos) proporciona una solución económicamente eficaz y prometedora para hacer frente al aumento de la demanda energética y la adecuada gestión de residuos.

Como puede verse en la Figura 1.3, el proceso global de una biorrefinería consta de procesos primarios y procesos secundarios. Los procesos primarios implican llevar a cabo un acondicionamiento y separación de los componentes de la biomasa en productos intermedios, conocidos como plataformas de biorrefinería, entre los que se incluyen: celulosa, almidón, azúcares, lignina, proteínas, etc. Los procesos secundarios incluyen las etapas siguientes de conversión y procesado para producir bioproductos y bioenergía a partir de los intermedios obtenidos en los procesos primarios. Además, los tipos de procesos de conversión utilizados en una biorrefinería, pueden clasificarse en: termoquímicos, físico-químicos y bioquímicos (Nizami y col., 2017). Los termoquímicos, como pirólisis, gasificación, incineración, licuefacción y carbonización, utilizan altas temperaturas para transformar las materias primas en combustibles, electricidad, calor y productos de alto valor añadido. Los procesos físico-

químicos, como la transesterificación, combinan el uso de agentes físicos y reactivos químicos para convertir las materias primas en combustibles y bioproductos. Los procesos bioquímicos, como la digestión anaerobia y la fermentación, utilizan agentes biológicos para convertir diferentes tipos de materias primas en biocombustibles líquidos y gaseosos y bioproductos.

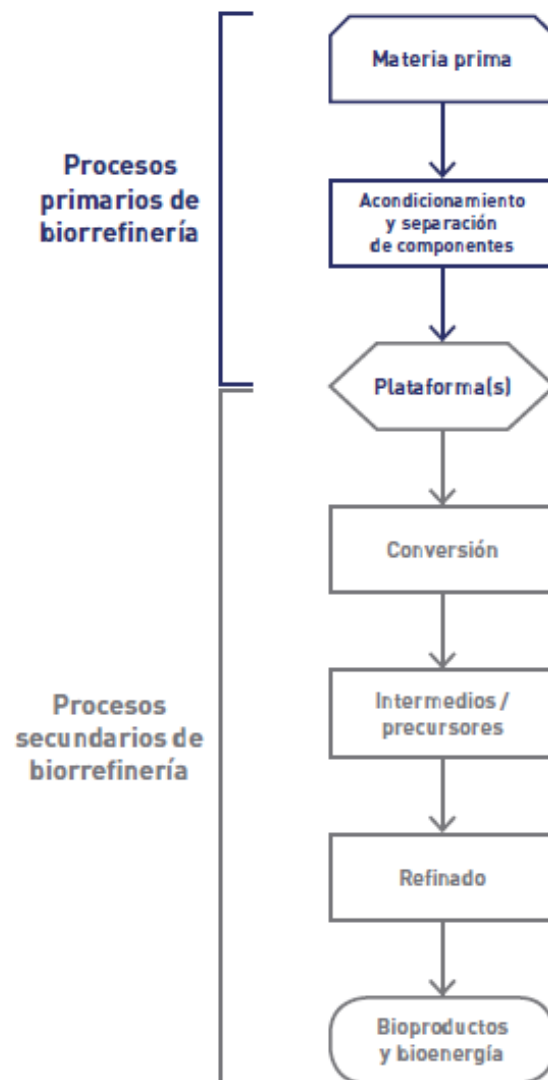


Figura 1.3. Esquema del proceso global de una biorrefinería (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, 2017).

La Figura 1.4 muestra una selección de productos tipo obtenidos en biorrefinerías a partir de biomásas de distinta naturaleza y siguiendo el esquema global del proceso de una biorrefinería. Estos productos se pueden clasificar en dos categorías: productos energéticos (biocombustibles) y productos materiales.

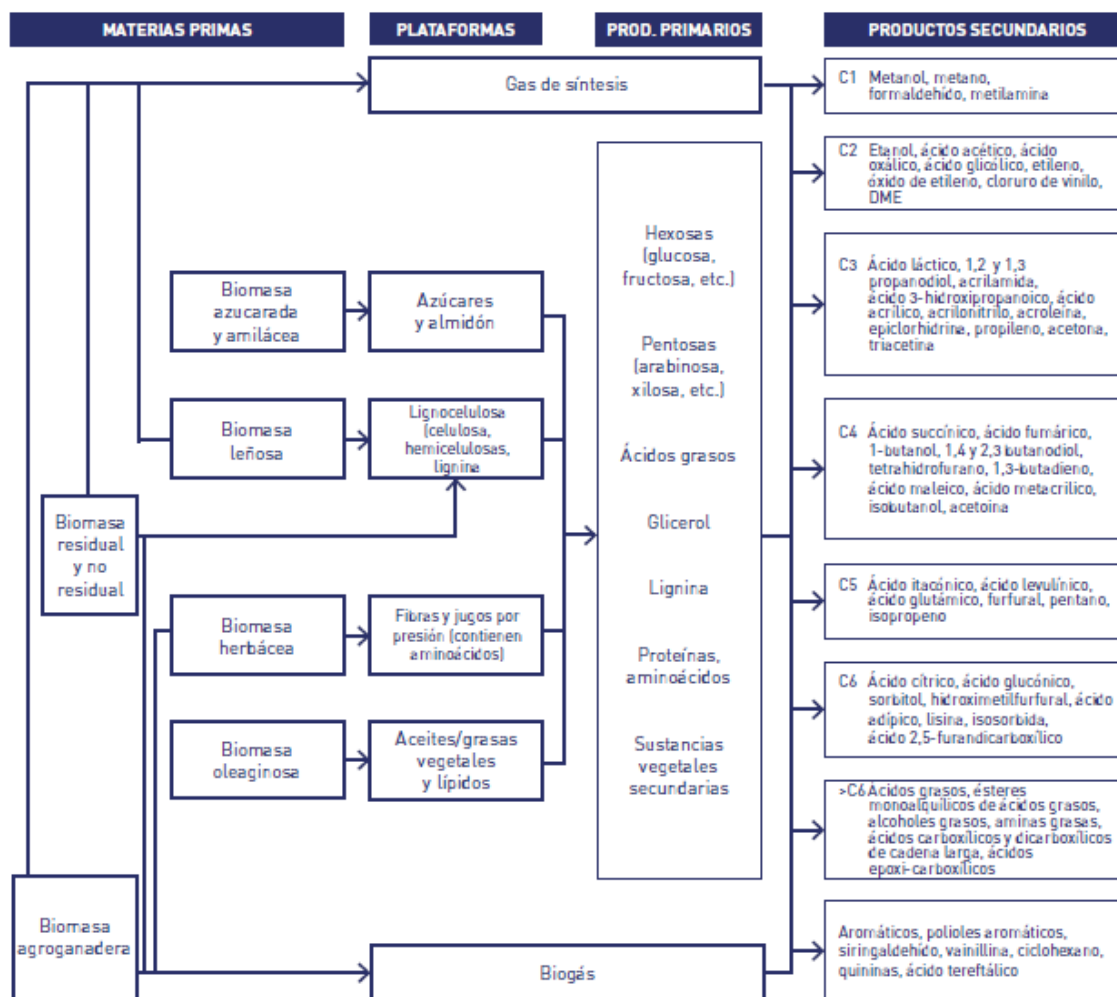


Figura 1.4. Esquema de productos tipo obtenidos en biorrefinerías (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, 2017).

Como consecuencia del constante crecimiento del sector del transporte y de la demanda de biocombustibles renovables producidos a partir de biomasa, el principal reto para el desarrollo de las biorrefinerías es la producción de biocombustibles de manera eficaz y rentable (Cherubini, 2010).

1.1.4. Biocombustibles

El término biocombustible engloba a combustibles sólidos (biomasa tradicional), líquidos (biodiésel, bioaceites y bioalcoholes como el bioetanol o el biobutanol) y gaseosos (biohidrógeno, bioéter, biogás y gas de síntesis o syngas). Los biocombustibles se obtienen a partir de biomasa vegetal abundante y fácilmente disponible, son sostenibles desde el punto

de vista medioambiental y reducen las emisiones de GEI (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, 2017).

Los biocombustibles se pueden clasificar, según las materias primas empleadas en su producción, en:

- Biocombustibles de primera generación: Obtenidos a partir de azúcar, almidón, aceites vegetales o grasas animales, utilizando tecnologías sencillas. Su producción está más desarrollada desde el punto de vista tecnológico, pero generan controversia ya que utilizan cosechas que pueden destinarse a alimentación humana, y por tanto, producen una competencia directa con el suministro de alimentos. Los principales cultivos empleados son el maíz, la caña de azúcar, la soja y los aceites vegetales.
- Biocombustibles de segunda generación: Obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica. Las materias primas empleadas en su producción son variadas, y presentan la ventaja de no ser utilizadas en alimentación humana ni animal. Para su producción, son necesarias unas etapas previas de tratamiento de la biomasa. Sin embargo, los procesos de producción de este tipo de biocombustibles, a partir de lignocelulosa, están todavía en desarrollo (Amiri y Kamiri, 2018).
- Biocombustibles de tercera generación: Producidos a partir de cultivos bioenergéticos específicamente diseñados o adaptados (a menudo mediante técnicas de biología molecular) para obtener altos rendimientos de producción de biocombustibles. En este grupo se encuentran el desarrollo de árboles bajos en lignina, los cultivos con celulasas integradas o las algas y microalgas (Agencia Andaluza de la Energía, 2018).
- Biocombustibles de cuarta generación: Este tipo de biocombustibles van un paso más allá que los de tercera generación, ya que captan y almacenan carbono tanto a nivel de la materia prima como de la tecnología de proceso. Así, los biocombustibles de cuarta generación, comparados con los biocombustibles de otras generaciones, contribuyen más a reducir las emisiones de GEI ya que son más neutros o incluso negativos en carbono (Agencia Andaluza de la Energía, 2018).

1.1.4.1. Biocarburantes líquidos

Los biocarburantes son los biocombustibles utilizados para el transporte y se obtienen a partir de biomasa (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, 2017).

Los biocarburantes líquidos han ganado gran atención a nivel mundial debido a sus características de renovabilidad, sostenibilidad, disponibilidad, desarrollo regional, empleabilidad rural, reducción de las emisiones de GEI y su biodegradabilidad (Demirbas y col., 2011). Dentro de los biocarburantes líquidos destacan el biodiésel, los bioaceites y los bioalcoholes.

Biodiésel

El biodiésel se obtiene a partir de aceites vegetales, grasas animales y otras materias primas ricas en aceites o grasas, mediante un proceso químico llamado transesterificación. Puede ser utilizado en la mayoría de los motores diésel, representando una alternativa respetuosa con el medio ambiente. El biodiésel, a nivel mundial, se utiliza mezclado con el diésel obtenido a partir del petróleo en diferentes porcentajes, aunque en España sólo se comercializa al 7% y 10%. Su uso en el motor diésel convencional reduce sustancialmente las emisiones de hidrocarburos no quemados, monóxido de carbono, sulfatos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrogenados y partículas. Estas reducciones aumentan con el incremento del porcentaje de biodiésel en la mezcla de diésel (Ulusoy y col., 2009). Sin embargo, actualmente los costes de producción del biodiésel representan un gran obstáculo para la comercialización del producto.

Bioaceites

Los bioaceites son combustibles líquidos renovables producidos por la pirólisis rápida de la biomasa. La pirólisis rápida o termólisis, es un proceso en el cual un material (biomasa) es rápidamente calentado a altas temperaturas en ausencia de oxígeno (Thamburaj, 2000). El bioaceite se puede obtener a partir de una amplia variedad de residuos agrícolas y forestales. Sin embargo, aún presentan varios problemas (alta viscosidad, naturaleza ácida, bajo poder calorífico, alto contenido en agua y oxígeno e incompatibilidad con los combustibles fósiles convencionales) que hacen que no se puedan utilizar actualmente como carburantes en medios de transporte. Por este motivo, se están llevando a cabo estudios de adaptación de los bioaceites, para poder utilizarlos como combustibles para el transporte, que están enfocados en dos rutas tecnológicas: la hidrogenación catalítica y el craqueo catalítico.

Bioalcoholes

El bioetanol es el bioalcohol más desarrollado y con mayor producción a nivel mundial. Se utiliza como sustituto de la gasolina, bien como combustible único (E100) o mezclado con ésta en concentraciones del 5%, 10% y 15% (E5, E10 y E15). El bioetanol comercial se obtiene por fermentación alcohólica (realizada fundamentalmente por levaduras) de materias primas azucaradas y de almidones (bioetanol de primera generación), especialmente de la caña de azúcar y del grano de maíz, mientras que su producción a partir de materiales lignocelulósicos (bioetanol de segunda generación) está todavía en desarrollo. Sin embargo, el avance del uso del etanol como combustible se ha visto impedido por una serie de problemas entre los que se encuentran los originados por su contenido en humedad (debido a la gran afinidad que presenta el etanol por el agua), la dificultad de su transporte por tubería y la necesidad de realizar modificaciones en los motores actuales (Amiri y Karimi, 2018).

Aunque la producción mundial de biobutanol es mucho menor, en los últimos años ha aumentado su interés para ser utilizado como biocombustible alternativo, ya que ofrece numerosas ventajas con respecto al etanol: el valor de su capacidad energética (29 MJ L^{-1}) es similar al de la gasolina (32 MJ L^{-1}) y es mucho mayor que el del etanol (16 MJ L^{-1}), es potencialmente menos corrosivo, menos higroscópico, su volatilidad es baja, presenta mayor punto de inflamabilidad, puede ser transportado por las tuberías e instalaciones que ya están construidas y puede ser usado por los motores actuales sin hacer modificaciones (Ibrahim y col., 2018). El biobutanol se puede obtener mediante fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) a partir de una gran variedad de materias primas, entre las que cabe destacar los materiales lignocelulósicos (biobutanol de segunda generación). A diferencia de los microorganismos utilizados habitualmente en la producción de etanol, las bacterias productoras de butanol, bacterias del género *Clostridium*, son capaces de metabolizar las pentosas derivadas de la hemicelulosa además de las hexosas (Green, 2011). De este modo, se consigue una utilización más eficiente de la biomasa lignocelulósica, especialmente cuando el contenido en xilano es elevado. Sin embargo, las bacterias del género *Clostridium* no son capaces de utilizar la lignocelulosa directamente como fuente de carbono, ya que primero hay que hidrolizarla para obtener azúcares sencillos que luego puedan metabolizar. Es necesario trabajar en el desarrollo de tecnologías (selección de materias primas, tratamientos de hidrólisis previa, aumento de rendimiento y productividad y procesos de recuperación de solventes) que ayuden a aumentar la rentabilidad económica de la producción de biobutanol

(Green, 2011), tal como se describe con más detalle en el apartado 1.5. (Retos a superar en la producción de butanol).

1.2. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, pudiendo llegar a representar hasta el 90% (p/p) de su composición en base seca (Balat, 2011). En este tipo de biomasa se incluye gran variedad de materiales (cultivos herbáceos como el *Panicum virgatum*; residuos agrícolas como hojas, tallos, paja, cáscaras y pieles de cereales; residuos de industria agro-alimentaria como el bagazo de cerveza, bagazo de caña de azúcar, residuo de manzana, piel de patata; y otro tipo de residuos como serrín, madera, residuos de papel, etc.). Constituyen una fuente abundante, barata y renovable para la obtención de biocombustibles y otros bioproductos.

1.2.1. Composición y estructura

La biomasa lignocelulósica está formada por fibras de celulosa recubiertas por hemicelulosa y lignina en una estructura tridimensional amorfa (Figura 1.5). La composición relativa de estos tres polímeros varía de una especie vegetal a otra (Tabla 1.1), e incluso para una misma planta se pueden observar diferencias con la fase de crecimiento y otras condiciones (Mussatto y Teixeira, 2010). Además de estos tres componentes, hay otros que se encuentran en menor proporción como extractivos, proteínas y cenizas.

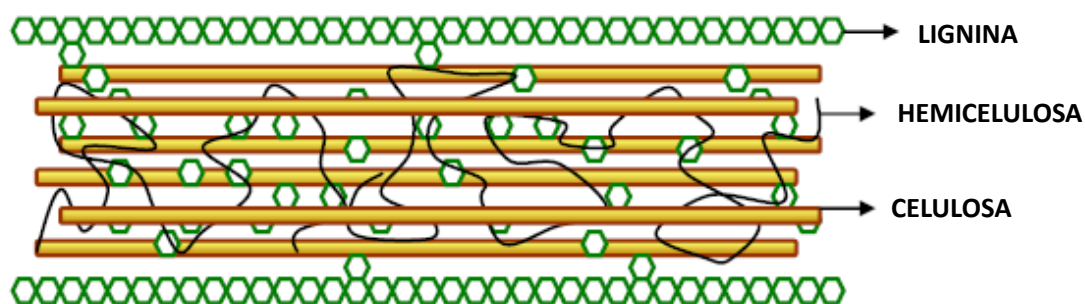


Figura 1.5. Estructura de la lignocelulosa (Mussatto y Teixeira, 2010).

Tabla 1.1. Composición de diferentes materiales lignocelulósicos (% p/p, sobre base seca) (modificada de Mussatto y Teixeira, 2010).

Biomasa Lignocelulósica	Celulosa (% p/p)	Hemicelulosa (% p/p)	Lignina (% p/p)
Paja de cebada	33,8	21,9	13,8
Mazorca de maíz	33,7	31,9	6,1
Tallos de maíz	35,0	16,8	7,0
Tallos de algodón	58,5	14,4	21,5
Paja de arroz	36,2	19,0	9,9
Paja de centeno	37,6	30,5	19,0
Tallos de soja	34,5	24,8	19,8
Paja de trigo	32,9	24,0	8,9
<i>Panicum virgatum</i>	33,0	23,8	4,6
Bagazo de caña de azúcar	40,0	27,0	10,0
Bagazo de manzana	22,7	15,8	19,8
Piel de patata	33,1	7,8	34,7
Bagazo de cerveza	19,2	21,3	16,0
Piel de grano de café	18,4	10,1	27,1

1.2.1.1. Celulosa

La celulosa constituye el componente mayoritario de la biomasa (30-60%, p/p sobre base seca) (Balat, 2011). Es un polímero lineal formado por unidades de glucosa unidas por enlaces O-glucosídicos β -(1,4) (Figura 1.6). Estas cadenas de celulosa se unen entre sí por fuertes enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals dando lugar a microfibrillas (Mussatto y Teixeira, 2010), confiriéndole una estructura cristalina y muy recalcitrante a la degradación. Esta característica es la que diferencia a la celulosa del almidón y es la responsable de que el almidón pueda ser fácilmente hidrolizado por enzimas o ataque ácido dando lugar a glucosa monomérica, y que la celulosa sea mucho más difícil de hidrolizar (Cherubini, 2010). Las microfibrillas de celulosa tienen regiones cristalinas (alrededor de 2/3 de la celulosa total) y regiones amorfas menos ordenadas. Cuanto más ordenada o cristalina es la celulosa, menos soluble y menos degradable es (Taherzadeh y Karimi, 2008).

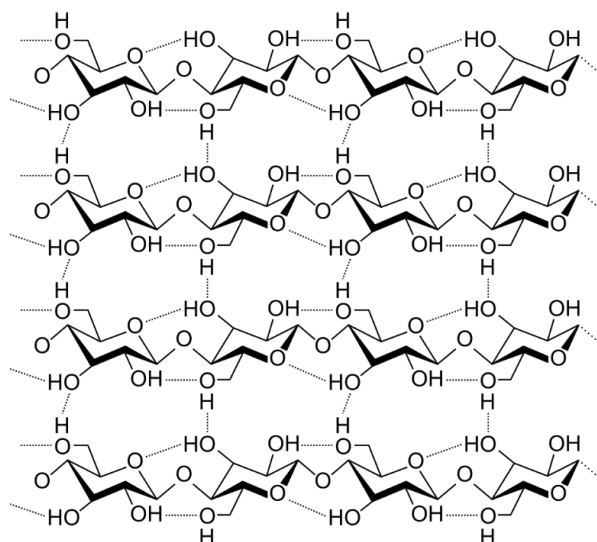


Figura 1.6. Estructura de la celulosa.

1.2.1.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo componente más abundante de la lignocelulosa (20-40%, p/p sobre base seca) (Balat, 2011). Como puede verse en la Figura 1.7, es un polímero corto y altamente ramificado que contiene mayoritariamente xilosa, arabinosa (pentosas), galactosa, glucosa y manosa (hexosas), además de otros componentes como los ácidos acético, glucurónico y ferúlico (Mussatto y Teixeira, 2010). Las cadenas principales de la hemicelulosa pueden estar formadas por unidades de un mismo azúcar repetido (homopolímero) o bien por una mezcla de diferentes azúcares (heteropolímero). La hemicelulosa es más fácilmente hidrolizable que la celulosa debido a su naturaleza amorfa ramificada (Lee y col., 2007).

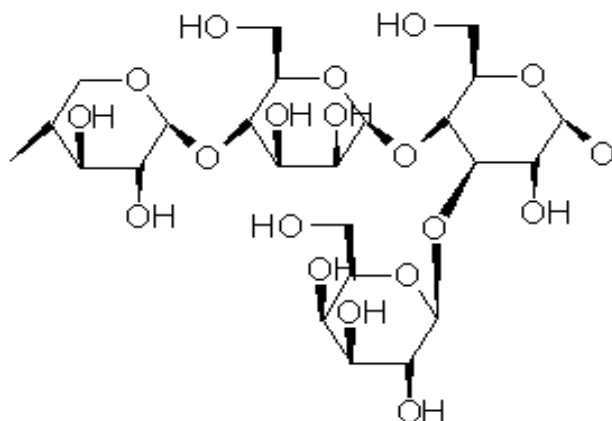


Figura 1.7. Estructura de la hemicelulosa.

1.2.1.3. Lignina

La lignina es la fracción no-carbohidratada más abundante de la lignocelulosa (15-25%, p/p sobre base seca) (Cherubini, 2010). Es un polímero aromático formado por unidades de fenil-propano, grupos metoxilo y compuestos polifenólicos unidos en una larga estructura tridimensional formando una matriz muy compleja (Balat, 2011). Una representación de su estructura puede verse en la Figura 1.8. La lignina está fuertemente unida a la celulosa y la hemicelulosa, proporciona rigidez y cohesión al material de la pared celular, impermeabiliza el xilema y forma una barrera físico-química contra el ataque microbiano (Fengel y Wegener, 1989). La lignina representa uno de los mayores inconvenientes para la obtención de alcoholes por fermentación del material lignocelulósico, ya que lo hace extremadamente resistente a la degradación química y enzimática (Tahezadeh y Karimi, 2008).

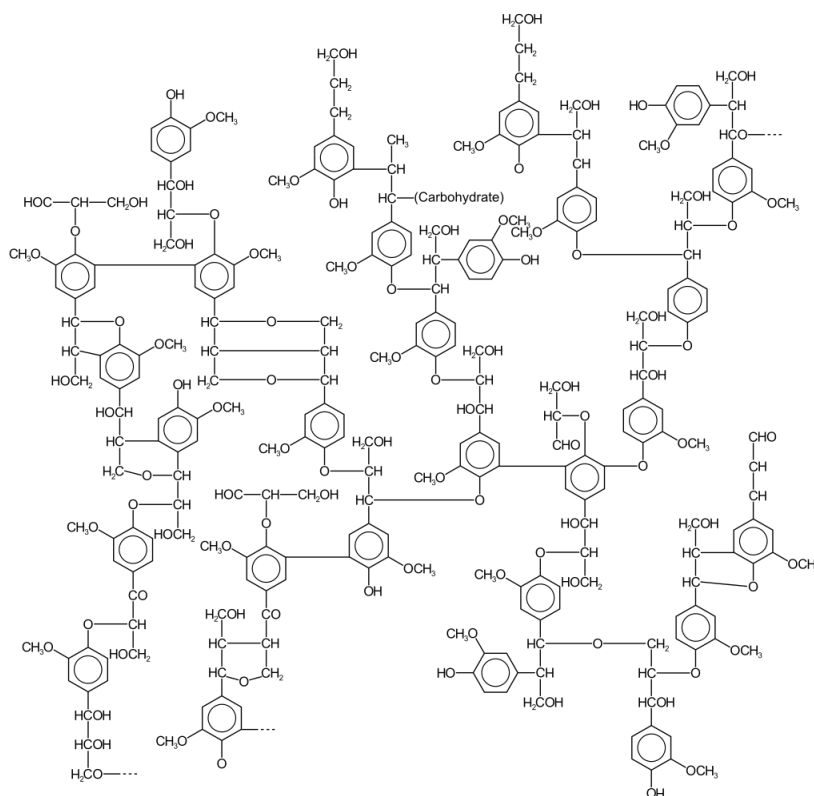


Figura 1.8. Estructura de la lignina.

1.2.1.4. Otros componentes

Aparte de estos tres polímeros mayoritarios, en la biomasa lignocelulósica también se encuentran, en menor proporción, los siguientes constituyentes:

- Almidón: Es un carbohidrato polimérico formado por unidades de glucosa unidas por enlaces O-glucosídicos α -(1-4) que adoptan una estructura enrollada y ramificada (amorfa) que se diferencia de la estructura ordenada y cristalina de la celulosa.
- Pectina: Es un polímero muy ramificado formado por azúcares (ramnosa, galactosa, arabinosa) y ácidos urónicos (principalmente el ácido galacturónico).
- Proteínas.
- Cenizas o material inorgánico.
- Extractivos: Son los compuestos no estructurales que se extraen de la biomasa con agua o con otros disolventes (Sluiter y col., 2010). Podemos diferenciar dos tipos de extractivos:
 - Hidrosolubles: carbohidratos libres (sacarosa, glucosa y fructosa), restos urónicos, taninos solubles en agua, etc.
 - Lipofílicos: compuestos solubles en disolventes orgánicos como esteroides, grasas saturadas e insaturadas, ácidos grasos, alcoholes alifáticos de cadena larga, etc.

1.2.2. Tipos de biomasa lignocelulósica

Las biomásas lignocelulósicas son materias primas ideales para la producción de biocombustibles, ya que están asociadas a un bajo coste económico, gran abundancia y menor generación de GEI. Atendiendo a su procedencia, los materiales lignocelulósicos se pueden clasificar en: materiales de origen agrícola, materiales de origen forestal, materiales de origen industrial, cultivos herbáceos y materiales de origen urbano.

1.2.2.1. Materiales de origen agrícola

En este grupo están incluidos los restos de los cultivos que no son empleados en alimentación humana ni animal como: restos de poda, pajas, tallos, hojas, cáscaras, residuos de granos y hierba. Las principales características de estos residuos son su producción estacional, que hace que la disponibilidad del material sea variable a lo largo del año, y su elevada humedad. Estudios realizados con este tipo de residuos han demostrado que son adecuados para producir azúcares fermentables y bioalcoholes (Procentese y col., 2017).

1.2.2.2. Materiales de origen forestal

Los materiales forestales representan otro tipo de biomasa lignocelulósica que también resulta interesante para la producción de biocombustibles. En este grupo, además de la madera procedente de los bosques, cabe destacar residuos como cortezas, serrín, trozos de madera, licor negro de la producción de pasta de papel, etc. El Plan de Acción Forestal de la UE (Comisión Europea, 2013) promueve el uso de materiales forestales como fuente de energía siempre que la superficie de bosque no disminuya.

1.2.2.3. Materiales de origen industrial

Los procesos agro-industriales generan gran cantidad de residuos que tienen un alto contenido en carbohidratos y, por tanto, también pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles (Mirabella y col., 2014). El bagazo de la caña de azúcar es el residuo industrial de la producción de azúcar y constituye uno de los residuos agrícolas más abundantes del mundo (Pang y col., 2016). Otros residuos agro-industriales, cuya producción a nivel europeo es muy elevada, son el bagazo de manzana, la piel de patata, el bagazo de cerveza y la piel del grano de café (Procentese y col., 2019).

1.2.2.4. Cultivos herbáceos

Entre los cultivos energéticos herbáceos perennes destacan, entre otros, pasto varilla (*Panicum virgatum* L.), carrizo (*Phragmites australis*), miscanthus (*Miscanthus* spp. Anderss.), hierba cinta (*Phalaris arundinacea* L.) y caña común (*Arundo donax* L.). Este tipo de cultivos presenta una serie de ventajas para ser utilizados como materias primas en la producción de biocombustibles: requieren bajos costes para su producción, no necesitan una resiembra anual y se pueden cultivar en terrenos marginales (McKendry, 2002). También presentan beneficios ambientales como la disminución en la erosión del suelo o el aumento de la captura de carbono y proporcionan un adecuado hábitat para la vida silvestre (Frank y col., 2004).

1.2.2.5. Materiales de origen urbano

En este grupo se incluyen los residuos procedentes de jardines y parques como césped y hojas, y también los residuos procedentes de actividades humanas como el papel usado, cartón, residuos sólidos urbanos, etc.

1.3. Butanol

1.3.1. Antecedentes

El 1-butanol o *n*-butanol es un alcohol de cuatro átomos de carbono que se utiliza como precursor químico para la obtención de pinturas, polímeros y plásticos y también como disolvente. Además, en los últimos años, el butanol ha captado la atención por su potencial uso como biocombustible avanzado, ya que no cuenta con la mayoría de las limitaciones que presenta el bioetanol. Como se muestra en la Tabla 1.2, el butanol como biocombustible presenta las siguientes ventajas sobre el etanol: mayor contenido energético, menor volatilidad y mayor punto de inflamabilidad (que lo convierten en un producto más seguro), es menos higroscópico y menos corrosivo para las tuberías, posee mayor miscibilidad con gasolina, no requiere modificaciones en los motores de combustión interna y puede ser utilizando mediante la infraestructura de distribución de combustibles actual.

Tabla 1.2. Propiedades de diésel, gasolina, etanol y butanol (Jin y col., 2011).

Propiedad	Diésel	Gasolina	Etanol	Butanol
Fórmula molecular	C ₁₂ - C ₂₅	C ₄ - C ₁₂	C ₂ H ₅ OH	C ₄ H ₉ OH
Índice de cetano	40 - 55	0 - 10	8	25
Índice de octano	20 - 30	80 - 99	108	96
Densidad a 20 °C (g mL ⁻¹)	0,82 - 0,86	0,72 - 0,78	0,79	0,81
Temperatura de autoignición (°C)	210	300	434	385
Punto de inflamabilidad (°C)	65 - 88	(-45) - (-38)	8	34
Poder calorífico inferior (MJ kg ⁻¹)	42,5	42,7	26,8	33,1
Punto de ebullición (°C)	180 - 370	25 - 215	78,4	117,7
Calor latente (ΔH°_v) a 298 K (kJ kg ⁻¹)	270	380 - 500	904	582
Límites de inflamabilidad (% vol)	1,5 - 7,6	0,6 - 8,0	4,3 - 19,0	1,4 - 11,2
Presión de saturación a 38°C (kPa)	1,9	31,0	13,8	2,3
Viscosidad a 40 °C (mm ² s ⁻¹)	1,9 - 4,1	0,4 - 0,8	1,1	2,6

Al igual que el etanol, el butanol puede ser producido por vía fermentativa o petroquímica. Los principales procesos basados en la ruta petroquímica que permiten la obtención de butanol son los siguientes (Malmierca y col., 2017):

- Hidroformilación de propileno seguido de hidrogenación de los aldehídos obtenidos.
- Condensación aldólica de acetaldehído y posterior hidrogenación del crotonaldehído.

- A partir del propileno mediante el proceso Reppe.

De manera alternativa, el butanol es producido por fermentación de carbohidratos, mediante fermentación ABE, en la que los productos mayoritarios obtenidos son: acetona, butanol y etanol. La fermentación ABE fue descubierta por el microbiólogo francés Louis Pasteur en 1891 (Kumar y Gayen, 2011). El primer proceso de producción de biobutanol a escala industrial utilizó melazas y granos de cereal fermentados por *Clostridium acetobutylicum* (proceso Weizmann) en los años 1912-1914 (Kumar y Gayen, 2011). Este proceso de producción de butanol fue el más utilizado a nivel industrial hasta los años 60 en que, por aspectos económicos, fue sustituido por la ruta petroquímica más competitiva en cuanto a costes de producción (Ndaba y col., 2015).

En 2005 se reconoció la capacidad del butanol para ser utilizado como biocombustible y se demostró que, aunque su uso pueda suponer un aumento en el volumen consumido del 9% respecto a los combustibles fósiles, las emisiones de GEI se pueden reducir hasta en un 50% en comparación con la gasolina (Pereira y col., 2015). Sin embargo, hay todavía aspectos importantes que mejorar en la bio-producción de butanol, como son los bajos rendimientos de producción y los elevados costes económicos del proceso y las materias primas. Para aumentar las ventajas del uso del biobutanol como combustible, es necesario desarrollar tecnologías que permitan utilizar materias primas de segunda generación (no comestibles) que abaraten los precios. El uso de material lignocelulósico y residuos agro-alimentarios, además de ser más sostenible, reduce la huella de carbono y las emisiones de GEI (Green, 2011). Además, el incremento de los precios del petróleo también ha contribuido a renovar el interés en la obtención de butanol mediante rutas fermentativas.

1.3.2. Etapas del proceso de producción de biobutanol a partir de biomásas lignocelulósicas

La obtención de butanol a partir de lignocelulosa (segunda generación) implica una fermentación anaerobia de azúcares sencillos mediante bacterias del género *Clostridium*. El proceso de producción consta de tres etapas principales (Figura 1.9): pretratamiento de la biomasa, hidrólisis enzimática de la celulosa y fermentación de los azúcares hidrolizados. Además, aunque no ha sido objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, una vez finalizada la fermentación, se realiza una etapa de recuperación de los solventes obtenidos, habitualmente mediante procesos de destilación.

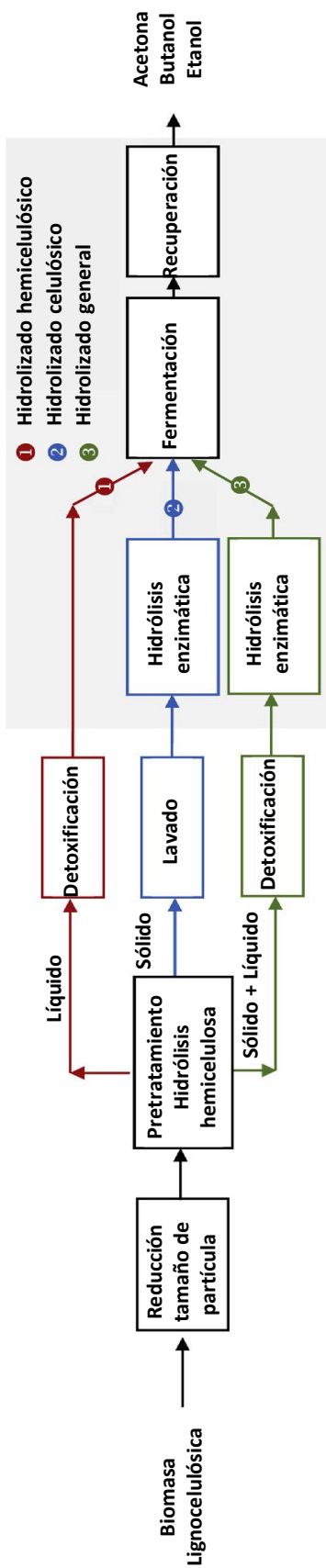


Figura 1.9. Esquema del proceso de obtención de biobutanol (Amiri y Karimi, 2018).

1.3.2.1. Pretratamiento

El objetivo principal del pretratamiento es aumentar la accesibilidad de la celulosa por los enzimas para incrementar la efectividad de la posterior etapa de hidrólisis. Durante el pretratamiento se producen uno o más de los siguientes cambios físico-químicos en la estructura de la lignocelulosa: reducción del tamaño de partícula y aumento del área superficial, modificación de la estructura de la lignina, disolución de la hemicelulosa y/o lignina, reducción de la estructura cristalina de la celulosa y pre-hidrólisis de la celulosa mediante reducción de su grado de polimerización (Rajendran y col., 2018). Como los distintos materiales lignocelulósicos tienen características físico-químicas diferentes, es necesario adaptar los pretratamientos a cada materia prima. La elección del pretratamiento tiene un gran impacto en las siguientes etapas del proceso, ya que además de afectar a la digestibilidad de la celulosa, también genera compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación ABE (Amiri y Karimi, 2018). Más adelante, en el apartado 1.4.1 (Origen y tipos de compuestos inhibidores), se presenta información detallada sobre el origen y tipos de compuestos inhibidores de la fermentación ABE que son generados en el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos. Se ha desarrollado una multitud de métodos de pretratamiento durante las últimas décadas. Sin embargo, desde el punto de vista económico, el pretratamiento sigue siendo uno de los procesos más costosos en el escalado industrial (Alvira y col., 2010). Los pretratamientos pueden ser clasificados en físicos, físico-químicos, químicos y biológicos, tal y como se describe con mayor detalle en los siguientes apartados.

Pretratamientos físicos

Normalmente consisten en una trituración o molienda de la biomasa para disminuir el tamaño de partícula. De este modo, se consigue aumentar el área superficial y disminuir el grado de polimerización y la cristalinidad de las fibras de celulosa. Los pretratamientos físicos se suelen aplicar seguidos de un pretratamiento químico o físico-químico (Rajendran y col., 2018).

Pretratamientos físico-químicos

Autohidrólisis. Las reacciones de hidrólisis tienen lugar cuando la biomasa se trata en medio acuoso con una temperatura comprendida entre 150 y 230 °C (Amiri y Karimi, 2018). De este modo, la hemicelulosa es parcialmente hidrolizada, dando lugar a oligosacáridos y monosacáridos, la lignina disminuye su grado de polimerización y la celulosa aumenta su

digestibilidad enzimática (Alvira y col., 2010). Sin embargo, las altas temperaturas alcanzadas en este pretratamiento generan productos de degradación de azúcares (Karunanithy y Muthukumarappan, 2011). Varios trabajos de producción de biobutanol han dado resultados satisfactorios utilizando la autohidrólisis como pretratamiento de distintas biomásas: madera de pino y madera de olmo (Amiri y Karimi, 2015), piel de patata (Hijosa-Valsero y col., 2018a) o piel de grano de café (Hijosa-Valsero y col., 2018b), entre otros.

Explosión por vapor (steam explosion): La biomasa se calenta con vapor a alta presión durante unos pocos minutos y a continuación se somete a una descompresión súbita hasta presión atmosférica. Como resultado, se produce una alteración en la estructura de las fibras de la lignocelulosa. La explosión por vapor es un proceso que normalmente opera en el intervalo de 160 a 260 °C entre 0,5 y 20 min (Rajendran y col., 2018), transforma la lignina y solubiliza la hemicelulosa mejorando la hidrólisis enzimática de la celulosa. Su principal inconveniente es la generación de compuestos inhibidores que pueden afectar a las etapas posteriores. Se ha estudiado la producción de biobutanol a partir de biomásas como la madera de álamo (Yu y col., 1984), rastrojo de maíz (Wang y Chen, 2011) o paja de trigo (Bellido y col., 2014), que fueron pretratadas mediante explosión por vapor.

Explosión con amoníaco (AFEX) y explosión con CO₂: Son similares a la explosión con vapor, ya que estos pretratamientos también se realizan a alta presión y temperatura, durante unos pocos minutos, seguidos de una descompresión súbita.

En el caso de la *explosión con CO₂*, la biomasa es expuesta a dióxido de carbono supercrítico, lo que produce un aumento del área de superficie accesible de la biomasa sin generar compuestos de degradación de azúcares (Alvira y col., 2010).

El pretratamiento de la biomasa mediante *explosión con amoníaco* tampoco genera compuestos de degradación de azúcares (furanos, ácido levulínico y ácido fórmico) (Chiaramonti y col., 2012). Sin embargo, el precio del amoníaco y la dificultad para su recuperación ha impedido un mayor desarrollo de este pretratamiento (Karunanithy y Muthukumarappan, 2011). La eficacia del tratamiento de explosión con amoníaco depende del contenido en lignina de la biomasa, siendo más eficaz para las biomásas cuyo contenido es bajo (Chiaramonti y col., 2012). Ezeji y Blaschek (2008) estudiaron la obtención de butanol mediante fermentación ABE a partir de granos secos de destilería con solubles (DDGS)

sometidos a un pretratamiento de explosión con amoníaco seguido de una hidrólisis enzimática.

Pretratamientos químicos

Agentes oxidantes: Los agentes oxidantes más utilizados para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica son el ozono y el oxígeno o el aire. Estos agentes oxidantes se utilizan en medio acuoso para tratar la biomasa y, además, se suelen combinar con otros reactivos químicos.

La *ozonólisis*, que se realiza a temperatura ambiente, es efectiva para degradar lignina y consigue altos rendimientos de hidrólisis de azúcares sin formación de furanos (Travaini y col., 2016). Sin embargo, el ozono es un reactivo caro y hay varios problemas sin resolver en relación a su escalado y seguridad. Algunas biomásas como la paja de trigo (Bellido y col., 2014) y el bagazo de caña de azúcar (Travaini y col., 2016), han sido utilizadas en la producción de butanol después de haber sido pretratadas con ozono, seguido de una etapa de hidrólisis enzimática.

La *oxidación húmeda* es otro pretratamiento en el que se utiliza aire u oxígeno. La temperatura de operación alcanzada en este pretratamiento está en el intervalo de 150 a 200 °C y suele aplicarse durante un periodo de tiempo próximo a los 30 minutos (Rajendran y col., 2018). Durante la oxidación húmeda, la lignina se descompone en dióxido de carbono, agua y ácidos carboxílicos (Brodeur y col., 2011), la hemicelulosa se rompe en azúcares monoméricos y la celulosa es parcialmente degradada (Rajendran y col., 2018). Se han encontrado varios trabajos que han empleado la oxidación húmeda como método de pretratamiento para bagazo de caña de azúcar (Martín y col., 2008), cáscara de arroz (Banerjee y col., 2009) o carrizo (Szijártó y col., 2009), entre otros. Sin embargo, ninguno de estos trabajos ha estudiado el comportamiento de los hidrolizados obtenidos para la obtención de butanol.

Alcalinos: Consisten en utilizar disoluciones alcalinas (sosa, potasa, hidróxido de calcio, amoníaco) para pretratar la biomasa. Los pretratamientos alcalinos disuelven lignina, evitan la fragmentación de la hemicelulosa y aumentan la accesibilidad de los enzimas a la celulosa y hemicelulosa (Chiaramonti y col., 2012). Los pretratamientos alcalinos pueden ser realizados a temperatura ambiente y presión atmosférica durante varias horas o incluso días y también a altas temperaturas (100-160 °C) durante pocos minutos (Rajendran y col., 2018). La corriente

líquida del pretratamiento suele ser descartada, ya que contiene varios inhibidores, especialmente compuestos fenólicos procedentes de la lignina. La mayoría de los carbohidratos quedan retenidos en el sólido pretratado. Los principales inconvenientes de estos pretratamientos están en el precio demasiado elevado de los reactivos alcalinos y las dificultades de su recuperación y reutilización (Karunanithy y Muthukumarappan, 2011). Pueden encontrarse trabajos de producción de biobutanol a partir de diversas biomásas lignocelulósicas sometidas a pretratamientos alcalinos como tallos de maíz (Cai y col., 2016), *P. virgatum* y carrizo (Gao y col., 2014) y bagazo de caña de azúcar (Pang y col., 2016), entre otros.

Ácidos: Implican el uso de ácidos, principalmente sulfúrico, nítrico o clorhídrico para solubilizar la fracción hemicelulósica de la biomasa y permitir que la celulosa quede más accesible para que la posterior etapa de hidrólisis enzimática sea más eficaz. El pretratamiento ácido se puede llevar a cabo bajo dos tipos de condiciones diferentes: pretratamiento con ácido diluido (a alta temperatura y baja concentración de ácido) o pretratamiento con ácido concentrado (a baja temperatura y alta concentración de ácido). Los pretratamientos con ácido concentrado permiten obtener unos rendimientos mayores que los que utilizan ácidos diluidos, pero son procesos altamente corrosivos por lo que requieren del uso de materiales especiales de elevado coste, además del gran impacto ambiental que generan. El pretratamiento con ácidos diluidos es el método más favorable para aplicaciones industriales y ha sido utilizado para pretratar una gran variedad de biomásas lignocelulósicas (Chiaramonti y col., 2012). Este tipo de pretratamiento presenta la ventaja de solubilizar la hemicelulosa y convertirla en azúcares fermentables. Sin embargo, también se obtienen productos de degradación de azúcares como el furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) y compuestos aromáticos procedentes de la degradación de la lignina, que afectan al metabolismo de los microorganismos en la etapa de fermentación (Alvira y col., 2010). Además, estos pretratamientos necesitan utilizar material resistente a la corrosión y la neutralización de la biomasa pretratada antes de ser sometida a la etapa posterior de hidrólisis enzimática (Karunanithy y Muthukumarappan, 2011). Se han publicado varios trabajos de obtención de biobutanol a partir de diversas biomásas pretratadas químicamente con ácidos diluidos, como salvado de trigo (Liu y col., 2010), bagazo de cerveza (Plaza y col., 2017), paja de maíz y *P. virgatum* (Qureshi y col., 2010), entre otros.

Organosolv: Consiste en utilizar disolventes orgánicos puros o mezclados con agua, para descomponer y solubilizar los constituyentes de la biomasa, en particular la lignina, dejando la celulosa más accesible para la hidrólisis enzimática. Los disolventes más empleados para realizar este pretratamiento son: metanol, etanol, acetona, etileno, glicol y alcohol tetrahidrofurfurílico. En algunos trabajos, estas mezclas se han combinado con catalizadores ácidos (clorhídrico, sulfúrico, oxálico o salicílico) para romper los enlaces de la hemicelulosa. Una etapa crucial la constituye la recuperación de los disolventes utilizados en el proceso, ya que pueden actuar como inhibidores de las etapas posteriores de hidrólisis enzimática y/o fermentación (Sun y Cheng, 2002). Además, su recuperación disminuye los costes de operación al permitir su reutilización (Alvira y col., 2010). González-Peñas y col. (2018) y Li y col. (2018) estudiaron la producción de butanol a partir de madera de haya y madera de pino, utilizando pretratamiento con disolventes orgánicos.

Líquidos iónicos: Son sales, típicamente compuestas por grandes cationes orgánicos y pequeños aniones inorgánicos, que se encuentran en estado líquido a temperaturas relativamente bajas. Se les conoce también como “disolventes verdes”. Entre sus propiedades se incluyen la estabilidad química y térmica, no inflamabilidad, presiones de vapor bajas y tendencia a permanecer líquidos en un amplio rango de temperaturas (Hayes, 2009). Los líquidos iónicos actúan rompiendo los enlaces covalentes entre los polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina, minimizando la formación de productos de degradación. Muchos de los compuestos utilizados como líquidos iónicos presentan el inconveniente de inactivar irreversiblemente las celulasas que se utilizan en la posterior etapa de hidrólisis enzimática, por lo que resulta necesario eliminarlos completamente del medio (Brodeur y col., 2011). Sin embargo, debido a sus bajas presiones de vapor, los líquidos iónicos pueden recuperarse casi en su totalidad en un gran número de operaciones. Este tipo de pretratamiento ha sido documentado en el proceso de obtención de biobutanol por autores como Xing y col. (2018) que lo han aplicado a la paja de arroz y Xu y col. (2016) que lo han utilizado para el pretratamiento de paja de maíz.

Pretratamientos biológicos

Implican el uso de microorganismos, especialmente hongos, que degradan la lignina y solubilizan la hemicelulosa. La celulosa es el componente más resistente al ataque biológico, aunque existen ciertos microorganismos que tienen capacidad celulolítica. Las ventajas de estos pretratamientos se fundamentan en que no utilizan productos químicos, los

requerimientos energéticos son muy bajos, no se generan compuestos inhibidores y se utilizan condiciones ambientales suaves. La gran desventaja que presentan para su desarrollo industrial es la velocidad de transformación de la lignocelulosa en azúcares fermentables, que es excesivamente baja en comparación con el resto de pretratamientos (Sun y Cheng, 2002). Hay algunos trabajos publicados sobre degradación de biomasa utilizando pretratamientos biológicos con hongos, como el desarrollado por Castoldi y col. (2014) que utilizaron los hongos de podredumbre blanca para degradar con éxito serrín de eucalipto. Sin embargo, no se ha encontrado ningún trabajo de producción de biobutanol a partir de biomasa sometida a pretratamientos biológicos.

1.3.2.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso que consiste en usar enzimas, principalmente celulasas y hemicelulasas, que degradan carbohidratos, para hidrolizar biomasa lignocelulósica liberando azúcares fermentables (Balat, 2011). La celulosa es hidrolizada por unos enzimas llamados celulasas que son producidos por bacterias y hongos. Dentro de las celulasas existen tres tipos de enzimas: endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas, cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa originando azúcares sencillos. Las endoglucanasas atacan las regiones amorfas de la celulosa y rompen aleatoriamente los enlaces internos de las cadenas de glucano creando extremos libres; las celobiohidrolasas rompen los extremos de las cadenas liberando celobiosa, glucosa y celuoligómeros de bajo peso molecular; y las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa liberando dos moléculas de glucosa y también liberan glucosa de los extremos no reductores de los celuoligómeros solubles (Balat, 2011).

La Figura 1.10 muestra una representación esquemática de la hidrólisis enzimática de la celulosa.

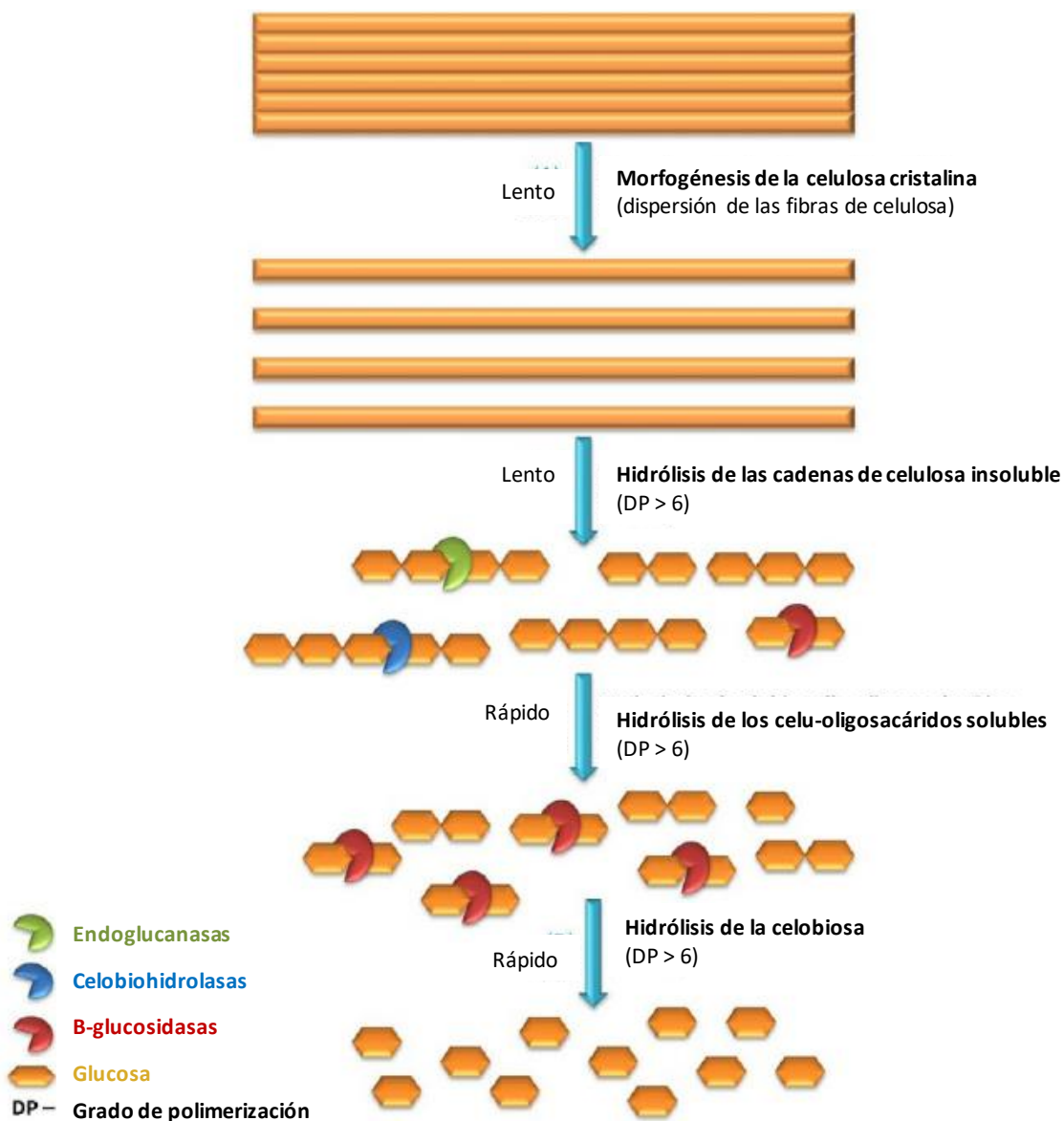


Figura 1.10. Esquema del proceso de hidrólisis enzimática de la celulosa (Arantes y Saddler, 2010).

Hay que destacar el alto efecto sinérgico que se produce entre las endoglucanasas y las celobiohidrolasas, que es necesario para que haya una eficiente hidrólisis de la celulosa (Behera y col., 2017). Además, los productos liberados por las endoglucanasas y celobiohidrolasas, especialmente la celobiosa, producen un fuerte efecto inhibitorio en la actividad de ambas enzimas, por lo que se requiere la presencia de β -glucosidasas, que degraden la celobiosa, para que la hidrólisis transcurra de manera eficaz (Behera y col., 2017). Por tanto, si el complejo de celulosa no tiene suficiente actividad de β -glucosidasa, es necesaria una suplementación externa para aumentar la eficiencia enzimática (Pallapolu y col., 2011). La hidrólisis parcial del xilano (xilooligómeros insolubles que quedan en la biomasa

pretratada) también ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad enzimática de las celulasas (Quing y Wyman, 2011). Aunque se pudieran utilizar condiciones más severas de pretratamiento para hidrolizar más xilano de la biomasa, se aumentaría la degradación de azúcares, disminuyendo el rendimiento y aumentando el efecto inhibitor. Por lo tanto, sería más eficaz utilizar un cóctel de endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas, xilanasas, β -xilanasas y otros enzimas que puedan hidrolizar completamente la celulosa y hemicelulosa a azúcares monoméricos y reduzcan así la inhibición de las celulasas por los xilooligómeros (Quing y Wyman, 2011).

Aparte de la inhibición de la actividad enzimática generada por los productos, hay otros factores que afectan a la hidrólisis enzimática de la celulosa, entre los que se encuentran la naturaleza del sustrato y el tipo de pretratamiento al que ha sido sometido, la actividad de las celulasas y las condiciones de la reacción enzimática (principalmente pH, temperatura y tiempo). Para mejorar el rendimiento y la velocidad de la etapa de hidrólisis enzimática, los trabajos publicados se enfocan en la optimización del proceso de hidrólisis y en el aumento de la actividad enzimática (Behera, 2017). La velocidad de hidrólisis enzimática depende de factores estructurales de la celulosa como: estructura molecular, cristalinidad, área superficial, grado de hinchazón de las fibras, grado de polimerización y lignina asociada (Balat, 2011). De este modo, la hidrólisis enzimática necesita ser optimizada para cada biomasa pretratada, es decir, en función de la naturaleza del material y pretratamiento realizado. En bibliografía se pueden encontrar numerosos trabajos de optimización de la etapa de hidrólisis enzimática, usando como sustrato distintas biomásas pretratadas, para la obtención de azúcares fermentables (Marcos y col., 2013; Ruangmee y Sangwichien, 2013; Sarchami y Rehmann, 2014).

1.3.2.3. Fermentación ABE

Los hidrolizados obtenidos después del pretratamiento y la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa contienen pentosas y hexosas que pueden ser transformadas en butanol mediante fermentación ABE.

Microorganismos

Las bacterias del género *Clostridium* son los principales microorganismos que realizan la fermentación ABE. Algunas de estas bacterias son *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum*, *C. aurantibutyricum* y *C. sporogenes* (Karimi y col., 2015; Ni y Sun, 2009).

Las especies *C. beijerinckii* y *C. acetobutylicum* son las más comunes para llevar a cabo la fermentación ABE y, tanto sus cepas silvestres como las modificadas han sido, hasta la fecha, las más estudiadas (Karimi y col., 2015). *C. acetobutylicum* (bacteria grampositiva, con forma de bacilo, anaerobia estricta y que forma esporas) fue el primer microorganismo empleado en fermentaciones industriales para producir acetona y butanol, a partir de azúcar y granos de almidón, durante la primera mitad del siglo XX (Kumar y Gayen, 2011). *Clostridium* spp. es capaz de utilizar una gran variedad de azúcares sencillos (glucosa, xilosa, galactosa, etc.) y disacáridos (sacarosa, maltosa, lactosa, etc.) para la producción ABE a través de una ruta intracelular compleja (Loyarkat y col., 2013). La selección de la cepa bacteriana para la producción de butanol depende de varios factores, entre los que se pueden citar: tipo de sustrato, requerimiento de nutrientes, tolerancia al butanol, rendimiento y concentraciones deseadas, y resistencia a bacteriófagos y antibióticos (Bharathiraja y col., 2017).

Composición del medio

La concentración de los componentes del medio, incluida la fuente de carbono, afecta significativamente al rendimiento de la fermentación ABE. Así, en el caso de *Clostridium* spp., se ha observado inhibición de crecimiento celular en medios con concentraciones de azúcares mayores de 100 g L⁻¹ (Ibrahim y col., 2018). Del mismo modo, cuando la concentración de azúcares es menor de 40 g L⁻¹, se ha observado mayor rendimiento de producción de ácidos que de solventes, lo que conduce a una inhibición de las células a partir de las 48 h de inicio de la fermentación (Ibrahim y col., 2018). La composición de la mezcla de azúcares que se encuentran habitualmente presentes en los hidrolizados de lignocelulosa (glucosa, xilosa, arabinosa y otros azúcares fermentables), también afecta al rendimiento de la fermentación. Así, la glucosa es preferida a la xilosa debido a los mecanismos genéticos de regulación del transporte y metabolismo de los azúcares (Jiang y col., 2014). Sin embargo, hay varios estudios que demuestran que la mezcla de azúcares del hidrolizado produce un rendimiento comparable al de la fermentación de la glucosa comercial (Ezeji y col., 2004; Liu y col., 2010). Fond y col. (1986) documentaron que la presencia de xilosa en el hidrolizado aumenta la ingesta de glucosa y la reasimilación del ácido por las células de *Clostridium* y, por lo tanto, aumenta el rendimiento de producción de solvente. Aparte de la fuente de carbono, también es necesaria una adecuada cantidad de nitrógeno en el medio. Además de esto, la adición de suplementos al medio (principalmente sales inorgánicas como FeSO₄·7H₂O, MgSO₄·7H₂O, fosfatos y sales amónicas) aumenta la producción de butanol (Ibrahim y col., 2018).

Ruta metabólica de la fermentación ABE

Los principales compuestos producidos por *Clostridium* spp. pueden clasificarse en tres categorías: solventes (acetona, butanol y etanol), ácidos orgánicos (ácido butírico, ácido acético y ácido láctico) y gases (hidrógeno y dióxido de carbono) (Karimi y col., 2015). La producción de solventes por fermentación ABE mediante *Clostridium* spp. suele ajustarse a la relación 3:6:1 (acetona:butanol:etanol) (Bharathiraja y col., 2017), pudiendo alcanzar una concentración de butanol de 12 g L⁻¹ en fermentaciones con cepas silvestres y de 20 g L⁻¹ si se utilizan cepas sometidas a mutación (Karimi y col., 2015).

La fermentación ABE es un proceso bifásico, que comienza con una fase de acidogénesis y continúa con una segunda fase de solventogénesis. En la fase de acidogénesis las bacterias crecen exponencialmente y se produce la formación de ácidos (1 mol de glucosa puede producir 2 moles de ácido acético o 1 mol de ácido butírico) (Figura 1.11), resultando en una disminución del pH del medio hasta un valor próximo a 4,5 (Kumar y Gayen, 2011). De este modo, si no se controla adecuadamente el pH, se produce una inhibición de la ruta metabólica conocido como “estrés ácido”, debido a que la producción de los ácidos es más rápida que su consumo por las células (Kumar y Gayen, 2011). En la fase de solventogénesis se detiene el crecimiento y las células comienzan el proceso de esporulación y tiene lugar la transformación de los ácidos en solventes. De este modo, el ácido acético puede transformarse en acetona o etanol y el ácido butírico en butanol (Loyarkat y col., 2013).

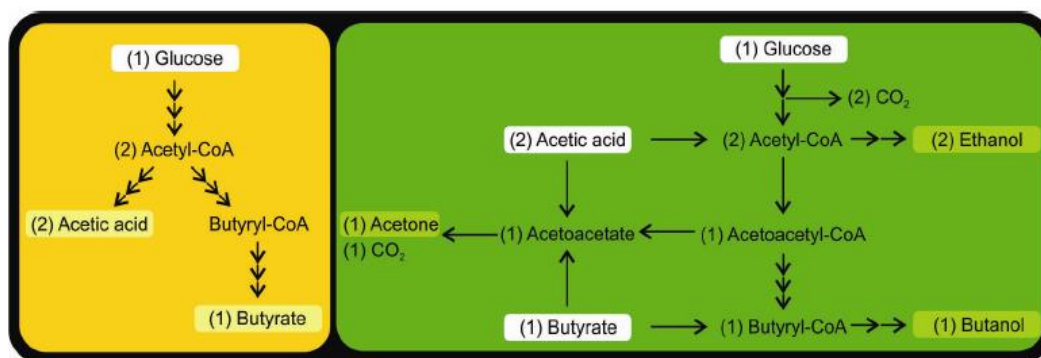


Figura 1.11. Ruta metabólica de producción de butanol por *C. acetobutylicum*. Los números indican los moles (Karimi y col., 2015).

Toxicidad de producto

La producción de ácido butírico no disociado por las bacterias del género *Clostridium* guarda una relación lineal con la producción de butanol (Ibrahim y col., 2017). Sin embargo, si hay un superávit de la cantidad de ácido acético y ácido butírico producida por la cepa de *Clostridium* en su máxima tasa de crecimiento, se produce el “estrés ácido” o inhibición de la solventogénesis (Maddox y col., 2000).

Además, el butanol es tóxico para los microorganismos y las bacterias raramente toleran concentraciones mayores del 2%, lo que representa uno de los mayores retos a superar en la producción industrial de butanol por vía fermentativa (Liu y Qureshi, 2009). Una alta concentración de butanol en el medio induce cambios adversos en la composición de la membrana celular de *C. acetobutylicum*. El butanol penetra en la membrana citoplasmática y altera su estructura. Además, afecta al transporte de solutos, la permeabilidad de membrana, el mantenimiento del pH intracelular, el nivel de ATP intracelular, el consumo de glucosa y la actividad de las proteínas intrínsecas de membrana (Kumar y Gayen, 2011). Se ha demostrado que se produce aproximadamente un incremento del 20-30% en la fluidez de la membrana cuando está expuesta a un 1% de butanol (Kumar y Gayen, 2011). La degeneración producida por el butanol en la membrana celular es mayor que la que produce la acetona (Kumar y Gayen, 2011). Para solventar este problema, se han sugerido soluciones como utilizar cepas bacterianas más tolerantes y la recuperación de solventes integrada con la fermentación (Karimi y col., 2015).

Estrategias de fermentación

Los procesos de fermentación se clasifican en: discontinuos, semicontinuos y continuos.

Fermentación en discontinuo (por lotes o batch): Puede ser considerada como un sistema cerrado que contiene una cantidad inicial y limitada de nutrientes que es inoculada con un microorganismo que realiza la fermentación (Balat, 2011). En este caso, no se añade nada después de la inoculación del medio, a excepción de una posible adición de álcali para controlar el pH durante la fase de acidogénesis. Así, Gao y col. (2014) fermentaron en reactor discontinuo hidrolizados de *P. virgatum* y de *Phragmites australis* con *C. saccharobutylicum* DSM 13864 y obtuvieron una productividad de 0,63 g L⁻¹ h⁻¹ y 0,55 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, a las 36 h de fermentación. Hijosa-Valsero y col. (2020) fermentaron con *C. saccharobutylicum*

DSM 13864 hidrolizado de paja de maíz y alcanzaron una productividad de $0,125 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de butanol al cabo de 72 h de fermentación.

Fermentación en semicontinuo (fed-batch): En este caso, el reactor es cargado con una concentración relativamente baja de sustrato (para reducir la inhibición por sustrato). A medida que la fermentación va transcurriendo, se va introduciendo en el reactor una disolución concentrada de sustrato con un flujo bajo. Los procesos de fermentación en semicontinuo disminuyen la pérdida de sustrato y aumentan la concentración final del producto (Ibrahim y col., 2018). Sin embargo, la acumulación de los productos de fermentación en el medio es tóxica para las células. Por este motivo, la mayoría de los procesos en semicontinuo están diseñados con un sistema integrado de recuperación de solventes in situ. De este modo, se reduce el efecto inhibitor provocado por los solventes en las células (Ibrahim y col., 2018). Como ejemplo, Lu y col. (2012) estudiaron la fermentación ABE de hidrolizado concentrado de bagazo de yuca y utilizaron una cepa hiperproductora de butanol de *C. acetobutylicum* inmovilizada en un reactor de lecho fibroso integrado con arrastre con gas (gas stripping) para la recuperación de butanol en continuo. En este trabajo, alcanzaron una productividad de butanol de $0,32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Fermentación en continuo: En este tipo de fermentación, se mantiene constante el volumen del caldo de fermentación que hay dentro del reactor, mediante un flujo continuo de alimentación de sustrato y una recuperación de solventes in situ para reducir su efecto inhibitor sobre las células. Presenta la ventaja de que el mismo inóculo permite la fermentación durante un largo periodo de tiempo reduciendo la fase de demora que está asociada a la fermentación por lotes. El principal inconveniente es la pérdida de células durante la retirada del producto. Para solventar este problema se ha trabajado con recirculación o con inmovilización de células (Kumar y Gayen, 2011). Así, Zheng y col. (2013) realizaron fermentación ABE en continuo con un medio sintético que contenía glucosa y xilosa, y llegaron a alcanzar una productividad de butanol de $1,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, trabajando con recirculación de células, lo que supuso el doble de lo alcanzado al utilizar células suspendidas sin recirculación ($0,529 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Además, hay varios trabajos que demuestran que la fermentación en continuo con inmovilización de células alcanza mayor eficacia de producción de butanol que las fermentaciones en continuo con recirculación. Así, Lienhardt y col. (2002) obtuvieron una productividad de butanol de $16,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ utilizando partículas de ladrillo de arcilla como soporte material para la inmovilización de células en un reactor de lecho

empaquetado con fermentación en continuo. Otros soportes que han sido utilizados para inmovilizar bacterias en fermentadores que operan en continuo son: pulpa de madera, fibras, tallos de maíz, bagazo de caña, bolitas cerámicas, anillos de tygon, PVA y carbón animal (Gottumukkala y col., 2017).

Integración de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación

Los azúcares celulósicos y hemicelulósicos obtenidos después de las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática pueden ser eficazmente fermentados, bien realizando hidrólisis y fermentación separadas (SHF) o hidrólisis y fermentación en el mismo reactor simultáneamente (SSF). El proceso integrado SSF reduce el número de etapas implicadas en el proceso de fermentación ABE y al mismo tiempo aumenta el rendimiento y la productividad de biobutanol (Qureshi y col., 2008). En el proceso SSF se elimina la inhibición de los enzimas por los azúcares, ya que una vez liberados de la biomasa son fermentados por microorganismos que se encuentran en el mismo reactor, no llegando nunca a acumularse en el medio (Gottumukkala y col., 2017). Sin embargo, las temperaturas óptimas de los microorganismos que realizan la fermentación ABE y de los enzimas celulolíticos son diferentes. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo en un rango de temperatura entre 45 y 50 °C, mientras que la fermentación con *Clostridium* requiere una temperatura entre 35 y 37 °C. A pesar de esta limitación, Ibrahim y col. (2015) estudiaron la hidrólisis enzimática del residuo del fruto de la palma aceitera (sometido a pretratamiento alcalino), en condiciones similares a las requeridas para la fermentación ABE por *Clostridium*, y no observaron disminución en el rendimiento de la hidrólisis, permitiendo, por lo tanto, una combinación exitosa de ambos procesos. El mayor reto de la SSF que existe actualmente está relacionado con la naturaleza de la biomasa utilizada en el proceso. Algunos materiales lignocelulósicos que han sido sometidos a pretratamiento químico, producen compuestos inhibidores después de la hidrólisis que pueden afectar a la etapa de fermentación (Ibrahim y col., 2018). Para superar este problema, es necesario hacer una selección adecuada del pretratamiento a realizar sobre la biomasa que vaya a ser sometida a un proceso posterior de SSF para obtener butanol.

Para terminar este apartado relativo a la producción de biobutanol, en la Tabla 1.3 se ha recopilado información de diferentes trabajos bibliográficos que analizan el uso de distintas biomásas lignocelulósicas (agrícolas, forestales, industriales y cultivos herbáceos) y pretratamientos, para obtener hidrolizados enzimáticos que fueron fermentados a butanol, mediante un proceso discontinuo, con bacterias del género *Clostridium*.

Tabla 1.3. Producción de butanol y ABE a partir de hidrolizados lignocelulósicos utilizando diferentes pretratamiento y cepas.

Biomasa Lignocelulósica	Pretratamiento	Cepa	Conc. Butanol (g L ⁻¹)	Conc. ABE (g L ⁻¹)	Referencia
Pino	Autohidrólisis	<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-591	3,5	6,0	Amiri y Karimi, 2015
Olmo	Autohidrólisis	<i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-591	4,4	6,7	Amiri y Karimi, 2015
Álamo/Pino	Autohidrólisis	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	10,8	13,2	Guan y col., 2018
Piel de patata	Autohidrólisis	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> DSM 2152	8,1	10,9	Hijosa-Valsero y col., 2018a
Piel de grano de café	Autohidrólisis	<i>C. beijerinckii</i> CECT 508	7,02	11,41	Hijosa-Valsero y col., 2018b
Paja de trigo	Explosión por vapor	<i>C. beijerinckii</i> DSM 6422	7,21	11,44	Bellido y col., 2014
Sólidos de destilería (DDGS)	Explosión con amoniaco	<i>C. beijerinckii</i> BA 101	7,8	10,4	Ezeji y Blaschek, 2008
Paja de trigo	Ozonólisis	<i>C. beijerinckii</i> DSM 6422	4,05	7,13	Bellido y col., 2014
Bagazo de caña de azúcar	Ozonólisis	<i>C. beijerinckii</i> DSM 6422	3,38	5,24	Travaini y col., 2016
Tallos de maíz	Alcalino (NaOH)	<i>C. acetobutylicum</i> ABE 1301	7,6	9,8	Cai y col., 2016
Bagazo de caña de azúcar	Alcalino (NaOH)	<i>C. acetobutylicum</i> GX01	14,17	21,11	Pang y col., 2016
<i>Panicum virgatum</i>	Alcalino (NaOH)	<i>C. saccarobutylicum</i> DSM 13864	13,0	22,7	Gao y col., 2014
<i>Phragmites australis</i>	Alcalino (NaOH)	<i>C. saccarobutylicum</i> DSM 13864	10,14	19,75	Gao y col., 2014
Paja de trigo	Ácido diluido (H ₂ SO ₄)	<i>C. beijerinckii</i> P260	6,05	9,36	Qureshi y col., 2008
Bagazo de cerveza	Ácido diluido (H ₂ SO ₄)	<i>C. beijerinckii</i> DSM 6422	7,5	10,0	Plaza y col., 2017
Pino	Organosolv (Etanol + 1% H ₂ SO ₄)	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	6,9	10,38	Li y col., 2018
Paja de arroz	Líquidos iónicos	<i>C. saccarobutylicum</i> DSM 13864	9,5	ND	Xing y col., 2018
Paja de maíz	Líquidos iónicos	<i>C. saccarobutylicum</i> DSM 13864	5,63	7,0	Xu y col., 2016
Paja de trigo	Biológico (Enterococcus)	<i>C. beijerinckii</i> 10132	14,2	23,3	Valdez-Vázquez y col., 2015
Bagazo de caña de azúcar	Autohidrólisis + Biológico + Alcalino (Amoniaco)	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	6,4	11,9	Su y col., 2015

ND: Dato no disponible.

Como puede observarse, la máxima concentración de butanol y ABE reportada en estos trabajos ha sido de 14,2 g L⁻¹ y 23,3 g L⁻¹, respectivamente.

1.4. Compuestos inhibidores y aumento de la fermentabilidad de los hidrolizados

1.4.1. Origen y tipos de compuestos inhibidores

El pretratamiento de las materias primas lignocelulósicas se realiza bajo ciertas condiciones de severidad, lo que suele provocar degradación de la lignina y de los azúcares hemicelulósicos y/o celulósicos, formándose compuestos tóxicos o inhibidores que pueden influir negativamente en las etapas posteriores de hidrólisis enzimática y fermentación (Palmqvist y Hahn-Hagerdal, 2000a). En la Figura 1.12 se muestra un esquema de la formación de compuestos de degradación.

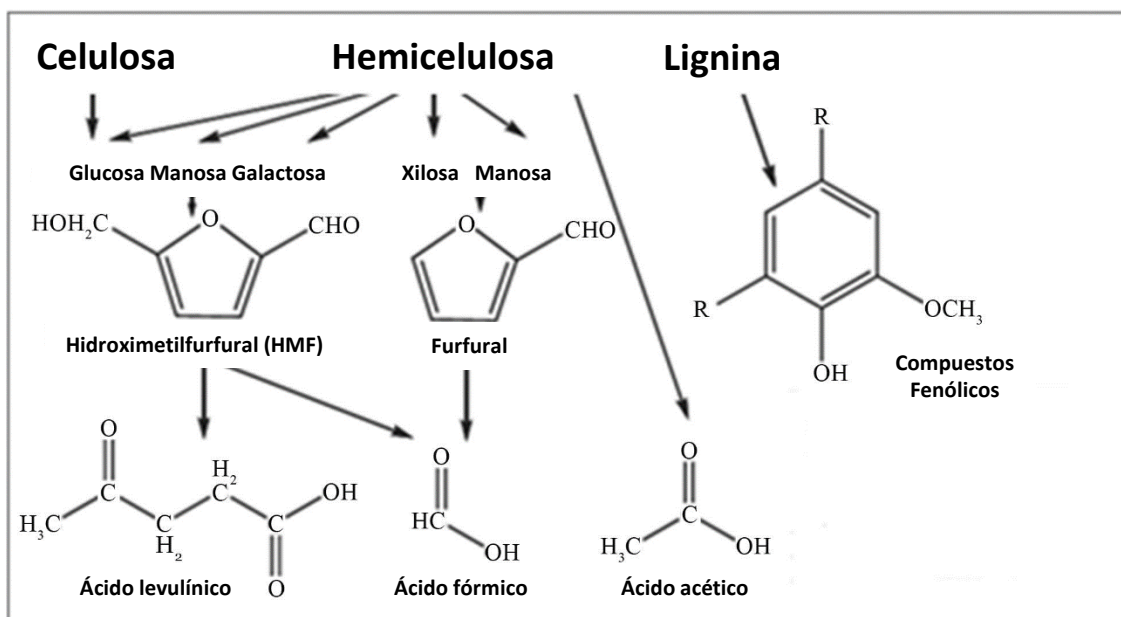


Figura 1.12. Formación de compuestos inhibidores a partir del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Jönsson y col., 2013).

La naturaleza y concentración de los compuestos de degradación generados dependen de la materia prima, del tipo de pretratamiento y de las condiciones del mismo. En cuanto a su naturaleza, estos compuestos se pueden clasificar en tres grupos principales: compuestos furánicos, ácidos alifáticos y compuestos fenólicos.

1.4.1.1. Compuestos furánicos

En el pretratamiento químico de la lignocelulosa, los polímeros formados por hexosas y pentosas son hidrolizados a sus formas oligoméricas y monoméricas. Los compuestos furánicos, furfural y 5-HMF, están presentes, de manera habitual, en los hidrolizados de lignocelulosa y se forman por deshidratación de pentosas y hexosas, respectivamente (Figura 1.12). La concentración de 5-HMF en los hidrolizados lignocelulósicos suele ser menor que la de furfural, por tres motivos: el pretratamiento químico degrada mayoritariamente hemicelulosa que contiene cantidades bajas de hexosas, las condiciones empleadas en el proceso de hidrólisis enzimática normalmente no degradan hexosas en grandes cantidades y, además, el 5-HMF es altamente reactivo (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a).

Se ha descrito que los compuestos furánicos en bajas concentraciones (0,5-2 g L⁻¹) inhiben la fermentación etanólica, pero producen efectos estimulantes en la producción de solventes por *C. beijerinckii* BA101 (Ezeji y col., 2007), *C. beijerinckii* P260 (Qureshi y col., 2012) y *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Zhang y col., 2012). Además, Zhang y col. (2012) demostraron que *C. acetobutylicum* ATCC 824 puede transformar furfural y 5-HMF, cuando se encuentran en concentraciones comprendidas entre 2 y 3 g L⁻¹, en compuestos menos tóxicos como el alcohol furfúrico y el 2,5-bis-hidroximetilfurano, respectivamente. Sin embargo, si las concentraciones de compuestos furánicos son mayores, se produce un efecto inhibitorio sobre la fermentación ABE.

1.4.1.2. Ácidos alifáticos

Los hidrolizados lignocelulósicos contienen ácidos alifáticos como los ácidos acético, fórmico y levulínico. El ácido acético procede, principalmente, de la hidrólisis de los grupos acetilo que forman parte de la estructura de la hemicelulosa. Los ácidos fórmico y levulínico son productos de degradación de furfural y 5-HMF, que se transforman mediante procesos de rehidratación en medio ácido (Jönsson y col., 2013). Así, el ácido fórmico es un producto de degradación de furfural y del 5-HMF, mientras que el ácido levulínico se forma por degradación de 5-HMF (Figura 1.12). El valor de pK_a del ácido fórmico (3,75) es considerablemente menor que el valor de pK_a del ácido acético (4,76) y del ácido levulínico (4,64). El efecto tóxico que ejercen los ácidos alifáticos sobre las bacterias que llevan a cabo la fermentación ABE es atribuido a la forma no disociada y aumenta en el orden ácido acético < ácido levulínico < ácido fórmico (Jönsson y col., 2013). Wang y col. (2011) demostraron que,

cuando en un medio de fermentación ABE se añade ácido fórmico, incluso en baja concentración ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), se producen bajas concentraciones de solventes y concentraciones muy altas de los ácidos acético y butírico (estrés ácido). La sensibilidad a estos inhibidores depende de la cepa microbiana; por ejemplo, *C. acetobutylicum* ATCC 824 es más sensible al efecto inhibitor del ácido fórmico que *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Cho y col., 2012).

1.4.1.3. Compuestos fenólicos

Como consecuencia del pretratamiento de la lignocelulosa se liberan una gran variedad de compuestos fenólicos y otros compuestos aromáticos a partir de la lignina (Jönsson y col., 2013). Los compuestos fenólicos presentan un fuerte efecto inhibitor del crecimiento bacteriano de *Clostridium* spp. y de la fermentación ABE (Amiri y Karimi, 2018). Estos compuestos producen un debilitamiento y una pérdida de integridad de la membrana celular alterando su capacidad como barrera selectiva (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a). Se ha estudiado el efecto inhibitor producido por algunos compuestos fenólicos individuales sobre la fermentación ABE. Así, Cho y col. (2009) estudiaron el efecto inhibitor producido por el ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vainílico, siringaldehído y vainillina en *C. beijerinckii*, y documentaron que, concentraciones mayores de 1 g L^{-1} de dichos compuestos producen entre 64 y 74% de inhibición del crecimiento celular y detienen la producción de butanol. Li y col. (2017) evaluaron la influencia, en la fermentación ABE realizada por *C. acetobutylicum*, de trece aldehídos aromáticos, incluyendo benzaldehído, mono-, di- y tri- hidroxibenzaldehídos, vainillina, *o*-vainillina y *o*-ftaldehído, y encontraron que la inhibición por aldehídos aromáticos depende fuertemente de la posición del grupo hidroxilo. De este modo, observaron que el grupo *orto*-hidroxilo produce una inhibición hasta veinte veces mayor que los grupos *meta*- y *para*-hidroxilo.

1.4.1.4. Otros inhibidores

Los iones inorgánicos que se encuentran presentes en los hidrolizados de lignocelulosa, y que proceden de la propia biomasa, de los productos químicos añadidos durante el pretratamiento, del acondicionamiento y la hidrólisis o incluso de los equipos utilizados durante el proceso, pueden actuar como inhibidores, tanto del crecimiento celular de *Clostridium* spp., como de la fermentación ABE (Amiri y Karimi, 2018). Además, como se ha descrito en el Apartado 1.3.2.3 (Fermentación ABE), los microorganismos también pueden verse afectados por la composición y concentración de la mezcla de azúcares presentes en el

medio, así como por los bioalcoholes u otros productos generados en la fermentación (toxicidad de producto).

1.4.2. Métodos analíticos para la determinación de compuestos inhibidores de la fermentación ABE

Para poder mejorar los rendimientos de la fermentación ABE, es necesario conocer con detalle la composición del medio, tanto de los azúcares y otros nutrientes, como de los compuestos que puedan actuar como inhibidores de la fermentación.

En cuanto a los métodos de cuantificación de inhibidores en hidrolizados, los ácidos alifáticos (fórmico, acético y levulínico) son normalmente determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de índice de refracción (RID) de acuerdo con el procedimiento analítico descrito por NREL (2008). Los furanos (furfural y 5-HMF) pueden ser determinados por HPLC con detector de diodos (DAD) (Martínez y col., 2000; Liu y col., 2015) o bien mediante HPLC-RID (NREL, 2008). En relación a los compuestos fenólicos, varios autores (Hijosa-Valseo y col., 2017; Plaza y col., 2017) optan por la determinación como familia de compuestos [compuestos fenólicos totales (TPC)] mediante espectrofotometría siguiendo el método Folin-Denis (Folin y Denis, 1912). En el caso de la cuantificación de compuestos fenólicos individuales, debido a la gran cantidad de compuestos que pueden ser generados a partir de la degradación de la lignina, se pueden encontrar en la bibliografía varios métodos cromatográficos (principalmente HPLC-DAD o HPLC-RID) (Chen y col., 2006; Martínez y col., 2000; Mussatto y col., 2007; Liu y col., 2015) en función de los compuestos a determinar. La composición de compuestos fenólicos del hidrolizado depende del tipo de biomasa y del pretratamiento realizado sobre ella. Debido a la gran variedad de compuestos fenólicos diferentes que se pueden originar en los pretratamientos de las biomásas lignocelulósicas, resulta de gran interés conocer la naturaleza de los compuestos que son mayoritarios y desarrollar un método analítico sencillo, rápido y robusto que permita cuantificarlos. Un conocimiento más detallado de la composición de los hidrolizados a fermentar conduce a un mejor entendimiento de los procesos de fermentación ABE de los materiales lignocelulósicos y, por tanto, contribuye a incrementar su eficacia y rentabilidad.

1.4.3. Métodos de detoxificación

Para minimizar los efectos tóxicos que provocan sobre la fermentación ABE algunos de los compuestos que son generados durante el pretratamiento de la biomasa, habitualmente se utilizan tres tipos de estrategias: 1) eliminar los compuestos mediante alternativas de detoxificación, 2) modificar los compuestos inhibidores transformándolos en otros productos que no interfieran en el metabolismo de las bacterias que llevan a cabo la fermentación o 3) desarrollar cepas de microorganismos que toleren dichos compuestos inhibidores (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b). En cuanto a los métodos de detoxificación, estos pueden ser divididos en dos grupos: físico-químicos y biológicos. El fundamento de estos métodos de detoxificación se describe a continuación.

1.4.3.1 Métodos físico-químicos

Evaporación

La evaporación a vacío, además de concentrar los azúcares fermentables de los hidrolizados, es un método físico de detoxificación que permite reducir las cantidades de compuestos tóxicos volátiles que están presentes en los hidrolizados. Sin embargo, este método también produce un incremento moderado en la concentración de compuestos tóxicos no volátiles (Mussatto y Roberto, 2004). La evaporación ha sido utilizada por algunos autores (Mateo y col., 2013; Zhu y col., 2011) para detoxificar hidrolizados hemicelulósicos, logrando reducir de manera considerable las concentraciones de ácido fórmico, acético y furfural. En el caso del ácido acético, al ser volátil sólo en su forma no disociada, la utilización de valores bajos de pH favorece su evaporación (Mussatto y Roberto, 2004).

Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido se utiliza mucho a nivel industrial para recuperar diversos productos de mezclas biológicas como caldos de fermentación (Coz y col., 2016). El proceso consiste en utilizar un solvente extractante, inmiscible con la disolución de proceso, que es usado para extraer el soluto. Después, el soluto es recuperado del extracto por evaporación. Se han utilizado distintos solventes orgánicos para extraer compuestos tóxicos de los hidrolizados. Zhu y col. (2011) obtuvieron buenos resultados en la eliminación de ácidos, furanos y compuestos fenólicos de hidrolizados ácidos de paja de maíz, después de realizar una extracción con trialquilamina. Mateo y col. (2013) estudiaron la eficacia de tres solventes

orgánicos (*n*-hexano, cloroformo y acetato de etilo) en la extracción de los compuestos inhibidores contenidos en un hidrolizado ácido de residuo de poda de olivo. En este trabajo concluyeron que el acetato de etilo fue el disolvente más eficaz para la eliminación de furanos y compuestos fenólicos del hidrolizado.

Detoxificación con cal (*overliming*)

Para precipitar compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados, se han utilizado diferentes agentes, entre los que destacan los álcalis como la sosa, el óxido de calcio o el hidróxido de calcio. El tratamiento con hidróxido de calcio es conocido como detoxificación con cal, y consiste en aumentar el pH del hidrolizado hasta un valor comprendido entre 9 y 10, para continuar con un reajuste (mediante la adición de ácido) a un valor adecuado para comenzar la fermentación bacteriana. Este método disminuye las concentraciones de aldehídos y cetonas (incluyendo furfural y 5-HMF) y mejora el crecimiento celular y el proceso de fermentación (Palmqvist y Hahn-Hägerdal 2000a; Palmqvist y Hahn-Hägerdal 2000b). Además, se genera un precipitado debido a la formación de sales insolubles (sulfato de calcio, oxalato de calcio, etc.) que disminuye la conductividad del hidrolizado (Mateo y col., 2013). Se han publicado varios estudios que demuestran que la detoxificación con cal es uno de los métodos más eficaces para la eliminación de compuestos inhibidores de los hidrolizados lignocelulósicos (Martínez y col., 2000; Chandel y col., 2007; Mateo y col., 2013). Sin embargo, el principal inconveniente de este método es la disminución de la concentración de azúcares fermentables por degradación, como consecuencia de someter el hidrolizado a condiciones severas de pH y temperatura. Además, el ácido acético no se ve afectado por este tratamiento (Mussatto y Roberto, 2004).

Adsorción

La adsorción es un fenómeno físico-químico que implica la transferencia de materia de una fase fluida a una superficie adsorbente a través de fuerzas atómicas o moleculares débiles (adsorción física) o de enlaces químicos débiles (adsorción química). La adsorción es una alternativa atractiva debido a su simplicidad de diseño, operación y escalado, alta capacidad fácil regeneración y bajo coste; asimismo, minimiza la degradación de compuestos y evita la utilización de disolventes tóxicos (Coz y col., 2016). Se han utilizado adsorbentes materiales como: carbón activado, carbón de madera, adsorbentes poliméricos y resinas de intercambio iónico.

- Carbón activado: Es uno de los materiales adsorbentes más utilizados por su eficacia en la eliminación de derivados furánicos, ácido acético y compuestos fenólicos (Kim, 2018). Sin embargo, también adsorbe pentosas y hexosas, produciéndose una pérdida de azúcares fermentables (Kim, 2018; Mateo y col., 2013).
- Carbón de madera: Es capaz de eliminar compuestos fenólicos y furanos sin reducir los niveles de azúcares fermentables (Miyafuji y col., 2003).
- Resinas poliméricas: Su uso se considera una de las mejores alternativas para la eliminación de compuestos inhibidores presentes en hidrolizados de biomasa (Coz y col., 2016). Las resinas poliméricas son muy estables desde el punto de vista químico y mecánico, tienen alta capacidad de adsorción y pueden ser regeneradas bajo condiciones suaves (Yu y Christopher, 2017). En los últimos años ha aumentado el uso de resinas poliméricas para detoxificar hidrolizados lignocelulósicos. Dentro de las resinas poliméricas cabe destacar las resinas no polares y las resinas de intercambio iónico. La capacidad de adsorción de las resinas de intercambio iónico es atribuida a la presencia de enlaces de hidrógeno, mientras que, en el caso de las resinas no polares, la hidrofobicidad, gran área superficial y estructura macrorreticular, son los factores responsables de su eficacia de adsorción (Yu y Christopher, 2017).

Las *resinas de intercambio aniónico* han demostrado su alta capacidad en la eliminación de inhibidores como furanos, compuestos fenólicos y ácidos alifáticos (Coz y col., 2016). Larsson y col. (1999) lograron reducir un 91% la concentración de compuestos fenólicos presentes en un hidrolizado de madera de píceas, utilizando la resina de intercambio aniónico AG1-X8. Yu y Christopher (2017) compararon la eficacia en la detoxificación de hidrolizado de madera de álamo mediante el uso de cuatro resinas poliméricas: Amberlite IRA-400 (Cl^{-1}), IRA-400 (OH^{-1}), IRA-958 (Cl^{-1}) y XAD-4. El estudio demostró que la resina no polar Amberlite XAD-4 y la de intercambio aniónico IRA-400 (OH^{-1}) presentaron mayor eficacia en la adsorción de compuestos fenólicos. Li y col. (2018) compararon la eficacia en la detoxificación de hidrolizado de madera de pino, al utilizar seis métodos de detoxificación [cal, resina de intercambio aniónico (Dowex 1X4), resina no iónica (Amberlite XAD-4), lacasa, carbón activado y cisteína]. Observaron que la detoxificación con la resina de intercambio aniónico fue el método más eficaz, obteniendo un rendimiento final de butanol comparable al conseguido con el medio control.

Filtración por membranas

Las tecnologías de separación con membranas son eficaces, versátiles, ahorran energía (lo que las hace competitivas desde el punto de vista económico) y son métodos prometedores en procesos a escala industrial (Coz y col., 2016). La naturaleza de las membranas puede ser orgánica (polietersulfona, poliamida, acetato de celulosa) o inorgánica (alúmina, sílice). La microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración son procesos de filtración con membranas ampliamente utilizados en biorrefinerías.

Grzenia y col. (2012) utilizaron una membrana microporosa de fibra hueca de polipropileno para detoxificar un hidrolizado hemicelulósico de paja de maíz. Los autores observaron una rápida eliminación de ácido sulfúrico, 5-HMF y furfural. En el caso del ácido acético, aumentó el rendimiento de eliminación al disminuir el pH del hidrolizado. Sun y Liu (2012) utilizaron una membrana de nanofiltración para concentrar y detoxificar hidrolizados hemicelulósicos de madera de arce azucarero. Los resultados demostraron que mediante nanofiltración se podía eliminar ácido fórmico, ácido acético, 5-HMF y furfural, pero el proceso no fue eficaz en la eliminación de compuestos fenólicos. Se ha observado que, en el caso de los hidrolizados de madera, las membranas tienen una alta tendencia a ensuciarse rápidamente, disminuyendo la capacidad de filtración y aumentando los costes (Coz y col., 2016). Para solventar este problema sería necesario someter el hidrolizado a un tratamiento previo antes de realizar la filtración con membrana.

1.4.3.2. Métodos biológicos

Los métodos biológicos implican el uso de enzimas o microorganismos específicos que actúan sobre los compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados cambiando su composición.

Uso de enzimas

El mecanismo de detoxificación basado en el uso de enzimas implica la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Chandel y col., 2013). Los enzimas de tipo lacasa y peroxidasa, derivados de los hongos de podredumbre blanca (*Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cyathus bulleri*, *Cyathus stercoreus* y *Pycnoporus cinnabarinus*), han sido citados como eficaces para la eliminación de compuestos fenólicos de los hidrolizados lignocelulósicos (Chandel y col., 2013). Así, Cho y col. (2009) estudiaron la detoxificación con peroxidasa, de un medio sintético que contenía 1 g L⁻¹ de una mezcla de

seis compuestos fenólicos diferentes que inhibían completamente la producción de butanol por *C. beijerinckii*. En este trabajo describieron cómo se mejoraron notablemente el crecimiento celular y la producción de butanol en el medio detoxificado, igualándose esta última a la obtenida en un medio control libre de compuestos fenólicos. Chandel y col. (2007) utilizaron lacasa para detoxificar el hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar y observaron una disminución del 77% en la concentración de compuestos fenólicos del hidrolizado. En otro estudio, Allard-Massicotte y col. (2017) documentaron la disminución de la concentración de compuestos fenólicos (de 1,20 a 0,28 g L⁻¹) en un hidrolizado hemicelulósico de madera al utilizar lacasas.

Uso de microorganismos

Algunos microorganismos también han sido estudiados para eliminar compuestos inhibidores en los hidrolizados lignocelulósicos. Los microorganismos que degradan selectivamente la lignina, principalmente los hongos de la podredumbre blanca, crecen de forma natural en la biomasa lignocelulósica. De este modo, Palmqvist y col. (1997) utilizaron *Trichoderma reesei* para degradar los inhibidores del hidrolizado hemicelulósico de sauce. En el estudio se observó una fuerte disminución de los compuestos fenólicos acompañada de la reducción de furanos y ácidos débiles. Larsson y col. (1999) llevaron a cabo un estudio de detoxificación de un hidrolizado ácido hemicelulósico con *T. reesei*, y demostraron que el tratamiento fue eficaz comparado con otros tratamientos como la detoxificación con cal, intercambio aniónico o tratamiento con lacasas (Chandel y col., 2013). Sin embargo, *T. reesei* consumió el 35% de los azúcares fermentables que contenía el hidrolizado ácido. En las aplicaciones de detoxificación microbiana, hay algunas bacterias y levaduras que han proporcionado mejores resultados que los hongos de podredumbre por su mínimo consumo de azúcares fermentables y tiempos de incubación. Así, Okuda y col. (2008) investigaron la detoxificación de un hidrolizado de madera con la bacteria termófila *Ureibacillus thermosphaericus* y observaron resultados en la eliminación de compuestos fenólicos y furanos similares a los obtenidos después de un tratamiento de detoxificación con cal, con menor consumo de azúcares fermentables (<5 %). El uso de *Coniochaeta ligniaria* también fue eficaz para disminuir la concentración de compuestos inhibidores formados durante el pretratamiento con ácido diluido de distintos tipos de biomasa como tallos de alfalfa, *Panicum virgatum* y *Phalaris arundinacea*, entre otros (Nichols y col., 2005; Nichols y col., 2010).

Sin embargo, hay muchos inconvenientes en el uso de los tratamientos biológicos de detoxificación, entre los que destacan los largos tiempos de actuación, el posible consumo de azúcares fermentables y el precio de los enzimas. Por estos motivos, son necesarias más investigaciones para que la detoxificación biológica sea más eficaz y económicamente rentable.

1.4.3.3. Métodos combinados

La eficacia de un método de detoxificación depende del tipo de hidrolizado (biomasa y pretratamiento) y de la especie de microorganismo que se utilice para llevar a cabo la fermentación (Amiri y Karimi, 2018). Además, cada método de detoxificación es más específico para un tipo determinado de inhibidores, por lo que se pueden obtener mejores resultados combinando dos o más métodos diferentes (Coz y col., 2016). En la bibliografía pueden encontrarse varios trabajos que muestran la eficacia de diferentes combinaciones de métodos de detoxificación, mejorando el rendimiento de la posterior fermentación. Algunos ejemplos de detoxificación de hidrolizados de biomasa realizados combinando tratamientos, son los trabajos realizados por Ludwig y col. (2013) (Iacasa y resina de intercambio aniónico), Mateo y col. (2013) (carbón activado y detoxificación con cal) y Sun y Liu (2012) (nanofiltración con membranas y detoxificación con cal).

1.4.4. Utilización de cepas modificadas en la fermentación ABE

Otra alternativa para superar los problemas generados por los compuestos inhibidores de la fermentación, y que permite aumentar el rendimiento de la producción de butanol, es la utilización de técnicas de selección y de ingeniería genética/metabólica. Así, se han desarrollado microorganismos con una alta tolerancia a ácidos alifáticos, aldehídos furánicos y otras pequeñas moléculas orgánicas logrando mejoras en los rendimientos de la fermentación (Kim, 2018).

La técnica más antigua y sencilla de procedimiento de cribado la constituye la selección de las células supervivientes en unas condiciones ambientales determinadas. De este modo, empleando mutagénesis química aleatoria y la exposición al butanol, se han seleccionado cepas de *C. acetobutylicum* que, al ser más tolerantes al butanol, han mostrado una producción mayor (Lütke-Eversloh y Bahl, 2011). La cepa mutante *C. beijerinckii* BA101, conocida por su alta resistencia a compuestos inhibidores y una tolerancia al butanol que puede superar 23 g L⁻¹ (Qureshi y Blaschek, 2001), fue seleccionada en presencia de 2-

desoxiglucosa después de mutagénesis química y mostró aumento de actividad amilolítica y aumento en la producción de butanol (Qureshi y Blaschek, 2001). Otro ejemplo de cribado de *C. acetobutylicum* fue publicado por Border y Papoutsakis (2007), mediante enriquecimiento de aquellos plásmidos de *C. acetobutylicum* que le confieren una tolerancia mayor al butanol.

La ingeniería metabólica de *Clostridium* es difícil de realizar, debido a las complejas regulaciones metabólicas implicadas en el ciclo de vida y la naturaleza degenerativa de la cepa (Gottumukkala y col., 2017). Una estrategia desarrollada para aumentar la producción de butanol ha sido el estudio de la eliminación de la producción de acetona mediante la interrupción del gen que codifica para el enzima acetoacetato descarboxilasa y que disminuye la producción de butanol (Ibrahim y col., 2017). También se ha trabajado en la interrupción metabólica de la ruta de la acetona convirtiendo la acetona en isopropanol, ya que puede ser empleado como un aditivo para los combustibles. Así, Lee y col. (2012) obtuvieron una producción de 20,4 g L⁻¹ de la mezcla isopropanol-butanol-etanol (IBE) con una cepa modificada de *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Dadas las dificultades de manipulación de *Clostridium*, se ha estudiado el uso de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* como huéspedes para la sobreexpresión de genes implicados en la ruta de producción de butanol. Sin embargo, con *E. coli* o *S. cerevisiae* modificadas genéticamente, aún no se ha conseguido alcanzar los valores de producción de butanol alcanzados por *Clostridium* (Ibraim y col., 2017).

A través de todos los esfuerzos realizados hasta la fecha para mejorar la cepa, la cantidad media máxima de producción de butanol es próxima a 20 g L⁻¹, por lote de fermentación en discontinuo (Gottumukkala y col., 2017). Por lo tanto, es necesario trabajar en desarrollar un fenotipo óptimo que permita obtener mayor concentración, rendimiento y productividad de butanol a partir de hidrolizados hemicelulósicos.

1.5. Retos a superar en la producción de butanol

El butanol presenta muchas características que lo hacen atractivo para ser utilizado como combustible para el transporte. Sin embargo, el proceso de fermentación ABE tiene numerosas limitaciones que hacen que procesos basados en la ruta petroquímica, como la condensación aldólica, sean actualmente más rentables para su producción (Ndaba y col., 2015).

Para abaratar el coste de producción de biobutanol, el aspecto más importante es la utilización de materias primas de bajo coste (Green, 2011). Así, la utilización de biomasa lignocelulósicas reduce significativamente el aspecto económico de la producción de butanol. Además, la utilización de bacterias del género *Clostridium* es adecuada para la fermentación de los azúcares obtenidos a partir de la lignocelulosa, ya que son capaces de fermentar pentosas procedentes de las hemicelulosas y de tolerar muchos de los compuestos inhibidores generados en los pretratamientos (Green, 2011). Sin embargo, la utilización de este tipo de materias primas todavía presenta importantes puntos de mejora. Así, para facilitar la hidrólisis de cada biomasa, es necesario **optimizar el pretratamiento físico-químico**, de modo que se libere la máxima cantidad de azúcares fermentables y se genere la mínima cantidad de compuestos inhibidores de fermentación (Hijosa-Valsero y col., 2017) y se logren desarrollar tecnologías que permitan reducir costes.

En cuanto a la etapa posterior de hidrólisis enzimática, su principal inconveniente es el elevado coste de los enzimas y las dosis requeridas por el proceso a nivel industrial. En los últimos años, mediante la utilización de técnicas avanzadas, se han desarrollado enzimas con mayores rendimientos celulolíticos (Heux y col., 2015). No obstante, aún hay que seguir trabajando en el **desarrollo de nuevas enzimas** que permitan incrementar la rentabilidad del proceso.

Otro obstáculo importante en la producción de biobutanol son las bajas concentraciones de producto (1-2%), obtenidas en los caldos de fermentación como consecuencia del efecto inhibitor ejercido por el butanol sobre las bacterias que lo producen. En este punto, conviene destacar que el rendimiento de la fermentación depende del microorganismo que la realiza y de la composición química del medio (hidrolizado) en el que se encuentra dicho microorganismo. Por lo tanto, para alcanzar concentraciones elevadas de butanol en el medio, es necesaria la **selección de la cepa bacteriana de *Clostridium*** más eficiente para la fermentación de un hidrolizado concreto. También resulta necesario trabajar en el **desarrollo de cepas** adecuadas para las aplicaciones industriales, para cumplir objetivos de bioprocesos, que incluyan una mejora en el rendimiento de producción de butanol, concentración, selectividad y productividad (Gottumukkala y col., 2017).

Además de la toxicidad de producto, como se ha descrito en el Apartado 1.4.1. (Origen y tipos de compuestos inhibidores), la presencia de determinados compuestos en los hidrolizados también ejerce un fuerte efecto negativo sobre el rendimiento de producción de

butanol que debe ser superado. Así, ha sido descrito el fuerte efecto inhibitor provocado por los compuestos fenólicos tanto sobre el crecimiento bacteriano de *Clostridium*, como sobre la fermentación ABE (Amiri y Karimi, 2018). Además, existe una gran variedad de compuestos fenólicos que son liberados a partir de la lignina durante el pretratamiento y que dependen de varios factores entre los que se encuentran la estructura de la biomasa y el tipo y condiciones del pretratamiento. En este punto, cabe destacar que un estudio de las **características de los compuestos fenólicos** que están presentes en los hidrolizados es imprescindible para desarrollar métodos de detoxificación y fermentación más eficaces.

Aparte de los rendimientos de la fermentación, **la productividad** también ejerce gran influencia en el aspecto económico. Los procesos de fermentación continuos ofrecen mayores productividades, aunque son difíciles de escalar porque la producción de solventes por cepas microbianas, como *C. acetobutylicum*, tiende a degenerar con el tiempo (Cornillot y col., 1997). Una opción de mejora puede ser la inmovilización de microorganismos en el fermentador. Sin embargo, los sistemas inmovilizados producen bajas concentraciones de solventes cuya posterior recuperación es bastante costosa. Además, cuando las cargas de biomasa son elevadas, estos sistemas inmovilizados tienden a sufrir problemas de operación (Amiri y Karimi, 2018). Por lo tanto, aún queda un amplio margen de mejora, en este aspecto, para aumentar la rentabilidad económica del proceso de fermentación ABE.

La recuperación de solventes, aunque es un tema que en esta Tesis Doctoral no se ha abordado, representa otro gran reto que requiere de importantes avances. La destilación convencional es una técnica muy robusta y eficaz, pero con elevado gasto energético. Se necesitan aproximadamente 12 t de vapor para recuperar 1 t de disolvente (Ni y Sun, 2009). La aplicación de técnicas alternativas de recuperación de butanol “in situ”, como el arrastre a vacío, arrastre con gas, pervaporación, perextracción o adsorción, podría mejorar la eficacia del proceso (Morone y Pandey, 2014). El arrastre con gas presenta una serie de ventajas como son: baja inversión económica, facilidad de operación, escalado sencillo y bajos requerimientos energéticos (Díez-Antolínez y col., 2018). Sin embargo, el arrastre con gas también se lleva grandes cantidades de agua en las corrientes de butanol recuperadas, además de presentar baja selectividad (Díez-Antolínez y col., 2018). Por lo tanto, la optimización de las técnicas de recuperación de solventes es otro aspecto en el que hay que seguir trabajando para contribuir a la viabilidad económica de la producción de butanol a partir de materiales lignocelulósicos.

1.6. Bibliografía

- Agencia Andaluza de la Energía. Consejería de Hacienda, Industria y Energía. (2018). Los biocarburantes en Andalucía. https://www.agenciaandaluzadelaenergia.es/sites/default/files/documentos/informe_biocarburantes_dic_2018.pdf. Último acceso 05/12/2019.
- Allard-Massicotte, R., Chadjaa, H., Marinova, M. (2017). Phenols removal from hemicelluloses pre-hydrolysate by laccase to improve butanol production. *Fermentation*. 3 (31).
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process base on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 101: 4851-4861.
- Amiri, H., Karimi, K. (2015). Autohydrolysis: a promising pretreatment for the improvement of acetone, butanol and ethanol production from woody material. *Chemical Engineering Science*. 137: 722-729.
- Amiri, H., Karimi, K. (2018). Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: Challenges and perspectives. *Bioresorce Technology*. 270: 702-721.
- Arantes, V., Saddler, J.N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 3 (4).
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 52: 858-875.
- Banerjee, S., Sen, R., Pandey, R.A., Chakrabarti, T., Satpute, D., Giri, B.S., Mudliar, S. (2009). Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioetanol production from rice husk and process optimization. *Biomass and Bioenergy*. 33: 1680-1686.
- Behera, B.C., Sethi, B.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N. (2017). Microbial cellulases – Diversity and biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15: 197-210.
- Bellido, C., Loureiro-Pinto, M., Coca, M., González-Benito, G., García-Cubero, M.T. (2014). Acetone-butanol-ethanol (ABE) production by *Clostridium beijerinckii* from wheat straw hydrolysates: Efficient use of penta and hexa carbohydrates. *Bioresource Technology*. 167: 198-205.

- Bharathiraja, B., Jayamuthunagai, J., Sudharsanaa, T., Bharghavi, A., Praveenkumar, R., Chakravarthy, M., Yuvaraj, D. (2017). Biobutanol – An impending biofuel for future: A review on upstream and downstream processing techniques. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 68: 788-807.
- Border, J.R., Papoutsakis, E.T. (2007). Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent-tolerant genes in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Environmental Microbiology*. 73: 3061-3068.
- British Petroleum, 2019. BP Statistical review of world energy. <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2019-full-report.pdf>. Último acceso 18/11/2019.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K.B., Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Research*. 2011: Article ID 787532. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>.
- Cai, D., Li, P., Luo, Z., Quin, P., Chen, C., Wang, Y., Wang, Z., Tan, T. (2016). Effect of dilute alkaline pretreatment on the conversion of different parts of corn stalk to fermentable sugars and its application in acetone-butanol-ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 211: 117-124.
- Castoldi, R., Bracht, A., de Morais, G.R., Baesso, M.I., Correa, R.C.G., Peralta, R.A., Moreira, R.F.P.M., Polizeli, M.T., de Souza, C.G.M., Peralta, R.M. (2014). Biological pretreatment of *Eucalyptus grandis* sawdust with white-rot fungi: study of degradation patterns and saccharification kinetics. *Chemical Engineering Journal*. 258: 240-246.
- Chandel, A.K., Kapoor, R.K., Singh, A., Kuhad, R.C. (2007). Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*. 98: 1947-1950.
- Chandel, A.K., da Silva, S.S., Singh, O.V. (2013). Detoxification of lignocellulose hydrolysates: Biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. *Bioenergy Research*. 6: 388-401.
- Chapman, I. (2014). The end of peak oil? Why this topic is still relevant despite recent denials. *Energy Policy*. 64: 93-101.
- Chen, S.F., Mowery, R.A., Castleberry, V.A., van Walsum, G.P., Chambliss, C.K. (2006). High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid,

aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates. *Journal of Chromatography A*. 1104: 54-61.

Cheng, J.J. (2018). *Biomass to renewable energy resources*. CRC Press Taylor & Francis Group, L.L.C. New York.

Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 51: 1412-1421.

Chiaromonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, Ottonello, L., Torre, P., Cherchi, F. (2012). Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*. 46: 25-35.

Cho, D.H., Lee, Y.J., Um, Y., Sang, B.I., Kim, Y.H. (2009). Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83: 1035-1043.

Cho, D.H., Shin, S.J., Kim, Y.H. (2012). Effects of acetic and formic acid on ABE production by *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17: 270-275.

Clarck, J.H., Deswarte, F. (2015) *Introduction to chemical from biomass*. John Willey & Sons.

Comisión Europea (2010). *Europa 2020: Una estrategia para un crecimiento inteligente, sostenible e integrador*. Bruselas, 3.3.2010. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52010DC2020&from=ES>. Último acceso 05/12/2019.

Comisión Europea (2013). *Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones. Una estrategia de la UE a favor de los bosques y del sector forestal*. 8.4.2014. https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:2c1c71af-8384-11e3-9b7d01aa75ed71a1.0010.01/DOC_1&format=PDF. Último acceso 09/12/2019.

Cornillot, E., Nair, R.V., Papoutsakis, E.T., Soucaille, P. (1997). The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. *Journal of Bacteriology*. 179: 5442-5447.

Coz, A., Llano, T., Cifrián, E., Viguri, J., Maican, E., Sixta, H. (2016). Physico-chemical alternatives in lignocellulosic materials in relation to the kind of component for fermenting purposes. *Materials*. 9 (574).

- Demirbas, M.F., Balat, M., Balat, H. (2011). Biowastes-to-biofuels. *Energy Conversion and Management*. 52: 1815-1828.
- Díez-Antolínez, R., Hijosa-Valseiro, M., Paniagua-García, A.I., Gómez, X. (2018). In situ two-stage gas stripping for the recovery of butanol from Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation broths. *Chemical Engineering Transactions*. 64: 37-42.
- Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P. (2004). Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63: 653-658.
- Ezeji, T., Qureshi, N., Blaschek, H.P. (2007). Butanol production from agriculture residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 97 (6): 1460-1469.
- Ezeji, T., Blaschek, H.P. (2008). Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. *Bioresource Technology*. 99: 5232-5242.
- Fengel, D., Wegener, G. (1989). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. New York. Walter de Gruyter.
- Folin, O., Denis, W. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*. 12: 239-243.
- Fond, O., Engasser, J.M., Mata-El-Amouri, G., Petitdemange, H. (1986). The acetone butanol fermentation on glucose and xylose. I. Regulation and kinetics in batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 28: 160-166.
- Frank, A.B., Berdahl, J.D., Hanson, J.D., Liebig, M.A., Johnson, H.A. (2004). Biomass and carbon partitioning in switchgrass U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Northern Plains Area. *Crop Science*. 44: 1391-1396.
- Gao, K., Boiano, S., Marzocchella, A., Rehmann, L. (2014). Cellulosic butanol production from alkali-pretreated switchgrass (*Panicum virgatum*) and phragmites (*Phragmites australis*). *Bioresource Technology*. 174: 176-181.
- Geissdoerfer, M., Savaget, P., Bocken, N.M.P., Hultink, E.J. (2017). The circular economy. A new sustainability paradigm? *Journal of Cleaner Production*. 143: 757-768.

- González-Peñas, H., Lu-Chau, T.A., Botana, N., Moreira, M.T., Lema, J.M., Eibes, G. (2018). Organosolv pretreated beech wood as a substrate for acetone butanol ethanol extractive fermentation. *Wood Research and Technology Holzforschung*. 73: 55-64.
- Gottumukkala, I.D., Haigh, K., Görgens, J. (2017). Trends and advances in conversion of lignocellulosic biomass to biobutanol: Microbes, bioprocesses and industrial viability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 76: 963-973.
- Green, E.M. (2011). Fermentative production of butanol – the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 337-343.
- Grzenia, D.L., Schell, D.J., Wilckramasinghe, S.R. (2012). Membrane extraction for detoxification of biomass hydrolysates. *Bioresource Technology*. 111: 248-254.
- Guan, W., Xu, G., Duan, J., Shi, S. (2018). Acetone-Butanol-Ethanol production from fermentation of hot-water-extracted hemicellulose hydrolysate of pulping woods. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 57: 775-783.
- Hayes, D.J. (2009). An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. *Catalysis Today*. 145: 138-151.
- Heux, S., Meynial-Salles, I., O'Donohue, M.J., Dumon, C. (2015). White biotechnology: state of the art strategies for the development of biocatalyst for biorefining. *Biotechnology Advances*. 33: 1653-1670.
- Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R. (2017). Biobutanol production for apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101: 8041-8052.
- Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R. (2018a). Industrial potato peel as a feedstock for biobutanol production. *New Biotechnology*. 46: 54-60.
- Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambronero, J., Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R. (2018b). Biobutanol production from coffee silverskin. *Microbial Cell Factories*. 17 (154).
- Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambronero, J., Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R. (2020). A global approach to obtain biobutanol from corn stover. *Renewable Energy*. 148: 223-233.

- Ibrahim, M.F., Abd-Aziz, S., Yusolf, M.E.M., Phang, L.Y., Hassan, M.A. (2015). Simultaneous enzymatic saccharification and ABE fermentation using pretreated oil palm empty fruit bunch as substrate to produce butanol and hydrogen as biofuel. *Renewable Energy*. 77: 447-455.
- Ibrahim, M.F., Ramli, N., Bahrin, E.K., Abd-Aziz, S. (2017). Cellulosic biobutanol by Clostridia: Challenges and improvements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 79: 1241-1254.
- Ibrahim, M.F., Kim, S.W., Abd-Aziz, S. (2018). Advanced bioprocessing strategies for biobutanol production from biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 91: 119-1204.
- International Energy Agency, 2019. Statistics. Global energy data at your fingertips. <https://www.iea.org/statistics/?country=WORLD&year=2016&category=Energy%20supply&indicator=TPESbySource&mode=chart&dataTable=BALANCES>. Último acceso 21/11/2019.
- IPCC (2007). *Climate change 2007: the physical science basis*. Solomon, S., Quin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B. Contribution of working group 1 to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge, UK and New York, USA. Cambridge University Press, 2007.
- Jiang, W., Wen, Z., Wu, M., Li, H., Yang, J., Lin, J., Lin, Y., Yang, L., Cen, P. (2014). The effect of pH control on acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 with xylose and D-glucose and D-xylose mixture. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 22 (8): 937-942.
- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C-F. F., Ji, J. (2011). Progress in the production and application of *n*-butanol as a fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15: 4080-4106.
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 6 (16).
- Karimi, K., Tabatabaei, M., Horváth, I.S., Kumar, R. (2015). Recent trends in acetone, butanol and ethanol (ABE) production. *Biofuel Research Journal*. 8: 301-308.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K. (2011). Optimization of switchgrass and extruder parameters for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 33: 188-199.
- Kim, D. (2018). Physico-chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a mini review. *Molecules*. 23 (309).

- Kumar, M., Gayen, K. (2011). Developments in biobutanol production: New insights. *Applied Energy*. 88: 1999-2012.
- Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N., Jönsson, J. (1999). Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 77: 91-103.
- Lee, D., Owens, V.N., Boe, A., Jeranyama, P. (2007). Composition of herbaceous biomass feedstocks. South Dakota State University Publication, SGINC1-07. Brookings, SD; June 2007.
- Lee, J., Jang, Y.S., Choi, S.J., Im, J.A., Song, H., Cho, J.H. (2012). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for isopropanol-butanol-ethanol fermentation. *Applied Environmental Microbiology*. 78: 1416-1423.
- Li, J., Adhikari, S., Tu, M. (2017). Inhibition effect of aromatic aldehydes on butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *RSC Advances*. 7: 1241-1250.
- Li, J., Shi, S., Tu, M., Via, B., Sun, F.F. (2018). Detoxification of organosolv-pretreated pine prehydrolysates with anion resin and cysteine for butanol fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 186: 662-680.
- Lienhardt, J., Schripsema, J., Qureshi, N., Blaschek, H.P. (2002). Butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 in an immobilized cell biofilm reactor: increase in sugar utilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98 (100): 591-598.
- Liguori, R., Faraco, V. (2016). Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. *Bioresource Technology*. 215: 13-20.
- Liu, S., Qureshi, N. (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology*. 26: 117-121.
- Liu, Z., Ying, Y., Li, F., Ma, C., Xu, P. (2010). Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37: 495-501.
- Liu, K., Atiyeh, H.K., Pardo-Planas, O., Ramachandriya, K.D., Wilkins, M.R., Ezeji, T.C., Ujor, V., Tanner, R.S. (2015). Process development for biological production of butanol from Eastern redcedar. *Bioresource Technology*. 176: 88-97.

- Loyarkat, S., Cheirsilp, B., Umsakul, K. (2013). Direct conversion of sugars and organic acids to biobutanol by non-growing cells of *Clostridium* spp. incubated in nitrogen-free medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 171: 1726-1738.
- Lu, C., Zhao, J., Yang, S-T., Wei, D. (2012). Fed-batch fermentation for *n*-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping. *Bioresource Technology*. 104: 380-387.
- Ludwig, D., Amann, M., Hirth, T., Rupp, S., Zibek, S. (2013). Development and optimization of single and combined detoxification processes to improve the fermentability of lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*. 133: 455-461.
- Lütke-Eversloh, T., Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 634-647.
- Maddox, I.S., Steiner, E., Hirsch, S., Wessner, S., Gutiérrez, N.A., Gapes, J.R. (2000). The cause of “acid crush” and “acidogenic fermentation” during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2: 95-100.
- Malmierca, S., Díez-Antolínez, R., Paniagua, A.I, Martín, M. (2017). Technoeconomic study of biobutanol AB production. 1. Biomass pretreatment and hydrolysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 56: 1518-1524.
- Marcos, M., García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Coca, M., Bolado, S., Lucas, S. (2013). Optimization of the enzymatic hydrolysis conditions of steam-exploded wheat straw for maximum glucose and xylose recovery. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 88: 237-246.
- Martin, C., Marcet, M., Thomsen, A.B. (2008). Comparison between wet oxidation and steam explosion as pretreatment methods for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresources*. 3: 670-683.
- Martínez, A., Rodríguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O. (2000). Effects of Ca(OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulosic hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*. 69: 526-536.
- Mateo, S., Roberto, I.C., Sánchez, S., Moyá, A.J. (2013). Detoxification of hemicellulosic hydrolysate from olive tree pruning residue. *Industrial Crops and Products*. 49: 196-203.

- McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (Part 1): Overview or biomass. *Bioresource Technology*. 83: 37-46.
- Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (2017). Manual sobre las Biorrefinerías en España. Plataforma Tecnológica Española de la Biomasa (BioPlat) y Sustainable Chemistry (ES). <http://www.suschem-es.org/publicaciones.asp>.
- Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*. 65: 28-41.
- Miyafuji, H., Danner, H., Neureiter, M., Thomasser, C., Bvochora, J., Szolar, O., Rudolf, B. (2003). Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 396-400.
- Morone, A., Pandey, R.A. (2014). Lignocellulosic biobutanol production: Gridlocks and potential remedies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 37: 21-35.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*. 93: 1-10.
- Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C. (2007). Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*. 25: 231-237.
- Mussatto, S.I., Teixeira, J.A. (2010). Lignocellulosic as raw material in fermentation processes. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Méndez-Vilas (Ed.). Formatex Research Center.
- Ndaba, B., Chiyanzu, I., Marx, S. (2015). *n*-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review. *Biotechnology Reports*. 8: 1-9.
- Ni, Y., Sun, Z. (2009). Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83: 415-423.
- Nichols, N.N., Dien, B.S., Guisado, G.M., López, M.J. (2005). Bioabatement to remove inhibitors from biomass derived sugar hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 121 (124): 379-390.
- Nichols, N.N., Dien, B.S., Cotta, M.A. (2010). Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors. *Bioresource Technology*. 101: 7545-7550.

- Nizami, A.S., Rehan, M., Waqas, M., Naqvi, M., Ouda, O.K.M., Shahzad, K., Miandad, R., Khan, M.Z., Syamsiro, M., Ismail, I.M.I., Pant, D. (2017). Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Bioresource Technology*. 241: 1101-1117.
- NREL (National Renewable Energy Laboratory, USA). (2008). Determination of sugars, byproducts and degradation products in liquid fraction process samples. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>. Último acceso: 11/07/2019.
- Okuda, N., Sonuera, M., Ninomiya, K., Katakura, Y., Shioya, S. (2008). Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience Bioengineering*. 106: 128-133.
- Pallapolu, V.R., Lee, Y.Y., Garlock, R.J., Balan, V., Dale, B.E., Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Falls, M., Holtzapple, M.T., Sierra-Ramírez, R., Shi. J., Ebrik, M.A., Redmond, T., Yang, B., Wyman, C.E., Donohoe, B.S., Vinzant, T.B., Elander, R.T., Hames, B., Thomas, S., Warner, R.E. (2011). Effects of enzyme loading and β -glucosidase supplementation on enzymatic hydrolysis of switchgrass processed by leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 102: 11115-11120.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Szengyel, Z., Zacchi, G., Reczey, K. (1997). Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicelluloses hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 20: 286-293.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74: 25-33.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000b). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 74: 17-24.
- Pang, Z.W., Lui, W., Zhang, H., Liang, Z.W., Liang, J.J., Du, L.W., Duan, C.J., Feng, J.X. (2016). Butanol production employing fed-batch fermentation by *Clostridium acetobutylicum* GX01 using alkali-pretreated sugarcane bagasse hydrolysed by enzymes from *Thermoascus aurantiacus* QS 7-2-4. *Bioresource Technology*. 212: 82-91.
- Pereira, L.G., Diaz, M.O.S., Mariano, A.P., Maciel Filho, R., Bonomi, A. (2014). Economic and environmental assessment of *n*-butanol production in an integrated first and second generation sugarcane biorefinery: Fermentative versus catalytic routes. *Applied Energy*. 160: 120-131.

- 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*. *Bioresource Technology*. 244: 166-174.
- Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M.E., Feld, M., Marzocchella, A. (2017). Renewable feedstocks for biobutanol production by fermentation. *New Biotechnology*. 39: 135-140.
- Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M.E., De La Feld, M., Marzocchella, A. (2019). Agro food wastes and innovative pretreatment to meet biofuel demand in Europe. *Chemical Engineering Technology*. 42 (5):954-961.
- Quing, Q., Wyman, C.E. (2011). Hydrolysis of different chain length xylooligomers by cellulase and hemicellulase. *Bioresource Technology*. 102: 1356-1359.
- Qureshi, N., Blaschek, H.P. (2001). Recent advances in ABE fermentation: hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 27: 287-291.
- Qureshi, N., Saha, B.C., Hector, R.E., Hughes, S.R., Cotta, M.A. (2008). Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-batch fermentation. *Biomass and Bioenergy*. 32: 168-175.
- Qureshi, N., Saha, B.C., Hector, R.E., Dien, B., Hughes, S., Liu, S., Iten, L., Bowman, M.J., Sarath, G., Cotta, M.A. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II – use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass and Bioenergy*. 34: 566-571.
- Qureshi, N., Bowman, M., Saha, B., Hector, R., Berhow, M., Cotta, M. (2012). Effect of cellulosic sugar degradation products (furfural and hydroxymethyl furfural) on acetone – butanol – ethanol (ABE) fermentation using *Clostridium beijerinckii* P260. *Food Bioproducts Processing*. 90 (3): 533-540.
- Rajendran, K., Driolak, E., Varma, V.S., Muthusamy, S., Kumar, G. (2018). Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production – a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 8: 471-483.
- Ruangmee, A., Sangwichien, C. (2013). Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of narrow-leaf-cattail for bioethanol production. *Energy Conversion and Management*. 73: 381-388.
- Sarchami, T., Rehmann, L. (2014). Optimizing enzymatic hydrolysis of inulin from *Jerusalem artichoke* tubers for fermentative butanol production. *Biomass and Bioenergy*. 69: 175-182.

- Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D., Templeton, D.W. (2010). Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 9043-9053.
- Su, H., Liu, G., He, M., Tan, F. (2015). A biorefining process: Sequential, combinational lignocellulose pretreatment procedure for improving biobutanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 187: 149-160.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83: 1-11.
- Sun, Z., Liu, S. (2012). Production of *n*-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Biomass and Bioenergy*. 39: 39-47.
- Szijártó, N., Kádár, Z., Varga, E., Thomsen, A.B., Costa-Ferreira, M., Réczey, K. (2009). Pretreatment of reed by wet oxidation and subsequent utilization of the pretreated fibers for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 155: 386-396.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Science*. 9: 1621-1651.
- Thamburaj, R. (2000). Fast pyrolysis of biomass for green power generation. In: First world conference and exhibition on biomass for energy and industry. Sevilla, Spain. June 5-9, 2000.
- Travaini, R., Barrado, E., Bolado-Rodríguez, S. (2016). Effect of ozonolysis parameters on the inhibitory compound generation and on the production of ethanol by *Pichia stipitis* and acetone-butanol-ethanol by *Clostridium* from ozonated and water washed sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 218: 850-858.
- Ulusoy, Y., Arslan, R., Kaplan, C. (2009). Emissions characteristics of sunflower oil methyl ester. *Energy Sources A*. 31: 906-910.
- Valdez-Vázquez, I., Pérez-Rangel, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., Amaya-Delgado, L. (2015). Hydrogen and butanol production from native wheat straw by syntetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. *Fuel*. 159: 214-222.
- Wang, L., Chen, H. (2011). Increase fermentability of enzymatically hydrolyzed steam-exploded corn stover for butanol production by removal of fermentation inhibitors. *Process Biochemistry*. 46: 604-607.

- Wang, S., Zhang, Y., Dong, H., Mao, S., Zhu, Y., Wang, R., Luan, G., Li, Y. (2011). Formic acid triggers the “acid crush” of acetone – butanol – ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Environmental Microbiology*. 77 (5): 1674-1680.
- Wilson, D.C., Velis, C.A. (2015). Waste management - still a global challenge in the 21st century: an evidence-based call for action. *Waste Management Research*. 33 (12): 1049-1051.
- World Wide Fund for Nature (WWF). Living planet report 2014: Species and spaces, People and places. https://www.wwf.or.jp/activities/data/WWF_LPR_2014.pdf. Último acceso 12/08/2019.
- Xing, W., Xu, G., Dong, J., Han, R., Ni, Y. (2018). Novel dihydrogen-bonding deep eutectic solvents: Pretreatment of rice straw for butanol fermentation featuring enzyme recycling and high solvent yield. *Chemical Engineering Journal*. 333: 712-720.
- Xu, G.C., Ding, J.C., Han, R.Z., Dong, J.J., Ne, Y. (2016). Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. *Bioresource Technology*. 203: 364-369.
- Yu, E.K.C., Deschatelets, L., Saddler, J.N. (1984). The bioconversion of wood hydrolysates to butanol and butanediol. *Biotechnology Letters*. 5: 327-332.
- Yu, Y., Christopher. (2017). Detoxification of hemicellulose-rich poplar hydrolysate by polymeric resins for improved ethanol fermentability. *Fuel*. 203: 187-196.
- Zhang, Y., Han, B., Ezeji, T.C. (2012). Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 during butanol fermentation. *New Biotechnology*. 29 (3): 345-351.
- Zheng, J., Tashiro, Y., Yoshida, T., Gao, M., Wang, Q., Sonomoto, K. (2013). Continuous butanol fermentation from xylose with high cell density by cell recycling system. *Bioresource Technology*. 129: 360-365.
- Zhu, J., Yong, Q., Xu, Y., Yu, S.H. (2011). Detoxification of corn stover prehydrolysate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. *Bioresource Technology*. 102: 1663-1668.
- Zorpas, A.A., Lasaridi, K., Abeliotis, K., Voukkali, I., Loizia, P., Fitiri, I., Chroni, C., Bikaki, N. (2014). Waste prevention campaign regarding the waste framework directive. *Fresenius Environmental Bulletin*. 23 (11a): 2876-2883.

Capítulo/Chapter 2

2. Justificación, objetivos y metodología general

2.1. Justificación

El aumento continuo de la población mundial está generando una demanda creciente de alimentos y recursos energéticos. En este sentido, existe un importante problema en relación con la gestión de los residuos agrícolas y, por tanto, una necesidad urgente y una gran oportunidad para abordar el uso eficiente de dichos residuos, enfocadas a la protección ambiental. Por otra parte, el efecto más que demostrado que los combustibles fósiles producen sobre el cambio climático, hace que sea un reto desarrollar fuentes de energía renovables alternativas. En este escenario, el biobutanol obtenido a partir de residuos lignocelulósicos (mediante fermentación ABE) se postula como biocombustible avanzado muy prometedor y además permite llevar a cabo una gestión sostenible de residuos basada en la economía circular. Sin embargo, para conseguir solventar muchos de los problemas que aún presenta la producción de biobutanol, se requiere un mayor conocimiento de las etapas que configuran el proceso, como son la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos y la fermentación ABE de los azúcares liberados en los hidrolizados obtenidos. Además, el conocimiento, tanto de la naturaleza como de la concentración de los compuestos químicos presentes en los hidrolizados, es un punto clave para poder mejorar los rendimientos de la etapa de fermentación. Por lo tanto, abordar con detalle el estudio de estos aspectos, permitiría un acercamiento hacia la optimización del proceso, aumentando la rentabilidad económica y sostenibilidad de la producción de biobutanol.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es evaluar el proceso de hidrólisis de biomásas lignocelulósicas de diferente naturaleza, en concreto cultivos energéticos no destinados a consumo humano o animal y residuos de la industria agro-alimentaria, comparando la eficacia de distintos tipos de pretratamientos físico-químicos, seguidos de una etapa de sacarificación enzimática, para rendir azúcares fermentables que serán transformados en biobutanol mediante fermentación ABE por bacterias del género *Clostridium*.

2.2.2. Objetivos específicos

Para alcanzar el objetivo global establecido en esta Tesis Doctoral, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la hidrólisis de los polisacáridos presentes en distintos tipos de residuos lignocelulósicos (*P. virgatum*, bagazo de manzana, piel de patata, bagazo de cerveza y piel de grano de café) comparando la eficacia de distintos pretratamientos físico-químicos en cuanto a la obtención de hidrolizados con altas concentraciones de azúcares fermentables.
2. Optimizar las variables de operación (carga de biomasa, concentración de ácido y tiempo) del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido de *P. virgatum*, para obtener hidrolizados que presenten una concentración máxima de azúcares fermentables con una mínima generación de compuestos inhibidores de la fermentación.
3. Estudiar la fermentabilidad ABE de los hidrolizados ácidos de *P. virgatum* obtenidos en las condiciones de pretratamiento que permiten maximizar el rendimiento de generación de azúcares fermentables (Objetivo 2). Seleccionar la cepa bacteriana de *Clostridium* más eficiente en cuanto a la concentración de butanol producida por la fermentación ABE de dichos hidrolizados.
4. Evaluar el efecto producido por la presencia de compuestos inhibidores generados en el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido de *P. virgatum*, sobre la concentración de butanol producida en la fermentación ABE.
5. Analizar la eficacia de diferentes métodos de detoxificación de tipo físico-químico estudiando su influencia en la composición química de los hidrolizados de *P. virgatum*, en la eliminación de compuestos inhibidores y en el aumento del rendimiento de la fermentación ABE de los mismos.
6. Realizar, mediante GC-MS/MS, un estudio detallado de identificación de los compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación presentes en hidrolizados lignocelulósicos de distinta naturaleza en cuanto a tipo de biomasa lignocelulósica empleada (bagazo de manzana, piel de patata, bagazo de cerveza y piel de grano de café) y pretratamiento aplicado.

7. Desarrollar y validar un método cromatográfico sencillo, rápido y robusto que permita cuantificar simultáneamente los compuestos fenólicos presentes con mayor frecuencia, en hidrolizados lignocelulósicos.

2.3. Metodología general

Para alcanzar los objetivos generales y específicos de la tesis, se ha llevado a cabo la metodología que se recoge en los diferentes capítulos de la tesis y que se describe a continuación.

En el **Capítulo 1** se presenta un apartado de Introducción que recoge los principales antecedentes del proceso de producción del butanol a partir de biomasa lignocelulósica mediante fermentación ABE por bacterias del género *Clostridium*.

En el **Capítulo 2** se justifica la necesidad de los estudios realizados en esta Tesis Doctoral y se establecen los objetivos y la metodología a desarrollar en los capítulos experimentales.

Para estudiar la hidrólisis de los polisacáridos que forman parte de distintas biomásas lignocelulósicas, con el fin de obtener azúcares fermentables, (**Objetivo 1**) se ha trabajado con *Panicum virgatum* (**Capítulo 3**) y con cuatro residuos de la industria agroalimentaria: bagazo de manzana, piel de patata, bagazo de cerveza y piel de grano de café (**Capítulo 5**). De este modo, en el **Capítulo 3** se estudió la influencia de las principales variables de operación (carga de biomasa, concentración de ácido y tiempo) del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido en la hidrólisis de *P. virgatum*. El pretratamiento ácido se completó con una etapa de hidrólisis enzimática del sólido pretratado, en condiciones previamente seleccionadas, para liberar azúcares fermentables a partir de los polisacáridos que permanecen en el sólido pretratado, principalmente en forma de celulosa. Del mismo modo, en el **Capítulo 5** se compararon los efectos producidos por distintos agentes químicos, aplicados bajo idénticas condiciones de temperatura y tiempo, utilizados en el pretratamiento físico-químico de los cuatro residuos agroalimentarios citados previamente, seguidos también de una etapa de hidrólisis enzimática bajo condiciones previamente fijadas.

Para alcanzar el **Objetivo 2**, en el **Capítulo 3** se desarrolló un diseño experimental utilizando metodología de superficie de respuesta (RSM), que condujo a la optimización de las condiciones de operación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, realizado con *P. virgatum*, permitiendo alcanzar una recuperación de azúcares fermentables máxima con una

mínima generación de compuestos inhibidores para no producir inhibición sobre la fermentación ABE de los hidrolizados obtenidos.

En el **Capítulo 4** se estudió la fermentación ABE del hidrolizado hemicelulósico de *P. virgatum*, obtenido bajo las condiciones de pretratamiento optimizadas en el Capítulo 3. Así, se realizaron ensayos de fermentación con ocho cepas silvestres diferentes de *Clostridium* (*C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii*) y se seleccionó la cepa más eficiente, en cuanto a la producción de butanol, para llevar a cabo la fermentación ABE de dicho hidrolizado (**Objetivo 3**). Además, se analizaron los efectos de inhibición sobre la fermentación ABE que ejercen los compuestos presentes en los hidrolizados de *P. virgatum* (**Objetivo 4**). Por último, y para cumplir el **Objetivo 5**, se evaluó la eficacia de diferentes procesos físico-químicos en la detoxificación del hidrolizado hemicelulósico de *P. virgatum* en cuanto a la modificación de la composición química y del rendimiento de fermentación ABE.

Para dar respuesta al **Objetivo 6**, en el **Capítulo 5** se llevó a cabo un estudio de identificación de compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación ABE, que están presentes en hidrolizados de cuatro residuos de la industria agroalimentaria (bagazo de manzana, piel de patata, bagazo de cerveza y piel de grano de café), mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). Además, se desarrolló y validó un método cromatográfico sencillo, rápido y robusto, utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD). El método desarrollado permite cuantificar simultáneamente los principales compuestos inhibidores identificados en los hidrolizados lignocelulósicos, cumpliendo así el **Objetivo 7**.

En el **Capítulo 6** se exponen las principales conclusiones de la actividad experimental desarrollada en esta Tesis Doctoral.

La edición de cada capítulo experimental sigue la estructura definida por la revista científica en la que ha sido publicado y consta de los siguientes apartados: resumen, introducción, material y métodos, resultados y discusión, conclusiones y bibliografía.

El trabajo fue realizado de acuerdo con el siguiente esquema (Figura 2.1):

Capítulo 1. Introducción y antecedentes.

Capítulo 2. Justificación, objetivos y metodología general.

Capítulo 3. Optimización del pretratamiento de *Panicum virgatum* L. con ácido sulfúrico diluido para la producción de azúcares fermentables mediante metodología de superficie de respuesta.

Chapter 3. Response surface optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for fermentable sugars production.

Capítulo 4. La hidrólisis enzimática y la detoxificación de la biomasa lignocelulósica no son siempre necesarias para la fermentación ABE: El caso del *Panicum virgatum*.

Chapter 4. Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: The case of *Panicum virgatum*.

Capítulo 5. Desarrollo y validación de un método de HPLC-DAD para la determinación simultánea de los principales compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación ABE identificados en hidrolizados de residuos agroindustriales.

Chapter 5. Development and validation of a HPLC-DAD method for simultaneous determination of main potential inhibitors identified in agro-food waste hydrolysates.

Capítulo 6. Conclusiones y propuestas / Conclusions and proposals.

Figura 2.1. Esquema de la metodología general del trabajo.

Capítulo/Chapter 3

3. Response surface optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for fermentable sugars production

Abstract

*Pretreatment of lignocellulosic materials to disrupt their recalcitrant structures is a crucial step on second generation biofuel production. In this study, response surface methodology (RSM) was used to investigate the effects of dilute sulfuric acid hydrolysis conditions on switchgrass (*Panicum virgatum* L.). A central composite rotatable design (CCRD) was applied to assess the effect of acid concentration (0.16 – 1.84%, w/w), solid load (4.9 – 30.1%, w/w) and hydrolysis time (9.6 – 110.5 min), on glucose, xylose and total sugars (glucose, xylose and arabinose) recovery yields and total inhibitors generated (acetic acid, levulinic acid, 5-hydroxymethylfurfural and furfural) after acid hydrolysis. Afterwards, enzymatic hydrolysis of the solid phase was performed as a second treatment step. Experimental data were fitted to a second order polynomial model to find the optimum acid hydrolysis conditions by multiple regression analysis. The results show a strong dependence of total sugars recovery and total fermentation inhibitors on acid concentration, and a weaker dependence on solid load and acid hydrolysis time. The optimized hydrolysis conditions, predicted by the polynomial model, were 1.72% (w/w) of sulfuric acid concentration and 112.0 min of acid hydrolysis time, for a fixed value of 10.0% (w/w) of solid load, with a total sugars yield of 78.8% for acid hydrolysis combined with a subsequent enzymatic hydrolysis step.*

Keywords: Switchgrass, dilute sulfuric acid pretreatment, enzymatic hydrolysis, RSM.

A.I. Paniagua-García, R. Díez-Antolínez, M. Hijosa-Valseiro, M.E. Sánchez, M.

Chemical Engineering Transactions 49 (2016): 223-228. DOI: 10.3303/CET1649038

3.1. Introduction

The transport sector worldwide depends almost entirely on fuels derived from petroleum. A strategy for reducing the rate of fossil fuel consumption is to increase the use of renewable biofuels. Lignocellulosic materials (e.g., corn stover, switchgrass, wheat straw, forest wastes, etc.) enable the production of second generation biofuels, since these raw materials are not employed as human or animal food. In addition, lignocellulosic biomass is abundant, cheap and renewable and consists of approximately 75% polysaccharides (Bayer et al., 2007). Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) is a perennial warm-season grass with high productivity, rapid growth, low water and nutritional requirements and a high tolerance to heat, cold and drought (McLaughlin et al., 1999). This vegetal species can be used for the production of biofuels, and most research studies have been focused on ethanol generation (Keshwani and Cheng, 2009).

The conversion of lignocellulosic materials to bioalcohols consists of three main steps: pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation. The objective of the pretreatment is to alter the structure of the lignocellulosic matrix to increase cellulose digestibility. For efficient conversion of lignocellulosic biomass into fermentable sugars, the choice of pretreatment is extremely important (Diaz et al., 2013; Karapatsia et al., 2014). Each pretreatment has certain disadvantages, especially regarding the generation of compounds that can potentially act as inhibitors of enzymatic hydrolysis and fermentation. Acid based hydrolysis is considered to be an economical viable pretreatment process (Chandra et al., 2007). Dilute acid pretreatment targets the hemicellulose fraction liberating pentose sugars while redistributing lignin and disrupting the crystalline structure of cellulose fibrils. Cellulose hydrolysis, based on the selective degradation of cell-wall components by specific enzymes (Zuorro et al., 2015), is thus enhanced by the resulting increase in porosity and overall surface area of the treated material (Jeoh et al., 2007).

Response surface methodology (RSM) has been used successfully in many fields, including biomass pretreatments (Avci et al., 2013). In this paper, pretreatment of switchgrass with dilute sulfuric acid was conducted, using RSM with a central composite rotatable design (CCRD). The objective was to find the optimal conditions for the main hydrolysis parameters: acid concentration, biomass load and hydrolysis time, leading to maximum recovery of sugars

and minimum generation of inhibitors in order not to affect the further stages of enzymatic hydrolysis and acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation with *Clostridium* sp.

3.2. Material and methods

3.2.1. Raw material

Switchgrass (*P. virgatum*), *Alamo* variety, was used to conduct the experimental runs. Switchgrass was grown in a test plot of ITACyL (Agrarian Technologic Institute of Castile and Leon) located in Valladolid (Spain). The material was produced and harvested at the beginning of November 2013. Feedstock was dried in an oven at 45 °C for 48 h, ground in a SM100 Comfort rotary mill (Retsch GmbH, Haan, Germany) and passed through a 1.0 mm screen (Ruangmee and Sangwichien, 2013). Milled material was stored at room temperature in airtight containers until being used.

3.2.2. Acid hydrolysis pretreatment

Dilute sulfuric acid at three different acid concentrations: 0.5, 1.0 and 1.5% (w/w) was used to treat 10 g of milled switchgrass at three different solid loads: 10, 17.5 and 25% (w/w). Pretreatment was performed in an autoclave at 121 °C (103 kPa) during three different times: 30, 60 and 90 min. The ranges and levels of the independent variables were determined according to preliminary studies. Different combinations of acid concentration, solid load and acid hydrolysis time were planned by an experimental design according to the RSM design.

After the autoclave pretreatment, the samples were cooled and the solid residue was recovered by vacuum filtration and washed with distilled water until it reached neutral pH, using a Buchner funnel with cellulose filters (Model 1238, Filter Lab, Barcelona, Spain). The liquid of the acid hydrolysis and the first aliquot of wash water were collected, separately, to measure the recovered volumes and analyze fermentable sugars (glucose, xylose and arabinose) and inhibitors (acetic acid, levulinic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and furfural) concentrations. Pretreated solids were dried in an oven at 45 °C during 48 h. Thereafter, moisture content was determined before storing in a plastic container at room temperature to be further used as substrate for the enzymatic saccharification.

3.2.3. Severity factor

The severity factor (SF) allows the comparison of different experimental conditions of dilute sulfuric acid pretreatment by combining the variables time, temperature and acid concentration according to Eq (1), (Lee et al., 2013):

$$SF = \log\{t * \exp[(T_H - 100)/ 14.75]\} - \text{pH} \quad (1)$$

where t is the acid hydrolysis time (min), T_H is the acid hydrolysis temperature (°C) and pH is the acidity of the dilute sulfuric acid solution used for the pretreatment.

3.2.4. Enzymatic hydrolysis

Pretreated solids were used as a substrate to study the effect of dilute sulfuric acid pretreatment in the subsequent hydrolysis of sugars by enzymes. The cellulose hydrolyzing enzymes Novozyme 50013 (cellulose complex), with an activity of 70 filter paper units FPU g⁻¹, and Novozyme 50010 (β-glucosidase), with an activity of 250 cellobiose units CBU g⁻¹, were used in all experiments. Enzymes were kindly provided by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark).

Enzymatic hydrolysis tests were carried out in 100 mL capped Erlenmeyer flasks containing 1 g of pretreated switchgrass (dry basis) and 33 mL of 50 mM citrate buffer (pH 4.8) together with 70 μL β-glucosidase enzyme (22 CBU g⁻¹ pretreated biomass) and 300 μL cellulase complex enzyme (25 FPU g⁻¹ pretreated biomass). Samples were incubated at 50 °C and 150 rpm in an Infors HT Minitron orbital shaker (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) during 48 h. After that, the samples were cooled at room temperature, filtered and washed with 20 mL distilled water using a Buchner funnel with cellulose filters. The liquid of the enzymatic hydrolysis and the wash water were taken separately and used for sugar analysis. Enzymatic hydrolysis was evaluated by the ratio of total sugars mass (glucose, xylose and arabinose) released by unit of dry biomass (mg total sugars/g dry biomass).

3.2.5. Analytical methods

Moisture, ash and protein contents of the biomass were determined according to the National Renewable Energy Laboratory procedures (NREL, 2008). Structural carbohydrates including glucan, xylan and arabinan, as well as acid insoluble lignin (AIL) and acid soluble lignin (ASL) were examined using a two-stage sulfuric acid hydrolysis procedure (NREL, 2008).

The concentrations of released sugars (C6 sugars reported as glucose and C5 sugars reported as a total of xylose and arabinose), organic acids (acetic acid and levulinic acid), furfural and 5-HMF were determined according to NREL (2008). These compounds were quantified in liquid hydrolyzates on an Agilent 1200 HPLC equipment (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with a 300 x 7.8 mm i.d. cation exchange column Aminex HPX-87H (Biorad, Hercules, CA, USA) and a Refractive Index Detector (RID, G1362A, Agilent Technologies). The mobile phase was 5 mM H₂SO₄ at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ and 60 °C. The injection volume was 20 µL. All samples were filtered through 0.22 µm filters prior to analysis.

3.2.6. Experimental design

A CCRD with three variables was used to determine the optimum combination of acid concentration, biomass load and hydrolysis time for maximizing the sugar recovery while minimizing the inhibitor concentrations. The experimental design was planned using Minitab 16 software (Minitab, State College, Pennsylvania, USA), which resulted in 19 trials. The experiments were performed with different combinations of the independent variables that include: 8 trials for factorial design, 6 trials for axial points (two for each variable) and 5 trials for replication of the central point. Each variable was studied at three levels with two axial points as can be seen in Table 3.1. The analysis of variance (ANOVA) of the results, the fitting models and the optimum determination were performed with Minitab 16 software.

Further information on material and methods is presented in Annex I (Anexo I).

3.3. Results and discussion

3.3.1. Characterization of switchgrass

The compositional analysis of the untreated switchgrass (% dry basis) was: 33.0 ± 0.4 glucan, 21.4 ± 0.4 xylan, 2.4 ± 0.4 arabinan, 20.3 ± 1.2 acid insoluble lignin, 4.6 ± 0.2 acid soluble lignin and 7.0 ± 0.4 ash. The glucan, xylan, arabinan, lignin and ash contents of switchgrass were in agreement with values reported by other authors (Hu and Wen, 2008; Monti et al., 2008). The total protein in the feedstock was 1.6 ± 0.1%. It is well known that there is a strong correlation between protein and the degree of cell wall lignification. Low protein content leads to high lignin contents (Hatfield et al., 1994).

3.3.2. Effect of acid hydrolysis conditions on sugar recovery and inhibitor generation

After performing the dilute sulfuric acid pretreatment, a significant amount of fermentable sugars was found in the hydrolysates, especially xylose. After pretreatment, recovered solids were subjected to subsequent enzymatic hydrolysis that leads to glucose release. Total sugars recovery and total inhibitors generation were calculated as the sum of the compounds recovered in the liquid of dilute acid pretreatment and in the enzymatic hydrolysates. Glucose, xylose, total sugars [sum of glucose, xylose and arabinose] and total potential inhibitors [sum of acetic acid (the main inhibitor produced), levulinic acid, 5-HMF and furfural] were calculated on the basis of grams of dry switchgrass. The results are presented in Table 3.1, which relates the severity factor (SF) and independent variables of dilute acid pretreatment with the observed responses.

Table 3.1. Experimental design showing actual (and coded) values for independent variables; severity factors (SF) and observed and predicted values for responses. Notes: Obs: observed; Pred: predicted.

Trial	Independent variables			SF	Glucose, mg g ⁻¹		Xylose, mg g ⁻¹		Tot Sug, mg g ⁻¹		Tot Inh, mg g ⁻¹	
	Ac conc, %	Sol load, %	t, min		Obs	Pred	Obs	Pred	Obs	Pred	Obs	Pred
1	1.5(+1)	25(+1)	30(-1)	1.58	145	148	191	198	364	376	26	28
2	1(0)	17.5(0)	60(0)	1.71	150	144	211	211	385	382	26	27
3	0.5(-1)	10(-1)	30(-1)	1.10	118	111	91	93	233	226	15	14
4	1(0)	17.5(0)	60(0)	1.71	146	144	224	211	397	382	29	27
5	0.5(-1)	10(-1)	90(+1)	1.58	139	136	192	185	361	348	25	23
6	1(0)	17.5(0)	9.6(-1.68)	0.91	122	123	104	118	253	268	21	20
7	1(0)	17.5(0)	60(0)	1.71	142	144	215	211	385	382	30	27
8	1(0)	17.5(0)	110.5(+1.68)	1.97	164	163	225	211	420	406	30	30
9	1(0)	30.1(+1.68)	60(0)	1.71	136	132	148	145	307	300	22	20
10	1.5(+1)	10(-1)	30(-1)	1.58	156	159	233	216	421	410	30	31
11	1.5(+1)	10(-1)	90(+1)	2.06	176	178	245	262	462	480	36	37
12	1.84(+1.68)	17.5(0)	60(0)	1.97	175	166	243	240	456	441	36	34
13	1(0)	17.5(0)	60(0)	1.71	143	144	206	211	378	382	26	27
14	1(0)	17.5(0)	60(0)	1.71	140	144	198	211	363	382	27	27
15	1.5(+1)	25(+1)	90(+1)	2.06	164	171	219	217	412	419	30	31
16	0.16(-1.68)	17.5(0)	60(0)	0.91	63	72	29	32	102	117	3	4
17	0.5(-1)	25(+1)	90(+1)	1.58	112	108	76	92	206	218	12	12
18	1(0)	4.9(-1.68)	60(0)	1.71	161	165	234	238	429	437	31	32
19	0.5(-1)	25(+1)	30(-1)	1.10	81	79	44	28	141	123	6	6

It was observed that the highest values of SF produced the highest concentrations of hydrolyzed sugars and inhibitors. It was verified that the removal of hemicelluloses (higher xylose recovery) enhanced the digestibility of cellulose (higher glucose recovery), as already observed by Chandra et al. (2007).

3.3.3. Statistical analysis

An ANOVA was performed to analyze the experimental data given in Table 3.1 and evaluate the effects of variables and their possible interactions. Coefficients of the model were evaluated by regression analysis and tested for their significance. ANOVA fittings of quadratic models for all responses are shown in Table 3.2.

Table 3.2. ANOVA table for the adjusted model of different responses.

Response	Source	Sum of squares	DF	Mean square	F Value	p-value	R ² / Adj R ²
Glucose	Model	15128.3	9	1680.9	35.17	0.000	0.97/0.95
	Lack of fit	373.1	5	74.6	5.24	0.067	
	Residual	430.1	9	47.8			
Xylose	Model	87098.5	9	9677.6	43.85	0.000	0.98/0.96
	Lack of fit	1617.8	5	323.6	3.51	0.124	
	Residual	1986.5	9	220.7			
Total sugars	Model	196532.3	9	21837.1	67.29	0.000	0.99/0.97
	Lack of fit	2311.2	5	461.9	3.03	0.152	
	Residual	2920.7	9	324.9			
Total inhibitors	Model	1512.7	9	168.1	47.72	0.000	0.98/0.96
	Lack of fit	19.9	5	4.0	1.41	0.396	
	Residual	31.7	9	3.5			

The significance shown by R² and adjusted R² values indicates that variation in the responses was attributed to the three independent variables at more than 95% confidence level. The large F values and the corresponding small p-values also confirm that the models are significant. The goodness of the fit for the models is therefore assumed.

A three-variable quadratic polynomial regression model to predict glucose (Y_G), xylose (Y_X), total sugars (Y_{TS}) and total inhibitors (Y_{TI}) as a function of the three independent parameters: acid concentration (%), A), solid load (%), B) and hydrolysis time (h), C) was developed. The models in terms of non-coded variables are given in Eq (2), (3), (4) and (5):

$$Y_G = 52.07 + 128.21A - 1.28B + 0.39C - 36.37A^2 \quad (2)$$

$$Y_X = -72.71 + 326.52A - 3.66B + 2.96C - 101.40A^2 - 0.02C^2 \quad (3)$$

$$Y_{TS} = 75.72 + 395.86A - 10.10B + 3.41C - 142.31A^2 - 0.02C^2 + 4.65AB \quad (4)$$

$$Y_{TI} = -0.82 + 40.95A - 0.47B + 0.10C - 11.64A^2 \quad (5)$$

These equations predict all the responses considerably well with high R^2 and low p -values (Table 3.2). The importance of the independent variables and their effects can also be explained by the magnitude and sign of the coefficients. As observed from Eqs (2)-(5), acid concentration and hydrolysis time had a positive influence, whereas solid load had a negative influence on sugar recoveries and inhibitor generation. The magnitudes of the acid concentration linear terms were considerably higher than those of hydrolysis time and solid load. These observations are in agreement with previous works with sorghum bagasse that pointed out that the main effect was given by the acid concentration followed by hydrolysis time (Heredia-Olea et al., 2012). However, the quadratic terms of acid concentration negatively contributed to all responses. In addition, quadratic terms of hydrolysis time negatively contributed to xylose and total sugars recoveries, and were not significant (p -values < 0.05) to glucose and total inhibitors. The interactions between independent variables were only significant for the positive interaction of acid concentration and solid load on total sugars. The predicted results obtained from quadratic models are shown in Table 3.1.

3.3.4. Optimization and response surface plots

The ANOVA analysis of optimal conditions was mathematically performed based on glucose, xylose, total sugars and total inhibitors. The objective was to maximize fermentable sugar recoveries while keeping the total inhibitors below 40 mg g^{-1} to avoid inhibition of *Clostridium* sp. The optimum values for the independent variables were found to be: 0.96% (w/w) acid concentration, 4.9% (w/w) solid load and 110.5 min hydrolysis time. The predicted and observed responses at optimal conditions are shown in Table 3.3.

Table 3.3. Predicted and observed responses at optimal conditions for the three-independent-variable model.

Responses	Pred (mg g ⁻¹)	Yield _{pred} (%)	Obs (mg g ⁻¹)	Yield _{obs} (%)	Deviation (%)
Glucose	178.7	48.7	197.0	53.7	10.2
Xylose	254.9	104.9	253.4	104.2	-0.6
Total sugars	476.4	74.8	485.8	76.3	2.0
Total inhibitors	35.8		36.6		2.2

The optimal values for the solid load and hydrolysis time correspond to the axial points of the experiment. Therefore, another complementary CCRD was used to design an experiment taking into account only acid concentration and hydrolysis time (the most significant variables), with wider ranges of values to know if the optimal values were beyond the axial points, and optimize the same responses for switchgrass. For this experiment, the solid load was fixed at 10% (w/w) for all trials (Avci et al., 2013; Ruangmee and Sangwichien, 2013). The experiment resulted in 13 trials (4 trials for factorial design, 4 trials for axial points and 5 trials for replication of the central point). Acid concentration was studied at three levels (0.75, 1.88 and 3.00%) with two axial points (0.28 and 3.47%) and hydrolysis time at three levels (30, 90 and 150 min) with two axial points (5.2 and 174.9 min). A two-variable quadratic polynomial regression model was developed, which was estimated as significant with an ANOVA. Figure 3.1 shows the contour plots associated to the response surface. The contour plots seem to confirm that there were significant interactions between acid concentration and hydrolysis time on glucose, xylose and total sugars recoveries and total inhibitors generation. Figure 3.1 shows that acid concentration had a more significant influence on glucose, xylose, total sugars recoveries and total inhibitors generation than the hydrolysis time because there were more response line levels located in the predefined range of acid concentration. The final optimal conditions for glucose, xylose, total sugars recoveries and total inhibitors generation were: acid concentration of 1.72% (w/w) and hydrolysis time of 112.0 min. The responses for these optimal conditions are shown in Table 3.4.

Sugar yields observed for the optimal conditions for two experiments (three independent variables and two independent variables) were similar, and there were no significant differences between them ($p < 0.05$).

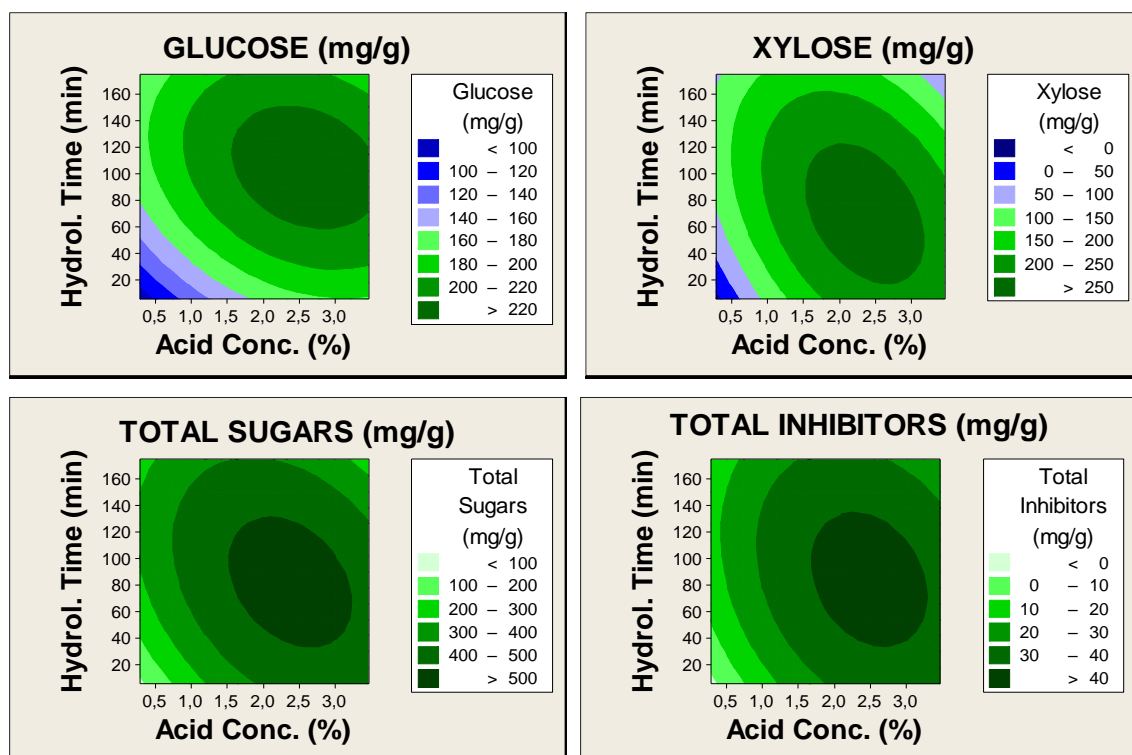


Figure 3.1. 2-D contour plots between coupled acid concentration (%) and hydrolysis time (min) for glucose (mg g^{-1}), xylose (mg g^{-1}), total sugars (mg g^{-1}) and total inhibitors (mg g^{-1}).

Table 3.4. Predicted and observed responses at optimal conditions for the two-independent-variable model.

Responses	Pred (mg g^{-1})	Yield _{pred} (%)	Obs (mg g^{-1})	Yield _{obs} (%)	Deviation (%)
Glucose	222.9	60.8	196.8	53.7	-11.7
Xylose	245.0	100.8	266.0	109.4	8.6
Total sugars	502.1	78.8	502.2	78.8	0.0
Total inhibitors	39.4		42.9		8.9

3.4. Conclusions

The RSM is an effective method to optimize the operation parameters (acid concentration, solid load and hydrolysis time) of dilute sulfuric acid pretreatment of switchgrass to predict the maximum glucose, xylose and total fermentable sugars yields and a concentration of total inhibitors that does not affect the subsequent ABE fermentation by *Clostridium* sp. Optimal conditions were achieved with 1.72% (w/w) acid concentration, 112.0 min hydrolysis time and 10.0% (w/w) solid load. Under these conditions, a maximum glucose release of 196.8 mg g^{-1} (53.7% yield), a xylose release of 265.99 mg g^{-1} (109.4% yield) and total

sugar release of 502.2 mg g⁻¹ (78.8% yield), with a generation of total inhibitors of 42.9 mg/g, were obtained.

3.5. Acknowledgements

Authors are grateful to ITACyL and European Regional Development funds (FEDER) (POCTEP Project N° 0450_AGRI_SOS_E_6) for financial support. MH-V is supported by a postdoctoral contract (DOC-INIA, grant number DOC 2013-010) funded by the Spanish Agricultural and Agrifood Research Institute (INIA) and the European Social Fund. Authors thank R. Antón and N. del Castillo for their technical help.

3.6. References

- Avcı A., Saha B.C., Dien B.S., Kennedy G.J., Cotta M.A., 2013, Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production, *Bioresource Technology*, 130, 603-612.
- Bayer E.A., Lamed R., Himmel M.E., 2007, The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management, *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 237-245.
- Chandra R., Bura R., Mabee W., Berlin A., Pan X., Saddler J., 2007, Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics, *Biofuels*, Ed. Olssen L., Springer, Heidelberg, 67-93.
- Diaz A., Le Toullec J., Blandino A., de Ory I., Caro I., 2013, Pretreatment of rice hulls with alkaline peroxide to enhance enzyme hydrolysis for ethanol production, *Chemical Engineering Transactions*, 32, 949-954, DOI: 10.3303/CET1332159.
- Hatfield R.D., Jung H.J.G., Ralph J., Buxton D.R., Weimer P.J., 1994, A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65, 51-58.
- Heredia-Olea E., Pérez-Carrillo E., Serna-Saldívar O., 2012, Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology, *Bioresource Technology*, 119, 216-223.
- Hu Z., Wen Z., 2008, Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave assisted alkali pretreatment, *Biochemical Engineering Journal* 38 (3), 369-378.
- Jeoh T., Ishizawa C., Davis M., Himmel M., Adney W., Johnson D., 2007, Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility, *Biotechnology Bioengineering*, 98, 112-122.
- Karapatsia A., Penloglou G., Pappas I., Kiparissides C., 2014, Bioethanol production via the fermentation of *Phalaris aquatica* L. hydrolysate, *Chemical Engineering Transactions*, 37, 289-294, DOI: 10.3303/CET1437049.
- Keshwani D.R., Cheng J.J., 2009, Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review, *Bioresource Technology*, 100, 1515-1523.

Lee J.Y., Ryu H.J., Oh K.K., 2013, Acid catalyzed hydrothermal severity on the fractionation of agricultural residues for xylose rich hydrolyzates, *Bioresource Technology*, 132, 84-90.

McLaughlin S.B., Bouton J., Bransby D., Conger B.V., Ocumpaugh W.R., Parrish D.J., Taliaferro C., Vogel K.P., Wulschleger S.D., 1999, Developing switchgrass as a bioenergy crop. *Perspectives on New Crops and New Uses*, Ed. Janick J., ASHS Press, Alexandria VA, 282-299.

Monti A., Di Virgilio N., Venturi G., 2008, Mineral composition and ash content of six major energy crops, *Biomass and Bioenergy*, 32, 216-223.

NREL (National Renewable Energy Laboratory, USA), 2008, Standard procedures for biomass composition analysis www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html> accessed 28.10.2015

Ruangmee A., Sangwichien C., 2013, Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of narrow-leaf cattail for bioethanol production, *Energy Conversion and Management*, 72, 381-388.

Zuorro A., Lavecchia R., Maffei G., Marra F., Miglietta S., Petrangeli A., Familiari G., Valente T., 2015, Enhanced lipid extraction from unbroken microalgal cells using enzymes, *Chemical Engineering Transactions*, 43, 211-216, DOI: 10.3303/CET1543036.

Capítulo/Chapter 4

4. Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: The case of *Panicum virgatum*

Abstract

Hemicellulosic hydrolysate of switchgrass, pre-treated with dilute sulfuric acid, was assessed for butanol production via acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. Clostridium beijerinckii CECT 508 was selected among eight wild strains as the most efficient to produce butanol from glucose/xylose mixtures. The effects of inhibitory compounds from the acid hydrolysate on ABE fermentation were studied using model fermentation media, observing that the most harmful inhibitors were acetic acid > phenolic compounds > sulfate > furfural, while 5-HMF and levulinic acid seemed to have no effect. Several detoxification treatments, including evaporation, overliming and activated charcoal adsorption, were evaluated to remove inhibitors from switchgrass acid hydrolysate. Although activated charcoal was the most effective method, there were no significant differences in butanol production between non-detoxified and detoxified hydrolysates. The non-detoxified switchgrass acid hydrolysate (containing 26 g L⁻¹ xylose, 4 g L⁻¹ glucose and 4 g L⁻¹ arabinose) was successfully fermented by C. beijerinckii CECT 508, obtaining 4.00 ± 0.71 g L⁻¹ butanol (yield 0.184 ± 0.032 g g⁻¹). To the best of our knowledge, this is the first time that a hydrolysate obtained from switchgrass has been efficiently fermented to butanol without previous enzymatic hydrolysis or detoxification steps, using a non-genetically modified Clostridium strain.

Keywords: Hemicellulosic hydrolysate, Switchgrass, ABE fermentation, *Clostridium beijerinckii*, Inhibitors, Detoxification.

A.I. Paniagua-García, R. Díez-Antolínez, M. Hijosa-Valsero, M.E. Sánchez, M. Coca

Biomass and Bioenergy 116 (2018) 131-139. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.06.006

4.1. Introduction

During the last years, there has been an increasing interest in the production of ethanol and butanol as alternative biofuels because of two fundamental reasons: the finite rate of fossil fuels and the environmental deterioration worldwide. Butanol has greater advantages compared to ethanol as a fuel, since it is more hydrophobic, has higher energy density and higher boiling point, and can be mixed with gasoline in any proportion without modification of the gasoline engines [1].

Butanol can be produced by anaerobic sugar fermentation from a variety of feedstocks (like lignocellulosic biomass) using *Clostridium* strains (e.g. *C. acetobutylicum* or *C. beijerinckii*). This process is known as acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation.

Lignocellulosic biomass (corn stover, switchgrass, wheat straw, forest wastes, etc.) is considered an abundant and cheap material and consists mainly of polysaccharides containing hexose and pentose sugars [2]. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) presents a series of advantages to be used as an energy crop, such as its high production yield and low needs for water and nutrients for its growth, which makes it suitable to be produced in lands considered of bad quality for other crops [3]. Clostridia strains are not able to use lignocellulose directly as a carbon source, instead of this, lignocellulose has to be hydrolyzed in order to obtain five and six-carbon sugars which can be metabolized by this bacterial group [4]. The hydrolysis of the biomass usually consists of a physical-chemical pretreatment (to alter the structure of lignocellulose and to increase cellulose digestibility) followed by a subsequent enzymatic hydrolysis [5]. The pretreatment choice is very important to achieve an efficient conversion of the lignocellulosic material into fermentable sugars [6].

Dilute acid pretreatment is one of the most used techniques due to its high efficiency and low cost. This kind of pretreatment dissolves hemicellulose releasing mainly pentoses, redistributes lignin and increases cellulose digestibility in the pretreated material [7]. For many lignocellulosic materials, such as switchgrass, hemicellulose constitutes one third of its total carbohydrates [7], therefore, the efficient use of sugars from the hemicellulose fraction is essential to maximize butanol production in an economically favorable process [8].

On the other hand, the main problem related to dilute acid pretreatment is the generation of fermentation inhibitory compounds [9]. These microbial toxic chemicals can be

classified into four types: sugar degradation products, lignin degradation products, structural compounds of lignocellulose, and heavy metallic ions [10] and from these, carboxylic acids, aldehydes, furans and phenolics are the most common inhibitory compounds [11]. To overcome the inhibitory effect of these products present in acid hydrolysates, several detoxification methods (physical, chemical and biological) have been proposed. The composition of the hemicellulosic hydrolysate and the microbial species employed to ferment, determine the effectiveness of a detoxification method [12].

In this way, although in most of the processes the liquid fraction coming from the acid pretreatment is discarded, and only the solid biomass is further used, this liquid fraction can be used for ABE fermentation, especially when the lignocellulosic substrate contains a significant fraction of xylan [13]. The fermentation of hemicellulosic hydrolysates of corn fiber treated with dilute sulfuric acid has been reported for butanol production by *C. beijerinckii* IB4 (a mutant derived from *C. beijerinckii* NCIMB 8052) [14,15].

Regarding switchgrass, no studies on ABE fermentation from its hemicellulosic hydrolysate, based on dilute acid pretreatment, have been found in literature. Using this energy crop, only a few studies have been conducted to obtain butanol from enzymatic hydrolysates (with high glucose concentration), discarding the pretreatment hydrolysate, or mixing the enzymatic hydrolysate with the pretreatment liquid fraction. In this way, Gao et al. [16] and Liu et al. [17] produced butanol from switchgrass enzymatic hydrolysate pretreated by alkaline methods (NaOH) or hydrothermolysis, after discarding the pretreatment hydrolysate. In addition, Qureshi et al. [18] have reported butanol production from dilute sulfuric acid pretreated switchgrass in a process which included enzymatic hydrolysis of the acid pretreated solid biomass without separation of the liquid fraction released in the pretreatment. Butanol production after ABE fermentation was low (0.97 g L^{-1} and butanol yield 0.054 g g^{-1}) and remained low after overliming detoxification, but it was remarkably improved after dilution of the hydrolysate with water and glucose addition (9.55 g L^{-1} butanol, with a butanol yield of 0.255 g g^{-1}).

The present study exposes a new approach based on the utilisation of the liquid fraction from switchgrass acid pretreatment to assess butanol production using wild strains of *C. beijerinckii*. The objectives of this study were: (i) to select a suitable bacterial strain to perform ABE fermentation on this hydrolysate, (ii) to study the effect of inhibitors from switchgrass acid hydrolysate on ABE fermentation, and (iii) to evaluate the necessity and effectiveness of

several detoxification techniques to remove inhibitory compounds and improve butanol production. To the best of our knowledge, this is the first time that switchgrass acid hydrolysate is efficiently fermented to produce butanol without the necessity of a previous detoxification treatment and using a non-genetically modified strain of *C. beijerinckii*.

4.2. Material and methods

4.2.1. Chemicals and reagents

Sugars (glucose, xylose and arabinose), chemical reagents for use in analytical methods (acetic acid, butyric acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, levulinic acid, acetone, butanol, ethanol, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), furfural and Folin-Denis' reagent) were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). Other chemicals were of reagent grade and were obtained from two suppliers: FeSO₄·7H₂O, MgSO₄·7H₂O, NH₄Cl, CaCO₃, CaCl₂, Ca(OH)₂, yeast extract and cysteine from Sigma-Adrich Chemicals, and HCl, H₂SO₄, NaOH, CaO, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂CO₃ from Panreac (Castellar del Vallès, Barcelona, Spain). Compressed gasses (N₂, He, H₂ and air) used in gas chromatography and to generate anaerobic conditions to produce ABE fermentation, were obtained from Contse, S.A. (Madrid, Spain).

4.2.2. Lignocellulosic biomass

Switchgrass (*P. virgatum*), cv. *Alamo*, was used as feedstock for ABE production. Switchgrass was grown in a test plot of ITACyL (Agrarian Technologic Institute of Castile and Leon) located in Valladolid (Spain). The material was harvested at the beginning of November 2013. The feedstock was dried in an oven at 45 °C for 48 h, ground in a SM100 Comfort rotary mill (Retsch GmbH, Haan, Germany) and passed through a 1.0 mm screen [19]. Milled material was stored at room temperature in airtight containers until being used. The compositional analysis of the untreated switchgrass (dry basis) was: 33.0 ± 0.4% glucan, 21.4 ± 0.4% xylan, 2.4 ± 0.4% arabinan, 20.3 ± 1.2% acid insoluble lignin, 4.6 ± 0.2% acid soluble lignin and 7.0 ± 0.4% ash [6]. The glucan, xylan, arabinan, lignin and ash contents of switchgrass were in agreement with values reported by other authors [16,17].

4.2.3. Acid hydrolysis

The dilute sulfuric acid pretreatment of switchgrass was performed in 1-L screw-capped bottles at optimum conditions previously determined [6], in order to release the maximum

amount of sugars and the minimum amount of inhibitors in the hydrolysate. Briefly, dilute sulfuric acid at 1.72% (w/w) was used to treat milled switchgrass at a solid loading of 10.0% (w/w) in an autoclave at 121 °C (103 kPa) during 112 min. After the pretreatment, the suspension was cooled down and the acid hydrolysate was collected by vacuum filtration using a Büchner funnel with cellulose filters (20-25 µm, Model 1238, Filter Lab, Barcelona, Spain). The chemical composition of the liquid hydrolysate is shown in Table 4.1.

Table 4.1. Chemical composition of the switchgrass acid hydrolysate.

Compound	Concentration (g L ⁻¹)	Metal/Anion	Concentration (mg L ⁻¹)
Glucose	3.94 ± 0.11	Potassium	360
Xylose	25.99 ± 0.55	Sodium	47
Arabinose	3.88 ± 0.25	Calcium	195
Acetic acid	3.34 ± 0.18	Magnesium	163
Levulinic acid	0.30 ± 0.03	Copper	n.d.
5-HMF	0.20 ± 0.02	Iron	15
Furfural	0.59 ± 0.07	Manganese	3
Total phenolic compounds	1.03 ± 0.04	Zinc	1
Sulfate	16.87 ± 0.24	Chloride	252
		Nitrate	21
		Phosphate	328

n.d. Not detected.

4.2.4 Bacterial strains and culture conditions

Eight strains of *Clostridium beijerinckii* were screened, namely, CECT 508 (NCIMB 8052) (CECT, Paterna, Spain), DSM 51, DSM 552, DSM 791, DSM 1820, DSM 6422, DSM 6423 and DSM 13821 (DSMZ, Braunschweig, Germany). Strain culture was performed according to Díez-Antolínez et al. [20]. In brief, lyophilised cells were resuspended in Reinforced Clostridial Medium broth (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 10 g L⁻¹ glucose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and incubated at 35 °C during 10 days. Subsequently, they were subjected to sporulation according to CECT protocol. Laboratory stocks of strain spores were stored in sterile H₂O at 4 °C. Then, 125 µL spores were added to 50 mL of the above-mentioned culture medium, placed in glass bottles capped with a rubber septum, and exposed to a thermal shock (2 min at 80 °C in a water bath and 5 min in ice). Afterwards, gaseous N₂ was bubbled into the headspace of the closed bottles during 5 min to obtain anaerobic conditions.

The bottles were incubated for 20 h at 35 °C and were employed as inocula, containing an approximate bacterial density of 6×10^8 cells mL⁻¹, determined using a Bürker counting chamber.

4.2.5. Bacterial strain comparison

In order to find the most suitable bacterial strain for switchgrass acid hydrolysate fermentation, the performances of the eight strains listed in section 4.2.4. were compared for the fermentation of a model medium composed of xylose and glucose as main carbohydrate sources. This medium contained 20 g L⁻¹ glucose, 20 g L⁻¹ xylose and 4 g L⁻¹ arabinose as carbon sources, and 5 g L⁻¹ yeast extract and 2.1 g L⁻¹ NH₄Cl as nitrogen sources. Nutrients such as 0.01 g L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.5 g L⁻¹ cysteine, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄ were added. For pH control 5 g L⁻¹ CaCO₃ were employed. All these nutrients were autoclaved within the synthetic medium, except cysteine and iron and magnesium salts, which were added as a microfiltered concentrated solution after autoclaving. With regard to the fermentation experiments, 1.5 mL of inoculum were added to 48.5 mL of fermentation medium in rubber-capped bottles. The initial pH was adjusted to 6.0 with NaOH. Gaseous N₂ was bubbled into the bottom of the closed bottles during 5 min. Fermentation bottles were incubated at 35 °C and 100 rpm in an Infors HT Minitron orbital shaker (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) during 90-120 h. All experiments were performed in triplicate.

4.2.6. Detoxification of switchgrass acid hydrolysate and ABE fermentation

Due to the presence of toxic compounds in switchgrass dilute acid hydrolysate, different detoxification techniques were assessed with the aim of obtaining a more easily-fermentable broth. Therefore, switchgrass acid hydrolysates were subjected to ABE fermentation after these previous treatments (quantities of the reagents are referred to 1 L of hydrolysate):

1. Control (non-detoxified hydrolysate). Adjustment of pH to 5.5 with NaOH (12.4 g) and filtration (filter Model 1238, Filter Lab, Barcelona, Spain).

2. Adjustment of pH to 10.0 with NaOH (13.5 g); adjustment of pH to 5.5 with 1 mol L⁻¹ HCl; filtration; addition of 1% (w/v) activated charcoal powder (Scharlau Science Group, Barcelona; Spain); heating at 55 °C while shaking at 200 rpm during 60 min; filtration [21].

3. Boiling at 100 °C during 15 min; cooling; adjustment of pH to 5.5 with NaOH (12.5 g); filtration [22].

4. Boiling at 100 °C during 60 min; cooling; filtration; adjustment of pH to 5.5 with CaCO₃ (17.0 g); shaking; filtration. It is a modification of the method proposed by Wang et al. [22].

5. Adjustment of pH to 7.0 with CaO (2.4 g); adjustment of pH to 5.5 with 1 mol L⁻¹ HCl; filtration; addition of 2.5% (w/v) activated charcoal powder; heating at 30 °C while shaking at 200 rpm during 60 min; filtration [23].

6. Overliming: adjustment of pH to 10.0 with Ca(OH)₂ (12.0 g); heating at 90 °C while shaking at 100 rpm during 30 min; filtration; cooling; adjustment of pH to 5.5 with 1 mol L⁻¹ HCl [24].

7. Overliming: adjustment of pH to 10.0 with Ca(OH)₂ (12.0 g); heating at 90 °C while shaking at 100 rpm during 30 min; cooling; adjustment of pH to 6.0 with 1 mol L⁻¹ HCl. This treatment was similar to Method 6, but without precipitates removal to check the possibility of using them to control the pH during fermentation [25].

8. Adjustment of pH to 2.0 with NaOH (9.4 g); addition of 2% (w/v) activated charcoal pellet; heating at 90 °C while shaking at 150 rpm during 30 min; filtration; cooling; addition of NaOH until the pH is 5.5 (3.0 g) [24].

Subsequently, all the samples were supplemented with the nitrogen sources and nutrients listed in Section 4.2.5. However, in these experiments, phosphorus salts were not included, since phosphorus concentrations in the hydrolysate were high (Table 4.1). As a means of pH-controlling during the fermentation, 5 g L⁻¹ CaCO₃ were added to all the samples except those of Method 7. The initial pH of every sample was set at 6.0 with NaOH. All the media were sterilized in an autoclave. Fermentation was performed as described in Section 4.2.5.

4.2.7. Effect of inhibitors

The effect of the inhibitory compounds present in switchgrass acid hydrolysate was assessed by fermenting model media spiked with each single inhibitor or with a mixture of all of them at the concentrations determined in real hydrolysate. The model medium simulating the composition of the acid hydrolysate of switchgrass (model medium AHS) contained 26 g L⁻¹

xylose, 4 g L⁻¹ arabinose, 4 g L⁻¹ glucose, and one inhibitor (or a mixture of all of them) at the following concentrations: 3.3 g L⁻¹ acetic acid, 0.3 g L⁻¹ levulinic acid, 0.2 g L⁻¹ 5-HMF, 0.6 g L⁻¹ furfural, 1.0 g L⁻¹ total phenolic compounds (0.7 g L⁻¹ *p*-coumaric acid, 0.3 g L⁻¹ ferulic acid) and 16.9 g L⁻¹ sulfate. As phenolic compounds, *p*-coumaric and ferulic acids were selected because they are considered as the major phenolic compounds linked to switchgrass lignin [26]. The concentration of *p*-coumaric acid tested was about twice that of ferulic acid and the sum of concentrations of both compounds corresponded with total phenolic compounds concentration determined. The switchgrass dilute acid hydrolysate was analyzed previously to determine *p*-coumaric and ferulic acids concentration and the results showed that *p*-coumaric acid concentration was approximately twice the value of ferulic acid concentration. The model medium AHS without inhibitors was used as a fermentation control.

In addition, all the media were supplemented with the nitrogen sources and nutrients described in Section 4.2.5 and CaCO₃ for pH control. Fermentation was performed according to the procedure described in Section 4.2.5.

4.2.8. Analytical methods

Switchgrass acid hydrolysates and fermentation broth samples were analyzed for monosaccharides (C6 sugars reported as glucose and C5 sugars reported as a total of xylose and arabinose), organic acids (acetic acid and levulinic acid), furfural and 5-HMF contents according to NREL [27]. These compounds were quantified with an Agilent 1200 HPLC equipment (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a 300 x 7.8 mm i.d. cation exchange column Aminex HPX-87H (Biorad, Hercules, CA, USA) and a Refractive Index Detector (RID, G1362A, Agilent Technologies).

The total content of phenolic compounds in the hydrolysates was analyzed by Folin-Denis' assay [28] with a spectrophotometer (Varian Cary 50 UV-Vis) at a wavelength of 765 nm. The concentrations of *p*-coumaric and ferulic acids were determined according to Mussatto et al. [29] using a HPLC with an UV detector (Agilent Technologies), at 276 nm, and a Waters Resolve C18 (300 mm x 3.9 mm, 5 μm) column (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Acetone, butanol, ethanol, acetic acid and butyric acid in fermentation broth samples were analyzed with a gas chromatograph (7890A GC, Agilent Technologies) equipped with a flame ionization detector (FID) and a 30 m polyethylene glycol (PEG) column (1.00 μm film

thickness and 0.53 mm i.d.) (HP-INNOWax, Agilent Technologies). The chromatographic conditions of the analytical method were reported previously by Hijosa-Valsero et al. [30]. ABE and butanol yields (Y_i , g g⁻¹) were calculated as the maximum ABE or butanol production (g L⁻¹) divided by the amount of the total sugars consumed (g L⁻¹). ABE and butanol productivity (P_i , g L⁻¹ h⁻¹) were calculated as the ABE or butanol production (g L⁻¹) divided by the fermentation time (h).

Anions and cations in switchgrass acid hydrolysate were determined in the Chemical and Sensory Laboratory of ITACyL located in Valladolid (Spain). Anions (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ and PO₄³⁻) were determined with a Dionex Model ICS 2000 ion chromatograph equipment (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) equipped with a Dionex DS6 conductivity detector. Dionex Chromeleon software version 6.7 was used for data processing. Separation was performed on a Dionex IonPac AS19 (250 x 4 mm i.d.) anion exchange column used with a Dionex IonPac AG19 guard column (50 x 4 mm i.d.), coupled to a Dionex ASRS Ultra II 4 mm suppressor placed between the analytical column and the conductivity cell. Hydroxide eluent gradients were generated online using the Dionex EG50 KOH cartridge. A 75 µL injection was made with Dionex AS40 autosampler. The analysis was performed at 30 °C with the flow rate set at 1.0 mL min⁻¹. The eluent was generated as potassium hydroxide solution by the eluent generator. The eluent concentration was 10 mmol L⁻¹ from 0 to 20 min after 10 mmol L⁻¹ re-equilibration for 15 min, increased to 45 mmol L⁻¹ for next 5 min and then decreased to 10 mmol L⁻¹ and held 10 mmol L⁻¹ for 5 min. The sample was filtered through 0.45 µm nylon filter previous to analysis. The calibration range for all the anions was 10-500 mg L⁻¹.

The concentrations of Na, K, Ca, Mg, and Zn were determined on a Varian 240FS AA (Agilent Technologies) spectrometer using the flame atomic absorption technique (air-acetylene). Na and K were determined measuring the atomic emission of radiation and Ca, Mg and Zn measuring the atomic absorption of radiation. Fe, Cu and Mn were determined in a graphite furnace with Zeeman background correction (in argon atmosphere) using a Varian 240Z AA spectrometer. The sample was filtered through a 0.45 µm nylon filter previous to analysis. The calibration range for all metals was 1-5 mg L⁻¹.

4.2.9. Statistical analyses

Comparisons among treatments were assessed with a one-way ANOVA and Tukey's HSD test using the software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA); differences were considered significant when $p < 0.05$.

4.3. Results and discussion

4.3.1. Bacterial strain comparison

Fermentation assays with a model medium containing equal amounts of glucose and xylose (20 g L⁻¹ glucose, 20 g L⁻¹ xylose, 4 g L⁻¹ arabinose) were carried out with eight bacterial strains during 90 h. Regarding butanol production and sugar consumption, the most adequate strains were *C. beijerinckii* CECT 508 and *C. beijerinckii* DSM 6422 (Figure 4.1) and there were no significant differences between them ($p < 0.05$). The highest butanol production (9.10 ± 0.22 g L⁻¹) and the highest glucose and arabinose consumption (100 ± 0.0% and 97 ± 0.5%, respectively) were obtained by DSM 6422. However, the greatest xylose and total sugar consumption (75 ± 3% and 82 ± 3%, respectively) were achieved by CECT 508. Fermentation time was extended until 120 h in order to figure out if the strains were able to deplete sugars totally, but sugar consumption and butanol production were not increased.

Although switchgrass acid hydrolysate contained 3.94 g L⁻¹ glucose, 25.99 g L⁻¹ xylose and 3.88 g L⁻¹ arabinose, the sugar composition of the model medium employed to select the most appropriate bacterial strain was noticeably different (20 g L⁻¹ glucose, 20 g L⁻¹ xylose, 4 g L⁻¹ arabinose). This difference had a twofold objective. In the first place, the total sugar concentration had to be high enough to guarantee an easy fermentation and allow the growth of all strains. In the second place, a high glucose/xylose ratio was chosen in order to check whether the strains were able to metabolize xylose even in the presence of important concentrations of glucose. Xylose utilization is inducible and it is inhibited at glucose concentrations above 15 g L⁻¹ [31]. However, once the shift to solvent production has taken place, the acid end metabolites produced during the initial fermentation phase are reassimilated only when sugars are metabolized concurrently [32], which means that an excess of sugars is needed in order to generate solvents. After the fermentation, an accumulation of xylose suggests that xylose utilization has been repressed when the catabolic flux of glucose alone could satisfy the metabolic activity of the cell [33]. Therefore, the presence of low xylose

concentrations, as has been seen in strain CECT 508 (Figure 4.1), indicates that the microorganism is able to utilize this pentose under a less strict glucose-induced inhibition. For these reasons, CECT 508 was selected to assess ABE fermentation of the liquid fraction resulting from the dilute acid pretreatment of switchgrass.

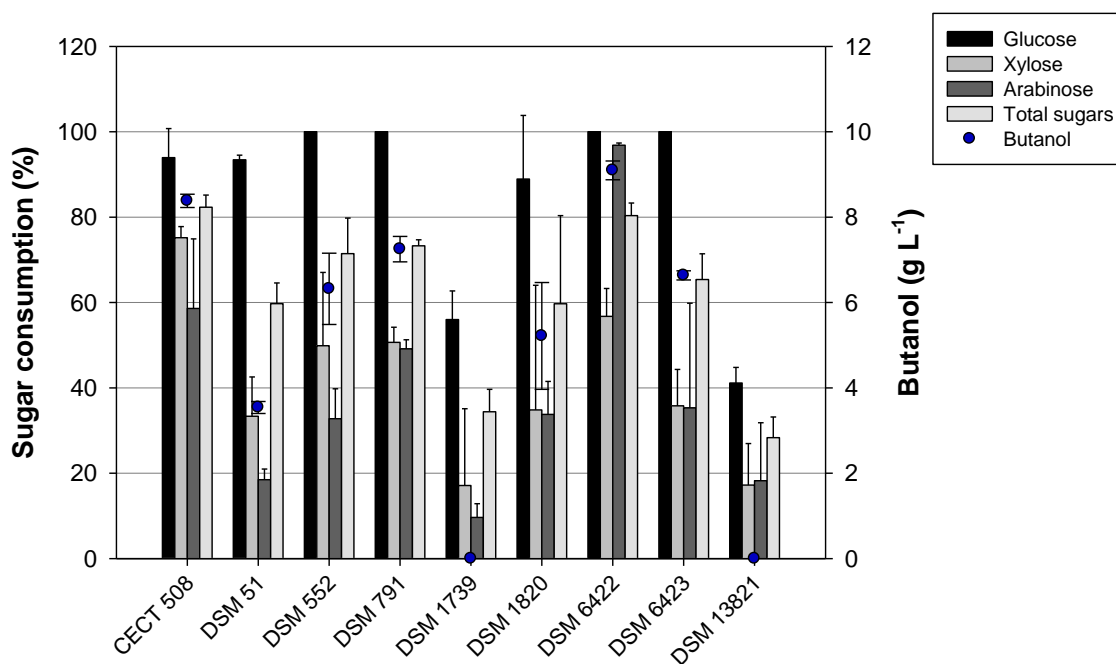


Figure 4.1. Butanol production and sugar consumption during a 90-h fermentation of model medium containing 20 g L⁻¹ glucose, 20 g L⁻¹ xylose and 4 g L⁻¹ arabinose.

4.3.2. Detoxification and fermentation of switchgrass acid hydrolysate

The fermentability of switchgrass acid hydrolysates was assessed with *C. beijerinckii* CECT 508, after employing the detoxification techniques described in section 4.2.6. In this way, switchgrass dilute sulfuric acid hydrolysate, without any detoxification treatment, was used as a control. Sugar and inhibitor concentrations after detoxification are shown in Table 4.2. The highest sugar decrease (about 15%) was produced by methods 6 and 7 (overliming). A similar sugar loss has also been reported on wood pulping hydrolysate after an overliming treatment at 90 °C [24].

Table 4.2. Compositions of switchgrass acid hydrolysate non-detoxified and detoxified with different methods: Method 1 (Non-detoxified), Method 2 (NaOH-HCl-Activated charcoal powder), Method 3 (Evaporation-NaOH), Method 4 (Evaporation-CaCO₃), Method 5 (CaO-HCl-Activated charcoal powder), Method 6 (Overliming-Filtration), Method 7 (Overliming-No filtration), Method 8 (NaOH-Activated charcoal pellets-NaOH). For further details, see section 4.2.6.

Conc. (g L ⁻¹)	Detoxified							
	Non-Detoxified Method 1	Method 2	Method 3	Method 4	Method 5	Method 6	Method 7	Method 8
Glucose	3.94 ± 0.11	3.71 ± 0.23	3.87 ± 0.18	3.65 ± 0.21	3.65 ± 0.24	3.32 ± 0.15	3.38 ± 0.17	3.91 ± 0.18
Xylose	25.99 ± 0.55	24.33 ± 0.68	25.82 ± 0.78	24.98 ± 0.81	24.52 ± 0.88	21.95 ± 0.65	21.43 ± 0.78	24.08 ± 0.62
Arabinose	3.88 ± 0.25	3.58 ± 0.31	3.79 ± 0.28	3.49 ± 0.23	3.52 ± 0.21	3.37 ± 0.28	3.49 ± 0.35	3.85 ± 0.30
Total sugars	33.81 ± 0.86	31.62 ± 1.14	33.48 ± 1.15	32.12 ± 1.07	31.79 ± 1.21	28.64 ± 1.03	28.30 ± 1.33	31.84 ± 1.07
Acetic acid	3.44 ± 0.18	2.83 ± 0.26	3.32 ± 0.20	2.22 ± 0.23	2.75 ± 0.25	2.98 ± 0.21	3.04 ± 0.35	3.28 ± 0.22
Levulinic ac	0.30 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.24 ± 0.05	0.28 ± 0.06	0.25 ± 0.03
5-HMF	0.20 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.15 ± 0.03	< 0.01	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.26 ± 0.03
Furfural	0.59 ± 0.07	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	< 0.01	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.15 ± 0.02
Phenolics	1.03 ± 0.04	0.55 ± 0.11	1.08 ± 0.13	0.90 ± 0.09	0.14 ± 0.02	1.01 ± 0.11	1.12 ± 0.15	0.84 ± 0.09
Sulfates	16.87 ± 0.24	16.66 ± 0.23	16.53 ± 0.39	1.92 ± 0.21	4.00 ± 0.27	0.77 ± 0.11	0.37 ± 0.05	15.75 ± 0.42

Regarding the decrease of acetic acid, the most effective technique was method 4, which achieved a decrease around 35%, maybe due to the buffering effect of CaCO_3 . In the case of levulinic acid, furfural, 5-HMF and phenolic compounds, the most effective methods were 2 and 5, due to the effect of activated charcoal. These results are in agreement with Lu et al. [24] who reported the effectiveness of wood pulping hydrolysate detoxification with activated charcoal to remove levulinic acid, phenolic compounds, furfural and 5-HMF but not to remove acetic acid. Finally, the most effective method to reduce sulfate concentration was method 7 (overliming without precipitates removal), which achieved a decrease of 98%. Even so, the effectiveness of different detoxification methods to increase the fermentability of lignocellulosic hydrolysates has been reported for wood pulping [24], corn stover [18] or switchgrass [17,18]. However, the effect of each detoxification technique depends on the nature of lignocellulosic biomass, the type of pretreatment and the microbial species employed to ferment.

Fermentation results of non-detoxified and detoxified switchgrass hydrolysates are summarized in Figure 4.2 and Table 4.3. All the results were calculated at 120 h.

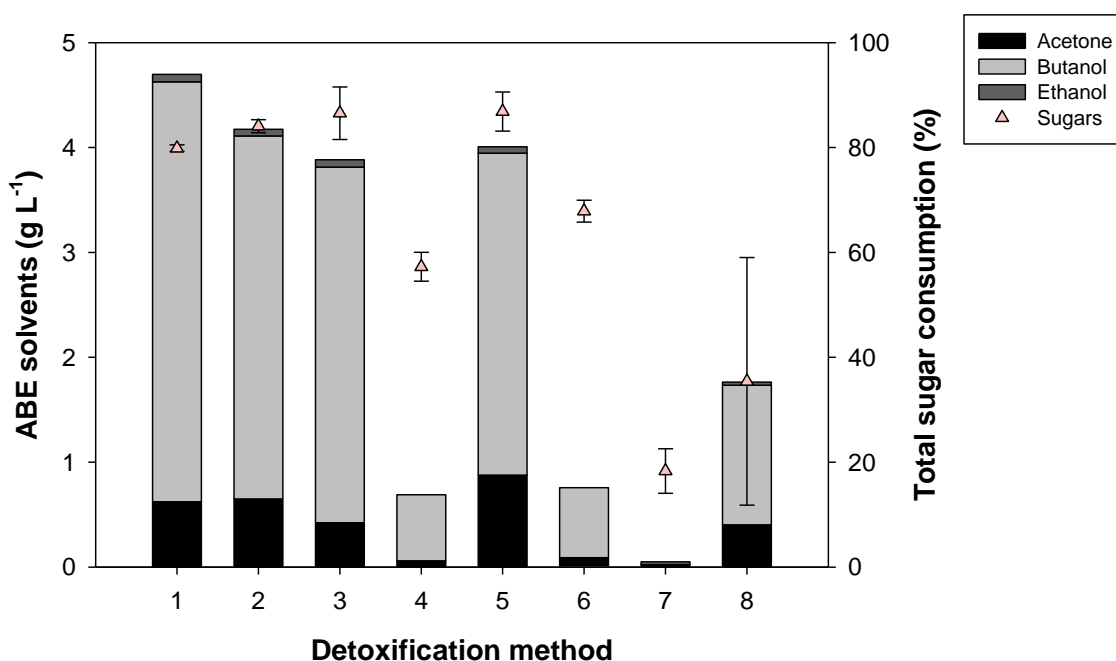


Figure 4.2. ABE production and total sugar consumption during a 120-h fermentation of switchgrass acid hydrolysates, with or without detoxification treatments. Method 1 (Non-detoxified), Method 2 (NaOH-HCl-Activated charcoal powder), Method 3 (Evaporation-NaOH), Method 4 (Evaporation- CaCO_3), Method 5 (CaO-HCl-Activated charcoal powder), Method 6 (Overliming-Filtration), Method 7 (Overliming-No filtration), Method 8 (NaOH-Activated charcoal pellets-NaOH). For further details, see section 4.2.6.

Table 4.3. Residual sugars, ABE fermentation products (solvents and acids), yields of butanol and ABE and productivity of butanol and ABE after 120 h of fermentation of switchgrass acid hydrolysate non-detoxified or detoxified with different detoxification methods. Method 1 (Non-detoxified), Method 2 (NaOH-HCl-Activated charcoal powder), Method 3 (Evaporation-NaOH), Method 4 (Evaporation-CaCO₃), Method 5 (CaO-HCl-Activated charcoal powder), Method 6 (Overliming-Filtration), Method 7 (Overliming-No filtration), Method 8 (NaOH-Activated charcoal pellet-NaOH). For further details, see section 4.2.6.

Method	Residual Sugars (g L ⁻¹)			Fermentation ABE Products (g L ⁻¹)				Yields (g g ⁻¹)		Productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	
	Glucose	Xylose	Arabinose	Total Sugars	ABE	Acetic Acid	Butyric Acid	Y _{butanol}	Y _{ABE}	P _{butanol}	P _{ABE}
1	0.03±0.06	4.98±0.20	0.47±0.19	5.49±0.17	4.70±0.9	2.05±0.03	4.69±0.64	0.184±0.03	0.216±0.04	0.033±0.00	0.039±0.00
2	1.32±0.34	2.38±0.06	0.54±0.15	4.24±0.33	4.17±0.2	2.30±0.13	4.04±0.24	0.155±0.01	0.187±0.01	0.029±0.00	0.035±0.00
3	0.76±0.44	2.14±0.71	0.66±0.20	3.56±1.33	3.88±0.1	2.21±0.09	4.06±0.19	0.148±0.00	0.167±0.00	0.028±0.00	0.032±0.00
4	0.66±0.69	8.32±0.36	1.98±0.28	10.96±0.71	0.69±0.1	3.36±0.13	5.31±0.04	0.043±0.00	0.047±0.00	0.005±0.00	0.006±0.00
5	1.15±0.79	0.55±0.06	1.43±0.13	3.12±0.88	4.01±0.1	2.14±0.06	3.32±0.04	0.145±0.00	0.195±0.00	0.026±0.00	0.033±0.00
6	0.19±0.25	6.13±0.33	1.75±0.12	8.08±0.52	0.76±0.1	2.83±0.41	2.59±0.35	0.039±0.00	0.045±0.00	0.006±0.00	0.006±0.00
7	3.15±0.31	17.09±0.7	2.17±0.13	22.41±1.17	0.05±0.0	4.05±0.35	2.51±0.40	< 0.01	0.008±0.01	< 0.001	< 0.001
8	0.58±0.90	18.39±6.1	1.45±0.72	20.41±7.49	1.76±3.0	3.87±1.00	1.50±0.59	0.069±0.11	0.092±0.15	0.011±0.01	0.015±0.02

The highest butanol concentrations were obtained with method 1 (non-detoxified hydrolysate), method 2 (activated charcoal), method 3 (evaporation) and method 5 (activated charcoal). Butanol yields ($Y_{\text{butanol/sugars}}$) for each of these methods were: $0.184 \pm 0.032 \text{ g g}^{-1}$, $0.155 \pm 0.010 \text{ g g}^{-1}$, $0.148 \pm 0.007 \text{ g g}^{-1}$ and $0.145 \pm 0.004 \text{ g g}^{-1}$, respectively. The highest butanol production was $4.00 \pm 0.71 \text{ g L}^{-1}$, which corresponded with the non-detoxified hydrolysate. Its butanol yield ($0.184 \pm 0.032 \text{ g g}^{-1}$) was similar to that observed by Lu et al. [24] with a concentrate wood pulp sulfuric acid hemicellulosic hydrolysate without any detoxification step (0.19 g g^{-1}). To the best of our knowledge, studies on switchgrass ABE fermentation found in literature are focused on enzymatic hydrolysates, discarding the hemicellulosic hydrolysate or mixing both hydrolysates. For this reason, butanol concentrations reached in the present work cannot be strictly compared with any previous results. Thus, Lui et al. [17] fermented the non-detoxified enzymatic hydrolysate of the pretreated solid resulting from switchgrass hydrothermolysis using *C. acetobutylicum* ATCC 824 and obtained a butanol production of 5.46 g L^{-1} (yield 0.124 g g^{-1}) under similar conditions to those carried out in this work (initial pH adjusted to 6.0 and CaCO_3 added to control pH fermentation). Butanol production was slightly higher and the yield was lower than those obtained in the present work, but it is important to mention that they fermented a hydrolysate with a higher total initial sugar concentration (80 g L^{-1} , mainly glucose). They improved butanol production results up to 10.28 g L^{-1} (yield 0.209 g g^{-1}) after detoxification with activated charcoal. In another switchgrass work [16], the solid fraction from a NaOH-pretreatment was subjected to a subsequent enzymatic hydrolysis, and this hydrolysate was successfully fermented by *C. saccharobutylicum* DSM 13864 without any detoxification step, obtaining 13.0 g L^{-1} butanol (yield 0.229 g g^{-1}). As it was explained for the study described above, the higher butanol production when compared with our work is probably due to the higher concentration of fermentable sugars in the hydrolysate (56.89 g L^{-1} , mainly glucose).

The lowest butanol concentrations were registered for detoxification methods 4, 6, 7 and 8. Butanol yields were lower than 0.07 g g^{-1} and the worst results were reached after overliming (methods 6 and 7). Besides, overliming was the treatment that most decreased the concentration of total sugars. Qureshi et al. [18] used *C. beijerinckii* P260 to ferment a switchgrass acid hydrolysate subjected to enzymatic hydrolysis containing 60 g L^{-1} total sugars, but butanol production barely reached 1.0 g L^{-1} , due to the presence of toxic compounds in the hydrolysate of which only acetic acid (7 g L^{-1}), furfural (0.04 g L^{-1}) and 5-HMF (0.48 g L^{-1}) were determined. In addition, the fermentation of switchgrass hydrolysate after overliming

detoxification was also poor, so they concluded that inhibitory compounds were still present in the hydrolysate, which concurs with the results obtained in this work.

Regarding total sugar consumption (which includes glucose, xylose and arabinose), methods 1, 2, 3 and 5 reached values above 83%; methods 4 and 6 provided values ranging between 66% and 72%; while methods 7 and 8 showed sugar consumption levels below 36% (Figure 4.2).

There were no significant differences ($p < 0.05$) between non-detoxified hydrolysate and the samples detoxified with methods 2, 3 and 5, neither for butanol production nor for sugar consumption. Therefore, it is proposed to perform the fermentation of switchgrass hydrolysate without any detoxification method because it allows a viable ABE fermentation, obtaining high butanol yields with a simpler global process.

4.3.3. Effect of inhibitors on ABE fermentation

To have a better understanding about the individual and combined effects of the inhibitory compounds released during switchgrass dilute acid pretreatment on ABE fermentation by *C. beijerinckii* CECT 508, fermentation runs of model solutions, with similar composition to that of switchgrass acid hydrolysate (model medium AHS), were carried out. In this way, acetic acid, levulinic acid, 5-HMF, furfural, phenolic compounds and sulfates were added at the concentration found in switchgrass acid hydrolysate, separately or as a mixture of all together, to the model medium AHS. As control sample, a model medium AHS without inhibitors was used. The results of these fermentation experiments were calculated for 96 h and are shown in Table 4.4.

The control sample produced 5.72 ± 0.65 g L⁻¹ butanol and 6.26 ± 0.72 g L⁻¹ ABE. Sugar consumption was $100 \pm 0\%$ glucose, $78 \pm 4\%$ xylose, $41 \pm 6\%$ arabinose and $76 \pm 4\%$ total sugars. The order of sugar preference by *C. beijerinckii* CECT 508 was glucose > xylose > arabinose, as reported by Ezeji et al. [9]. Butanol yield ($Y_{\text{butanol/sugars}}$) for the control was 0.236 ± 0.012 g g⁻¹ and butanol productivity was 0.060 ± 0.007 g L⁻¹ h⁻¹.

Table 4.4. Residual sugars, ABE fermentation products (solvents and acids), yields of butanol and ABE and productivity of butanol and ABE after 96 h of fermentation of model medium AHS with or without inhibitors: A (without inhibitors addition), B (3.30 g L⁻¹ acetic acid), C (0.30 g L⁻¹ levulinic acid), D (0.20 g L⁻¹ 5-HMF), E (0.60 g L⁻¹ furfural), F (1.00 g L⁻¹ phenolic compounds), G (16.87 g L⁻¹ sulfate), H (16.87 g L⁻¹ sulfate), H (all inhibitors).

Model AHS	Residual Sugars (g L ⁻¹)					Fermentation ABE Products (g L ⁻¹)					Yields (g g ⁻¹)			Productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	
	Glucose	Xylose	Arabinose	Total Sugars	Acetone	Butanol	Ethanol	Acetic Ac.	Butyric Ac	ABE	Y _{butanol}	Y _{abe}	Y _{butanol}	P _{butanol}	P _{abe}
A	< 0.05	6.65±1.27	2.98±0.30	9.63±1.57	0.46±0.07	5.72±0.65	0.09±0.00	0.78±0.03	2.55±0.08	6.26±0.72	0.236±0.012	0.25 ±0.014	0.060±0.007	0.065±0.008	
B	< 0.05	11.97±0.69	4.66±1.69	16.63±1.33	0.28±0.06	0.69±0.13	0.07±0.01	4.27±0.16	3.34±0.16	1.04±0.19	0.047±0.011	0.070±0.017	0.007±0.001	0.011±0.002	
C	< 0.05	6.16±0.27	2.90±0.07	9.06±0.34	0.44±0.04	5.62±0.31	0.09±0.02	0.83±0.06	3.09±0.57	6.16±0.37	0.230±0.012	0.252±0.014	0.059±0.003	0.064±0.004	
D	< 0.05	6.10±1.05	2.83±0.36	8.92±1.40	0.36±0.05	5.34±0.52	0.07±0.01	0.78±0.05	2.90±0.08	5.77±0.57	0.230±0.009	0.248±0.010	0.056±0.005	0.060±0.006	
E	< 0.05	8.92±0.48	3.45±0.13	12.38±0.61	0.28±0.02	4.12±0.17	0.08±0.01	0.75±0.09	2.95±0.11	4.47±0.18	0.213±0.008	0.232±0.009	0.043±0.002	0.047±0.002	
F	0.10±0.18	12.56±1.19	3.95±0.09	16.62±1.36	0.11±0.10	1.98±0.84	0.07±0.01	1.30±0.09	3.15±0.20	2.16±0.94	0.161±0.053	0.175±0.061	0.021±0.009	0.023±0.010	
G	< 0.05	10.42±0.22	3.41±0.64	13.82±0.60	0.16±0.14	2.09±1.03	0.66±0.99	0.99±0.02	3.78±0.60	2.91±0.24	0.146±0.075	0.201±0.021	0.022±0.011	0.030±0.002	
H	0.65±0.56	18.40±4.60	4.00±0.55	23.05±5.70	< 0.01	0.02±0.03	0.02±0.04	3.45±0.25	2.23±1.82	0.04±0.07	0.001±0.002	0.003±0.005	< 0.001	< 0.001	

Fermentation parameters were affected by the addition of inhibitory compounds to the model medium AHS (Table 4.4). ABE generation was significantly reduced ($p < 0.05$) in the presence of the mixture of all inhibitors and of acetic acid followed by phenolic compounds, sulfates and furfural at the studied concentrations. These results agreed with other previous studies that found an inhibitory effect for ABE fermentation by *C. beijerinckii* when phenolic compounds concentration was higher than 1 g L^{-1} [34], or when salts such as sulfates were present at concentrations higher than 13.6 g L^{-1} [9]. However, the results obtained for acetic acid did not agree with those obtained by Cho et al. [35] that concluded that ABE production in *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (CECT 508) was not affected by acetic acid when it was added to a model medium in the range of $3.7 - 11.7 \text{ g L}^{-1}$. On the other hand, levulinic acid and 5-HMF seemed to have little or no effect on ABE fermentation at the studied concentrations. In fact, Ezeji et al. [9] observed that the effect of furfural and 5-HMF separately (3 g L^{-1}) on a genetically modified strain of *C. beijerinckii* was not detrimental but stimulatory, whereas the mixture of the two affected the culture negatively.

Regarding acids production at the end of fermentation, butyric acid concentration increased significantly when acetic acid, 5-HMF, furfural, phenolic compounds and sulfates were added to the model medium AHS, and acetic acid concentration produced by fermentation increased significantly in the presence of phenolic compounds, sulfates and, obviously, when acetic acid itself was added as an inhibitor. High amounts of acetic and butyric acids in the final broth could indicate that the solventogenic phase has not been initiated, since these metabolites are generated in the acidogenic phase and they are later reabsorbed by the cells in the solventogenic phase. Sometimes an ABE production stoppage is observed due to a phenomenon known as “acid crash” which often occurs in batch fermentations where the pH is not controlled [36]. It is accepted that the “acid crash” takes place when acid concentration in the fermentation broth is higher than a tolerable upper limit. At this time, the consumption of glucose stops and rapid termination of solventogenesis occurs [37]. However, it is not possible to clearly determine whether an acid crash or another toxic mechanism is responsible for the situation observed.

The consumption of sugars (especially xylose and arabinose) dropped significantly ($p < 0.05$) in the presence of acetic acid, furfural, phenolic compounds, sulfate and the mixture of all inhibitors (Figure 4.3). There was a positive correlation ($r^2 = 0.9154$, $p < 0.05$) between sugar consumption and the number of bacteria present in the final broth (Figure 4.3). Cell density

was also positively correlated with butanol production ($r^2 = 0.8676$, $p < 0.05$). Final pH values were about 5.45 in all those systems which obtained more than 4 g L⁻¹ butanol (Figure 4.3).

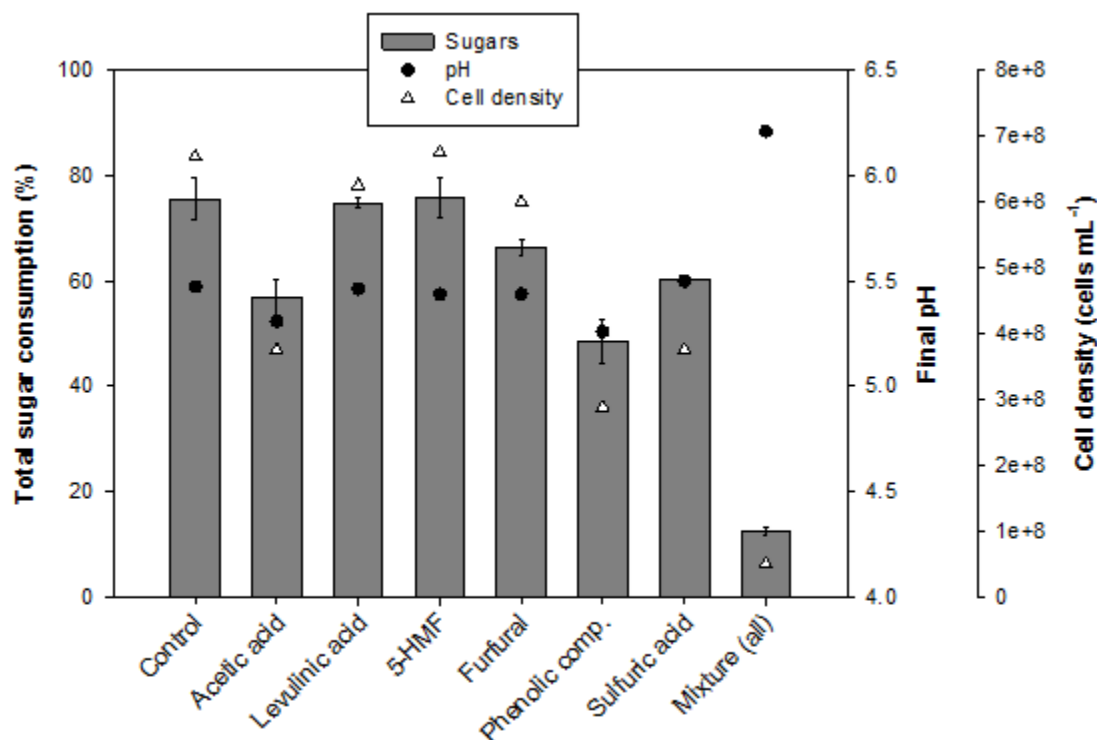


Figure 4.3. Effect of inhibitors on sugar consumption, final pH and bacterial density after 96 h of fermentation in the model medium AHS (initial sugars: 26 g L⁻¹ xylose, 4 g L⁻¹ arabinose, 4 g L⁻¹ glucose). The concentrations of each inhibitor were 3.3 g L⁻¹ acetic acid, 0.3 g L⁻¹ levulinic acid, 0.2 g L⁻¹ 5-HMF, 0.6 g L⁻¹ furfural, 1.0 g L⁻¹ total phenolic compounds (0.7 g L⁻¹ *p*-coumaric acid, 0.3 g L⁻¹ ferulic acid) and 16.9 g L⁻¹ sulfate. The mixture of inhibitors contained all the previous compounds at the specified concentrations.

It must be noted that, in the model medium AHS, the mixture of all inhibitors totally hindered fermentation by *C. beijerinckii* CECT 508 (leading to the production of no butanol and the consumption of only 13 ± 1% total sugars, probably caused by the inhibition of bacterial cell growth), while the fermentation of the model medium AHS (control sample, without inhibitors) produced good results (5.72 ± 0.65 g L⁻¹ butanol and 0.236 ± 0.012 g g⁻¹ butanol yield) with 76 ± 4% total sugars consumption. This demonstrates that the studied inhibitory compounds do affect ABE fermentation at the selected concentrations.

In the case of switchgrass acid hydrolysate, butanol production was 4.00 ± 0.71 g L⁻¹ (0.184 ± 0.032 g g⁻¹ butanol yield) with a total sugar consumption of 80 ± 1%, whereas the model medium AHS spiked with a mixture of all inhibitors at similar concentrations to those

found in the real hydrolysate did not produce butanol. This difference could be due to the greater complexity of the real hydrolysate, which contains many other compounds inducing a positive synergistic effect resulting in a viable ABE fermentation. In addition, when comparing ABE fermentation results between the control AHS without inhibitors (5.72 g L⁻¹ butanol) and the switchgrass acid hydrolysate (4.00 g L⁻¹ butanol), decreases of only 30% butanol concentration, 25% ABE concentration, 22% butanol yield and 17% ABE yield are observed. Therefore, switchgrass acid hydrolysate can be used to perform ABE fermentations obtaining results which are near optimal values.

4.3.4. Challenges for ABE fermentation based on lignocellulosic feedstocks

Industrial butanol production until the 1960s was based on the transformation of expensive carbohydrate-rich substrates, such as grain, molasses or potatoes by ABE fermentation [31], but this process was substituted by the petrochemical route where butanol was synthesized from propylene, which was much more economical [38]. Nevertheless, the use of low-cost feedstocks might make ABE fermentation attractive again [39,40], provided that adequate pretreatment techniques are developed and available for the transformation of lignocellulosic biomass into fermentable sugars. Although numerous studies have been devoted to biobutanol production from lignocellulosic biomass [4,41,42,43,44], its industrial scale-up has not been performed yet. Apart from the difficulties in lignocellulosic biomass pretreatment, other relevant obstacles hinder the implementation of lignocellulosic-based ABE biorefineries, like low final butanol titres caused by butanol toxicity on bacteria and high costs for butanol recovery by conventional energy-intensive methods like distillation [45]. The application of alternative *in situ* butanol recovery techniques, like vacuum stripping, gas stripping, pervaporation, perstraction or adsorption, could improve the process efficiency [46].

Previous works have demonstrated that ABE fermentation of non-detoxified lignocellulosic hydrolysates is feasible [15,30,47]. However, further research is needed to elucidate genetic, metabolic or physicochemical mechanisms involved in microbial tolerance to inhibitors in certain lignocellulosic hydrolysates. The results obtained in the present work with switchgrass imply the possibility of directly fermenting pentose-rich liquid streams from pretreated biomass without any further step (not even enzymatic hydrolysis), thus having the opportunity to valorise this stream, yet being able to proceed with other transformation processes on the solid cellulosic fraction separated from the liquid pentose stream after

pretreatment. This entails that lignocellulosic biomass can be used in a variety of ways inside biorefineries, and that a narrow-focus approach should be avoided.

4.4. Conclusions

These studies have demonstrated the feasibility of producing butanol from hemicellulosic acid hydrolysate of switchgrass (with high level of pentoses and inhibitory compounds), without a previous detoxification treatment, using the non-genetically modified strain *C. beijerinckii* CECT 508 to produce 4.00 ± 0.71 g L⁻¹ butanol (yield 0.184 ± 0.032 g g⁻¹). Detoxification treatments, based on evaporation, overliming and activated charcoal adsorption, did not improve switchgrass ABE fermentation. Therefore, pentose-rich streams from lignocellulosic acid pretreatments might suppose a valuable resource for industrial fermentations that should not be underestimated. In addition, the absence of enzymatic hydrolysis and detoxification steps makes the process simpler and more economic. The selection of an adequate bacterial strain is essential to maximize butanol production in complex lignocellulosic hydrolysates.

4.5. Acknowledgements

Authors are grateful to ITACyL and European Regional Development Funds (ERDF) (POCTEP Project Nº 0450_AGRI_SOS_E_6) for financial support. M. Hijosa-Valsero is supported by a postdoctoral contract (DOC-INIA, grant number DOC 2013-010) funded by the Spanish National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) and the European Social Fund. Authors thank R. Antón, N. del Castillo and G. Sarmiento for their technical assistance, and J. Garita-Cambronero for revising the text.

4.6. References

- [1] S. Malmierca, R. Díez-Antolínez, A.I. Paniagua, M. Martín, Technoeconomic study of biobutanol (AB) production. Part 2: Process design, *Ind. Eng. Chem. Res.* 56(6) (2017) 1525-1533.
- [2] S. Malmierca, R. Díez-Antolínez, A.I. Paniagua, M. Martín, Technoeconomic study of AB biobutanol production. Part 1: Biomass pretreatment and hydrolysis, *Ind. Eng. Chem. Res.* 56(6) (2017) 1518-1524.
- [3] S.B. McLaughlin, L. Adams Kszos, Development of switchgrass (*Panicum virgatum*) as a bioenergy feedstock in the United States, *Biomass Bioener.* 28 (2005) 515-535.
- [4] T.C. Ezeji, N. Qureshi, H.P. Blaschek, Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 220-227.
- [5] A. Hendriks, G. Zeeman, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 10-18.
- [6] A.I. Paniagua-García, R. Díez-Antolínez, M. Hijosa-Valseiro, M.E. Sánchez, M. Coca, Response surface optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for fermentable sugars production, *Chem. Eng. Trans.* 49 (2016) 223-228.
- [7] Y. Sun, J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.* 83 (2002) 1-11.
- [8] B.C. Saha, Hemicellulose bioconversion, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30 (5) (2003) 279-291.
- [9] T.C. Ezeji, N. Qureshi, H.P. Blaschek, Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* 97 (2007) 1460-1469.
- [10] S.I. Mussatto, I.C. Roberto, Alternatives for detoxification of diluted acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes. A review, *Bioresour. Technol.* 93 (2004) 1-10.
- [11] R. Purwadi, C. Niklasson, M.J. Taherzadeh, Kinetic study of detoxification of dilute acid hydrolysates by Ca(OH)₂, *J. Biotechnol.* 114 (2004) 187-198.
- [12] S. Larsson, A. Reimann, N. Nilvebrant, L.J. Jönsson, Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77 (1999) 91-103.

- [13] N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 673-686.
- [14] T.F. Du, A.Y. He, H. Wu, J.N. Chen, X.P. Kong, J.L. Liu, M. Jiang, P.K. Ouyang, Butanol production from acid hydrolyzed corn fiber with *Clostridium beijerinckii* mutant, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 254-261.
- [15] T. Guo, A.Y. He, T.F. Du, D.W. Zhu, D.F. Liang, M. Jiang, P. Wei, P.K. Ouyang, Butanol production from hemicellulosic hydrolysate of corn fiber by a *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor-tolerance, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 379-385.
- [16] K. Gao, S. Boiano, A. Marzocchella, L. Rehmman, Cellulosic butanol production from alkali-pretreated switchgrass (*Panicum virgatum*) and phragmites (*Phragmites australis*), *Bioresour. Technol.* 174 (2014) 176–181.
- [17] K. Liu, H.K. Atiyeh, O. Pardo-Planas, T.C. Ezeji, V. Ujor, J.C. Overton, K. Berning, M.R. Wilkins, R.S. Tanner, Butanol production from hydrothermolysis-pretreated switchgrass: Quantification of inhibitors and detoxification of hydrolysate, *Bioresour. Technol.* 189 (2015) 292-301.
- [18] N. Qureshi, B.C. Saha, R.E. Hector, B. Dien, S. Hughes, S. Liu, L. Iten, M.J. Bowman, G. Sarath, M.A. Cotta, Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II – Use of corn stover and switchgrass hydrolysates, *Biomass Bioener.* 34 (2010) 566-571.
- [19] A. Ruangmee, C. Sangwichien, Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of narrow-leaf cattail for bioethanol production, *Energy Convers. Manag.* 73 (2013) 381-388.
- [20] R. Díez-Antolínez, M. Hijosa-Valsero, A.I. Paniagua-García, X. Gómez, Effect of nutrient supplementation on biobutanol production from cheese whey by ABE (acetone–butanol–ethanol) fermentation, *Chem. Eng. Trans.* 49 (2016) 217-222. doi: 10.3303/CET1649037.
- [21] S. Misra, S. Raghuvanshi, R.K. Saxena, Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*, *Carbohydr. Polymers.* 92 (2013) 1596-1601.
- [22] L. Wang, M. Yang, X. Fan, X. Zhu, T. Xu, Q. Yuan, An environmentally friendly and efficient method for xylitol bioconversion with high temperature steaming corncob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*, *Process Biochem.* 46 (2011) 1619-1626.

- [23] R. de Freitas Branco, J.C. dos Santos, S.S. da Silva, A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production, *Biomass Bioener.* 35 (2011) 3241-3246.
- [24] C. Lu, J. Dong, S.T. Yang, Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation gas stripping process, *Bioresour. Technol.* 143 (2013) 467-475.
- [25] A. Martínez, M.E. Rodríguez, M.L. Wells, S.W. York, J.F. Preston, L.O. Ingram, Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocelluloses with lime, *Biotechnol. Prog.* 17 (2001) 287-293.
- [26] J. Yan, Z. Hu, Y. Pu, E.C. Brummer, A.J. Ragauskas, Chemical composition of four switchgrass populations, *Biomass Bioener.* 34 (2010) 48-53.
- [27] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, Determination of sugars, byproducts and degradation products in liquid fraction process samples, Technical Report No. TP-510-42623 National Renewable Energy Laboratory, USA, 2008 <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>
- [28] O. Folin, W. Denis, On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as colour reagent, *J. Biol. Chem.* 12 (1912) 239-243.
- [29] S.I. Mussatto, G. Dragone, I.C. Roberto, Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain, *Ind. Crops Prod.* 25 (2007) 231-237.
- [30] M. Hijosa-Valsero, A.I. Paniagua-García, R. Díez-Antolínez, R., Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 8041-8052.
- [31] D. T. Jones, D.R. Woods, Acetone-butanol fermentation revisited, *Microbiol. Rev.* 50 (4) (1986) 484-524.
- [32] R. Davies, Studies on the acetone-butyl alcohol fermentation. 2. Intermediates in the fermentation of glucose by *Cl. acetobutylicum*. 3. Potassium as an essential factor in the fermentation of maize meal by *Cl. acetobutylicum* (BY), *Biochem. J.* 36 (1942) 582-599.
- [33] O. Fond, G. Matta-El-Amouri, J.M. Engasser, H. Petitdemange, The acetone butanol fermentation on glucose and xylose. 2. Regulation and kinetics in fed batch cultures, *Biotechnol. Bioeng.* 28 (1986) 167-175.

- [34] D.H. Cho, Y.L. Lee, Y. Um, B.I. Sang, Y.H. Kim. Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83 (2009) 1035-1043.
- [35] D.H. Cho, S.J. Shin, Y.H. Kim, Effects of acetic and formic acid on ABE production by *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol, Bioprocess Eng.* 17 (2012) 270-275.
- [36] T.C. Ezeji, N. Qureshi, H.P. Blaschek, Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 (2004) 653-658.
- [37] I.S. Maddox, E. Steiner, S. Hirsch, S. Wessner, N.A. Gutierrez, J.R. Gapes, K.C. Schuster, The cause of "acid crash" and "acidogenesis fermentation" during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 (2000) 95-100.
- [38] J.S. Chen, M.J. Zidwick, P. Rogers, in: E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson (Eds.), *Organic Acid and Solvent Production: Butanol, Acetone and Isopropanol; 1,3- and 1,2-Propanediol Production; and 2,3-Butanediol Production*, *The Prokaryotes-Applied Bacteriology and Biotechnology*, Springer-Verlag, Heidelberg, 2013, p 77-134.
- [39] Y.S. Jang, A. Malaviya, C. Cho, J. Lee, S.Y. Lee, Butanol production from renewable biomass by Clostridia, *Bioresour. Technol.* 123 (2012) 653-663.
- [40] G. Jurgens, S. Survase, O. Berezina, E. Sklavounos, J. Linnekoski, A. Kurkijärvi, M. Väkevä, A. van Heiningen, T. Granström, Butanol production from lignocellulosics. *Biotechnol. Lett.* 34 (2012) 1415-1434. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0926-3>.
- [41] N.R. Baral, L. Slutzky, A. Shah, T.C. Ezeji, K. Cornish, A. Christy, Acetone-butanol-ethanol fermentation of corn stover: current production methods, economic viability and commercial use, *FEMS Microbiol. Lett.* 363 (2016) fnw033.
- [42] G. Salehi Jouzani, M.J. Taherzadeh, Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review, *Biofuel Res. J.* 5 (2015) 152-195.
- [43] J. Wang, X. Yang, C.C. Chen, S.T. Yang, Engineering clostridia for butanol production from biorenewable resources: from cells to process integration, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 6 (2014) 43-54.

- [44] Y. Gu, Y. Jiang, S. Yang, W. Jiang, Utilization of economical substrate-derived carbohydrates by solventogenic clostridia: pathway dissection, regulation and engineering, *Curr. Opin. Biotechnol.* 29 (2014) 124-131.
- [45] F. Xin, J. Liu, M. He, B. Wu, Y. Ni, W. Dong, W. Zhang, G. Hu, M. Jiang, High butanol production integrated with *in situ* extraction in the presence of Tween 80 by *Clostridium acetobutylicum*, *Process Biochem.* 67 (2018) 113-117.
- [46] V. Outram, C.A. Lalander, J.G.M. Lee, E.T. Davis, A.P. Harvey, A comparison of the energy use of *in situ* product recovery techniques for the Acetone Butanol Ethanol fermentation, *Bioresour. Technol.* 220 (2016) 590-600.
- [47] N. Qureshi, B.C. Saha, M.A. Cotta, Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 30 (2007) 419-427. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0137-9>.

Capítulo/Chapter 5

5. Development and validation of a HPLC-DAD method for simultaneous determination of main potential ABE fermentation inhibitors identified in agro-food wastes hydrolysates

Abstract

Lignocellulosic agro-food wastes are regarded as interesting carbohydrate sources for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. However, the physicochemical and enzymatic pretreatments applied to release their sugars generate inhibitory compounds that hinder the fermentation. The release of inhibitory compounds in the hydrolysates of four agro-food industrial wastes [apple pomace (AP), potato peel (PP), brewers' spent grain (BSG) and coffee silverskin (CS)] obtained after various chemical pretreatments (acid, alkali, organic solvents and surfactant pretreatments) was analyzed. Sixty-seven potential inhibitors were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and were classified into non-aromatic compounds (aliphatic acids, nitrogen-containing compounds, furans and fatty acids) and aromatic compounds (phenolics and non-phenolics). Then, a high performance liquid chromatography method with diode array detection (HPLC-DAD) was developed and validated for the quantification of the main potential inhibitors identified in the hydrolysates (i.e. gallic, 3,4-dihydroxybenzoic, 2,5-dihydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic, 3-hydroxybenzoic, vanillic, caffeic, syringic, p-coumaric, and ferulic acids, vanillin, syringaldehyde and caffeine). The proposed HPLC-DAD method was simple, fast and robust and allowed the direct injection of samples without previous treatment, enabling the simultaneous quantification of the abovementioned compounds for the first time. The method was successfully applied to the analysis of AP, PP, BSG and CS hydrolysates.

Keywords: Agro-food industrial waste, Hydrolysate, Inhibitor, Phenolic compound, GC-MS, HPLC-DAD.

A.I. Paniagua-García, M. Hijosa-Valsero, J. Garita-Cambronero, M. Coca, R. Díez-Antolínez

Microchemical Journal 150 (2019). DOI: 10.1016/j.microc.2019.104147

5.1. Introduction

Agro-food industrial processes generate huge amounts of waste, a fact that is attracting increasing attention because of the negative impacts produced on the environment, economy and society. Industrial ecology and circular economy are promoting the use of food waste as raw material to obtain new products with the aim of achieving “zero waste economy”. Wastes from vegetables and fruits processing have high carbohydrate content and they are potential biomass feedstocks for biorefineries [1]. Apples are the third most produced fruit throughout the world with about 89 million tons in 2016 and only bananas and watermelons exceed this amount of production [2]. Apple pomace (AP) is the residue obtained after milling and pressing and it represents 25-30% of the total processed apple [3]. Potatoes are one of the most consumed vegetables worldwide and their global production in 2016 amounted to almost 377 tonnes [2]. Potato peel (PP) is the main by-product generated in potato processing industries, whose products (chips, French fries, starch and puree) have increased their demand [4]. Potato peeling causes losses of product between 15-40% depending on the procedure followed [4]. Beer is one of the most consumed alcoholic beverages around the world. Brewers’ spent grain (BSG) is the barley malt by-product obtained by breweries after the wort elaboration [5]. For every 100 L of brewed beer, 20 kg of wet BSG are generated. The world production of BSG is about 39 million tonnes [6]. The global production of green coffee in 2016 was more than 9 million tonnes [2], which makes coffee one of the most consumed beverages worldwide. Coffee silverskin (CS) is a tegument that covers coffee beans obtained as a residue from the roasting process and constitutes 4.2% of coffee beans [7].

To produce butanol from agro-food waste through fermentation processes, it is necessary to carry out a pretreatment followed by enzymatic hydrolysis to obtain sugars that can be metabolized by microorganisms [8]. For each biomass, the choice of the pretreatment is very important to modify the lignocellulosic structure, to obtain high amounts of fermentable sugars and to limit the generation of compounds that can inhibit the fermentation [9]. Inhibitory compounds include carboxylic acids, furans from sugar degradation such as furfural or 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and phenolic compounds [10]. In order to understand the inhibitory effects on fermentative microorganisms and to improve fermentation yields, it is important to identify the individual degradation compounds in hydrolysates as well as their concentrations [11]. Apart from usual inhibitors contained in biomass hydrolysates (acetic, formic and levulinic acids, furfural and 5-HMF), other compounds

such as aromatics and several aliphatic acids, including fatty acids, have been identified in hydrolysates such as poplar pretreated with dilute nitric acid [12], rice husks and corn cobs subjected to autohydrolysis [13]. Other works have focused on the identification of aromatic monomeric compounds in hydrolysates from switchgrass, corn stover and poplar pretreated with dilute acid [14] and wheat straw subjected to an alkaline wet oxidation [15]. To the best of our knowledge, no studies on the identification of compounds in hydrolysates from agro-food wastes such as AP, PP, BSG and CS, have been found in literature, limiting the knowledge about the fermentability of these hydrolysates.

Regarding the quantification of individual phenolic compounds, due to the huge number of compounds that can be generated by the degradation of lignin, a variety of analytical methods, mainly based on high performance liquid chromatography (HPLC) with refractive index detection (RID) or diode array detection (DAD), can be found in literature [5,16,17], depending on the compounds to be determined. In this way, as the generation of phenolic compounds depends on a wide range of factors such as the structure of biomass and the type and conditions of pretreatment, it is essential to know which phenolic compounds are present in the hydrolysates to develop a suitable analytical method to quantify simultaneously the most important ones.

In this paper, AP, PP, BSG and CS were selected as representative residues of the agro-food industries, due to their large production worldwide, and were studied as feedstocks to obtain hydrolysates that can be further used for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation with *Clostridium* spp. Twelve different dilute chemical reagents (acids, alkalis, organic solvents and surfactants) were compared to pretreat the cited biomasses, followed by enzymatic hydrolysis, to choose those hydrolysates with higher amounts of released sugars. The objectives of this work were: (i) to identify the potential fermentation inhibitory compounds present in the hydrolysates of agro-food wastes, (ii) to develop and to validate an easy, fast and robust analytical method by HPLC-DAD to quantify simultaneously the most frequent phenolic compounds identified in the agro-food wastes hydrolysates and (iii) to apply the developed methodology to the analysis of AP, PP, BSG and CS hydrolysates.

5.2. Material and methods

5.2.1. Chemicals and reagents

Analytical grade NaOH (purity: $\geq 98\%$), KOH ($\geq 85\%$), HCl (37%), H₂SO₄ (96%), chemical pure grade HNO₃ (65%) and HPLC grade methanol ($\geq 99.9\%$) were provided by Panreac (Castellar del Vallès, Spain). Analytical grade ammonium hydroxide solution (25%, w/w), ethanol (96%), citric acid ($\geq 99.5\%$), anhydrous MgSO₄ (98%) and ethyl acetate (for GC residue analysis, $\geq 99.8\%$) were supplied by Scharlab (Sentmenat, Spain). Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was purchased from Ankom Technologies (Macedon, NY, USA). Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000, $\geq 95\%$) was obtained from Acros Organics (Geel, Belgium). Tween 80, analytical grade pyridine ($\geq 99\%$), HPLC grade acetone ($\geq 99.5\%$), Folin Denis' reagent, derivatization reagent N,O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, 99.5%) + trimethylchlorosilane (TMCS, 99.2%), 99:1 (Sylon BFT) and all the analytical standards: D-(-)-cellobiose ($\geq 98\%$), D-(+)-glucose ($\geq 99\%$), D-(+)-xylose ($\geq 99\%$), L-rhamnose monohydrate ($\geq 99\%$), D-(-)-arabinose ($\geq 98\%$), acetic acid (99.99%), formic acid ($\geq 95\%$), levulinic acid (98%), 5-HMF (99%), furfural (99%), gallic acid monohydrate ($\geq 99.0\%$), 3,4-dihydroxybenzoic acid ($\geq 97.0\%$), 2,5-dihydroxybenzoic acid ($\geq 99.0\%$), 4-hydroxybenzoic acid ($\geq 99.0\%$), 3-hydroxybenzoic acid ($\geq 99.0\%$), vanillic acid ($\geq 97.0\%$), caffeic acid ($\geq 98.0\%$), syringic acid ($\geq 95.0\%$), vanillin ($\geq 98.5\%$), *p*-coumaric acid ($\geq 98.0\%$), caffeine (99.9%), syringaldehyde ($\geq 98.0\%$) and ferulic acid (99.0%) were provided by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Deionized water (resistivity $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) was produced by using a Milli-Q ultrapure system (Millipore, Bedford, MA, USA) and was used throughout this work. The enzyme Celluclast 1.5L was kindly supplied by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) and its enzymatic activity was 88 FPU mL⁻¹.

5.2.2. Biomass description and processing

Four different dry lignocellulosic wastes from the agro-food industry were used in this study. The biomasses used and their suppliers were: AP from Muns Agroindustrial S.L. (Lleida, Spain), PP from Aperitivos Gus S.L. (Riego de la Vega, Spain), BSG from a brewery located in the centre of Italy and CS from Illycaffè S.p.A. (Triestre, Italy). The biomasses were ground in a SM100 Comfort rotary mill (Retsch GmbH, Haan, Germany), sieved to a size of 0.5-1.0 mm and stored at room temperature in airtight containers until being used. Moisture, ash, cellulose, hemicellulose, Klason lignin, protein and fat were determined as described by Hijosa-Valsero et

al. [18]. Starch was determined by polarimetry according to Spanish national regulations [19]. Total sugars content was calculated as the sum of monomeric sugars (glucose, xylose, arabinose, mannose, galactose and rhamnose). The concentration of polymeric sugars was calculated from the concentration of monomeric sugars using an anhydro-form correction factor of 0.88 (or 132/150) for pentoses (xylose and arabinose) and of 0.90 (or 162/180) for hexoses (glucose, mannose, galactose and rhamnose). The difference between the amounts of glucan and starch was considered as cellulose. Hemicellulose was calculated as the sum of xylan, arabinan, mannan, galactan and rhamnan [7].

5.2.3. Hydrolysate preparation and chemical analysis

Agro-food industrial wastes (AP, PP, BSG and CS) were pretreated with different chemical reagents (acids, alkalis, organic solvents and surfactants) followed by enzymatic hydrolysis. The obtained hydrolysates containing the highest amount of fermentable sugars were selected to study their potential inhibitors for ABE fermentation. Thereby, twelve different chemical reagents: acids (H_2SO_4 , HCl, HNO_3), alkalis (NaOH, KOH, NH_4OH), organic solvents (ethanol, methanol, acetone) and surfactants (Tween 80, PEG 6000, and CTAB) were compared to select the most efficient reagent in each group. Hydrolysis experiments were performed as previously described [18]. The hydrolysates obtained were analyzed for sugars (cellobiose, glucose, xylose, rhamnose and arabinose), organic acids (formic acid, acetic acid and levulinic acid), 5-HMF and furfural, using an Agilent 1200 HPLC equipment (Agilent Technologies) furnished with an Aminex HPX-87H (Biorad, Hercules, CA, USA) and a G1362A RID detector (Agilent Technologies) as described by Hijosa-Valsero et al. [18]. In addition, total phenolic compounds (TPC) were determined by Folin and Denis' assay [20]. The hydrolysates selected to carry out the identification of potential inhibitory compounds were stored at $-25\text{ }^\circ\text{C}$ until analyzed.

Further information can be seen in Annex II (Anexo II).

5.2.4. Analytical method for the identification of inhibitory compounds in hydrolysates

5.2.4.1. Extraction and derivatization procedures

To perform the identification study of potential inhibitors, hydrolysates obtained after chemical pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis were extracted and derivatized.

First, samples were centrifuged ($4000 \times g$ for 15 min) to remove solid biomass. Supernatants were separated and divided in two aliquots. One aliquot was acidified to pH 2 with concentrated HCl and in the other one NaOH 1 M was added until pH 7. Two volumes of 10 mL of each aliquot with adjusted pH were extracted three times using ethyl acetate (1:1 v:v). The organic layer was collected, dewatered over anhydrous magnesium sulfate and filtered through cellulose filters (20-25 μm , Model 1238, Filter Lab, Barcelona, Spain). The solvent was evaporated at 55 °C for 30 min under a stream of nitrogen gas using a Turbo Vap LV (Caliper Life Sciences, Waltham, MA, USA). One of the two dried ethyl acetate extracts obtained from acid pH hydrolysate and neutral pH hydrolysate was resuspended in 1.5 mL of ethyl acetate and the other one was derivatized following a modification of the method described by Raj et al. [21]. Briefly, 500 μL of ethyl acetate and 10 μL of pyridine were added in the dried sample followed by silylation with 50 μL of the derivatization reagent BSTFA + TMCS (99:1). The mixture was heated at 60 °C for 15 min with periodic shaking to dissolve residues. When the sample cooled, 940 μL of ethyl acetate were added to complete a volume of 1.5 mL. All the samples were filtered through 0.22 μm nylon filter previous to analysis. Each extraction was done by triplicate.

Further information can be seen in Annex II (Anexo II).

5.2.4.2. GC-MS analysis

To carry out the identification of compounds in ethyl acetate extracts of hydrolysates, a Varian CP3800 gas chromatograph with a Saturn 2200 ion trap mass spectrometer (GC-MS) (Varian, Walnut Creek, CA, USA), was used. The GC was fitted with a CombiPal autosampler (100 μL syringe) and a split-splitless programmed temperature injector 1079 model with an electronic flow control (EFC) system. The glass liner was equipped with a carbofrit plug (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A fused silica untreated capillary guard column 2 m x 0.25 mm i.d. from Agilent Technologies was connected to a Factor Four VF-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film) analytical column from Agilent Technologies. Helium (purity 99.9999%) was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The column temperature program began at 70 °C (hold 3.5 min) and then it was ramped up to 180 °C at 25 °C min^{-1} (hold 10 min) and finally increased to 300 °C at 4 °C min^{-1} (hold 10 min). The injector temperature program started at a temperature of 100 °C (hold 0.50 min) and then increased at 100 °C min^{-1} until 300 °C (hold 10 min) was reached. The split ratio was programmed as follows: 0 min (open, 50:1), 0.5 min (closed, off), 3.5 min (open, 100:1), 10.0 min (open, 50:1). The transfer

line temperature was maintained at 280 °C. The MS was operated in the full-scan electronic impact (EI) mode at 70 eV with a 0.97 s scan⁻¹. The emission current of the ionization filament was set to 10 µA and the acquisition mass range was 40 – 650 U. The NIST (National Institute of Standards and Technology) library of mass spectra was used for identification of the compounds.

5.2.5. Quantitative HPLC-DAD analysis of phenolics and caffeine

The most frequent and abundant individual phenolic compounds identified in ethyl acetate extracts of agro-food wastes hydrolysates, along with caffeine, were selected to develop a chromatographic method for simultaneous quantification.

The analytical method was developed using an Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies) equipped with a G1313A autosampler, a G1311A quaternary pump, a G1316A thermostatted column and a G1315B DAD detector. The separation was carried out with an analytical Waters Resolve C18 (300 mm x 3.9 mm, 5 µm) column (Waters Corporation, Milford, MA, USA) operated at 35 °C. The mobile phase consisted of two solvents: Solvent A, aqueous 1% (v/v) acetic acid with the pH adjusted to 2.5 by addition of H₃PO₄ and Solvent B, acetonitrile. The flow rate was 0.9 mL min⁻¹ and the gradient program was optimized as follows: 95% A isocratic (15 min), 95-70% A (13 min), 70-95% A (2 min), with a post run of 5 min. The injection volume was 20 µL. The diode array detector was set at an acquisition range of 220-400 nm. Hydrolysate samples were filtrated through a nylon syringe filter of 0.22 µm prior to the injection.

5.2.6. HPLC-DAD method validation

Validation of the developed HPLC-DAD method to quantify phenolics and caffeine in agro-food waste hydrolysates was evaluated in terms of linearity, precision, repeatability, accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines [22].

5.3. Results and discussion

5.3.1. Raw materials and hydrolysates

5.3.1.1. Chemical composition of solid agro-food wastes.

The chemical compositions of the agro-food wastes studied in this work (% w/w, dry basis) are summarized in Table 5.1. Since these agro-food wastes were studied to obtain fermentable hydrolysates, it is important to mention that the highest total sugars content value was found in AP, 59.78% (w/w), and the lowest value was found in CS, 31.90% (w/w). Total sugars, cellulose, hemicellulose, lignin, protein and fat contents of AP were in agreement with the values described by Dhillon et al. [3]. Regarding PP, total sugars content was lower than values found in previous works [4,23] while protein and Klason lignin contents were higher and ashes were similar to those values mentioned in the cited works. In the case of BSG, glucan, hemicellulose, Klason lignin, protein and ashes content were in agreement with values described by Meneses et al. [24]. Regarding CS, the results obtained for protein and total sugars contents were comparable to values reported by Mussatto et al. [25], but were lower than the values described by Ballesteros et al. [7]. Nevertheless, ashes, fat and Klason lignin contents were in agreement with values reported by Ballesteros et al. [7].

Table 5.1. Chemical composition of biomass feedstock (% dry basis).

Components	AP	PP	BSG	CS
Total sugars (%)	59.78 ± 0.42	45.60 ± 0.17	45.59 ± 0.84	31.90 ± 0.12
Glucan (%)	22.71 ± 0.47	33.05 ± 0.16	19.23 ± 0.38	18.36 ± 0.07
Cellulose (%)	22.71 ± 0.47	8.76 ± 0.10	13.65 ± 0.68	10.85 ± 0.16
Starch (%)	Na	24.29 ± 0.06	5.58 ± 0.30	7.51 ± 0.08
Hemicelullose (%)	15.79 ± 0.41	7.82 ± 0.01	21.32 ± 0.37	10.13 ± 0.04
Total soluble sugars (%)	16.64 ± 0.48	0.45 ± 0.04	0.14 ± 0.01	0.42 ± 0.01
Klason lignin (%)	19.80 ± 0.69	34.71 ± 0.59	16.01 ± 0.19	27.11 ± 0.08
Protein (%)	5.21 ± 0.11	11.33 ± 0.04	22.70 ± 0.01	15.16 ± 0.06
Ash (%)	1.40 ± 0.01	7.89 ± 0.33	3.93 ± 0.08	6.17 ± 0.02
Fat (%)	1.52 ± 0.21	2.59 ± 0.14	6.02 ± 0.25	5.22 ± 0.03

Results are expressed as mean ± standard deviation; $n = 3$. AP: apple pomace, PP: potato peel, BSG: brewers' spent grain, CS: coffee silverskin, na: not analyzed.

5.3.1.2. Chemical composition and selection of hydrolysates

The agro-food wastes (AP, PP, BSG and CS) were subjected to twelve different chemical pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis. The objective was to select one hydrolysate per each group of chemical reagents used in the pretreatments of each feedstock to perform a detailed identification of potential inhibitory compounds for ABE fermentation. The hydrolysates selected were those with the highest concentration of hydrolyzed sugars (g L^{-1}) and sugars recovery yields higher than 50%.

In this way, the hydrolysates obtained were analyzed for total sugars released and main fermentation inhibitors generated (formic, acetic and levulinic acids, 5-HMF, furfural and TPC). All the results can be seen in Table 5.2.

Sugar composition of hydrolysates

According to the concentration of total sugars hydrolyzed, the highest values were provided by dilute acid pretreatments for AP, BSG and CS. Acid pretreatments usually achieve high sugar yields from lignocellulosic materials [26]. In the case of AP, PP and BSG, nitric acid was significantly more efficient ($p < 0.05$) than sulfuric acid and hydrochloric acid pretreatments. The amounts of sugars hydrolyzed from AP, PP and BSG by nitric acid were 53.08 g L^{-1} , 41.17 g L^{-1} and 36.57 g L^{-1} , respectively, which corresponded to sugar recovery yields of 87.07%, 64.77% and 76.66%, respectively. These results were in agreement with those obtained by Rodríguez-Chong et al. [26] that compared different dilute acid pretreatments (H_2SO_4 , HNO_3 and HCl) of sugar cane bagasse and reported that nitric acid needed a shorter time to hydrolyze high sugar concentrations. Nevertheless, in the case of CS, the amounts of hydrolyzed sugars by the three acid pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis, were very similar and there were no significant differences between them ($p > 0.05$).

Alkali pretreatments hydrolyzed much lower concentrations of total sugars for all the feedstocks except PP, which reached the highest value when it was pretreated with ammonia solution (43.17 g L^{-1} , 57.98% yield of sugars recovery). For the rest of the biomasses, alkali pretreatments yielded very low sugars recoveries ($< 42\%$). The chemical and ultrastructural modifications of the cell wall for most alkaline pretreatments must still be understood in order to develop mixtures of suitable enzymes that can effectively hydrolyze both cellulose and hemicellulose [27].

Table 5.2. Total sugars released, fermentation inhibitors (formic, acetic and levulinic acids, 5-HMF, furfural and TPC) and sugars recovery contained in hydrolysates of AP, PP, BSG and CS obtained by pretreatment with chemical reagents and subsequent enzymatic hydrolysis.

	Tot. Sugars (g L ⁻¹)	Formic AC. (g L ⁻¹)	Acetic AC. (g L ⁻¹)	Levulinic AC. (g L ⁻¹)	5-HMF (g L ⁻¹)	Furfural (g L ⁻¹)	TPC (g L ⁻¹)	% Sugar Rec (%, w/w)	
Acids (2%, w/w)	H ₂ SO ₄	43.99 ± 0.33	1.41 ± 0.02	1.47 ± 0.01	2.79 ± 0.04	2.14 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.92 ± 0.01	75.33 ± 0.61
	HCl	44.52 ± 0.31	1.46 ± 0.03	1.51 ± 0.02	2.90 ± 0.02	2.19 ± 0.05	0.24 ± 0.02	0.86 ± 0.05	76.25 ± 0.99
	HNO ₃	53.08 ± 1.16	0.77 ± 0.05	1.57 ± 0.09	0.05 ± 0.02	0.68 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.95 ± 0.05	87.07 ± 0.24
Alkalis (2%, w/w)	NaOH	19.12 ± 0.63	3.25 ± 0.12	2.59 ± 0.09	< 0.01	< 0.01	< 0.01	2.22 ± 0.08	31.94 ± 0.74
	KOH	18.76 ± 3.10	2.00 ± 0.27	2.97 ± 0.19	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.90 ± 0.09	29.93 ± 4.34
	NH ₄ OH	17.37 ± 0.24	1.01 ± 0.01	1.81 ± 0.02	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.14 ± 0.04	26.43 ± 0.37
Organic Solvents (40%, w/w)	Ethanol	32.97 ± 0.44	< 0.01	0.32 ± 0.03	< 0.01	0.27 ± 0.02	< 0.01	0.38 ± 0.05	56.27 ± 0.44
	Methanol	31.37 ± 1.63	< 0.01	0.27 ± 0.03	< 0.01	0.27 ± 0.02	< 0.01	0.49 ± 0.05	53.73 ± 2.75
	Acetone	33.37 ± 0.30	< 0.01	0.39 ± 0.04	< 0.01	0.28 ± 0.00	< 0.01	0.25 ± 0.01	57.35 ± 0.70
Surfactants (3%, w/w)	Tween 80	32.42 ± 2.13	0.05 ± 0.01	2.47 ± 0.07	0.86 ± 0.02	0.25 ± 0.01	< 0.01	0.80 ± 0.09	53.94 ± 2.68
	PEG 6000	36.77 ± 0.98	< 0.01	0.44 ± 0.09	< 0.01	0.21 ± 0.01	< 0.01	0.42 ± 0.05	60.76 ± 1.02
	CTAB	30.66 ± 4.67	0.05 ± 0.05	0.42 ± 0.08	< 0.01	0.31 ± 0.01	< 0.01	0.45 ± 0.03	45.25 ± 13.35
Acids (2%, w/w)	H ₂ SO ₄	30.70 ± 2.15	0.32 ± 0.20	1.39 ± 0.15	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.03 ± 0.03	0.85 ± 0.19	46.47 ± 4.28
	HCl	29.55 ± 0.95	0.86 ± 0.15	1.37 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.01	< 0.01	0.86 ± 0.13	46.78 ± 3.09
	HNO ₃	41.17 ± 1.11	0.29 ± 0.10	1.32 ± 0.03	0.02 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.71 ± 0.18	64.77 ± 2.00
Alkalis (2%, w/w)	NaOH	30.09 ± 5.44	1.65 ± 0.67	1.41 ± 0.08	< 0.01	< 0.01	< 0.01	3.10 ± 1.24	59.37 ± 12.56
	KOH	35.05 ± 1.34	1.95 ± 0.02	1.08 ± 0.04	0.14 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	1.49 ± 0.10	65.97 ± 2.93
	NH ₄ OH	43.17 ± 0.49	0.36 ± 0.01	1.25 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.50 ± 0.03	57.98 ± 4.21
Organic Solvents (40%, w/w)	Ethanol	34.55 ± 0.70	0.09 ± 0.01	0.36 ± 0.02	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.29 ± 0.01	54.90 ± 3.82
	Methanol	37.03 ± 0.60	0.17 ± 0.01	0.37 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.35 ± 0.02	58.27 ± 1.03
	Acetone	35.48 ± 0.10	0.09 ± 0.01	0.44 ± 0.04	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.43 ± 0.01	53.38 ± 0.77
Surfactants (3%, w/w)	Tween 80	43.70 ± 0.50	0.10 ± 0.01	2.79 ± 0.07	1.01 ± 0.07	< 0.01	< 0.01	0.75 ± 0.06	68.79 ± 1.79
	PEG 6000	38.57 ± 0.81	< 0.01	0.46 ± 0.04	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.40 ± 0.02	55.36 ± 1.66
	CTAB	38.29 ± 2.43	0.11 ± 0.01	0.43 ± 0.02	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.47 ± 0.05	63.27 ± 4.99

	Tot. Sugars (g L ⁻¹)	Formic Ac. (g L ⁻¹)	Acetic Ac. (g L ⁻¹)	Levulinic Ac. (g L ⁻¹)	5-HMF (g L ⁻¹)	Furfural (g L ⁻¹)	TPC (g L ⁻¹)	% Sugar Rec (%, w/w)
Acids (2%, w/w)	H ₂ SO ₄	32.92 ± 0.27	0.13 ± 0.02	0.98 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	1.14 ± 0.05	75.08 ± 2.67
	HCl	34.06 ± 1.14	0.16 ± 0.01	0.99 ± 0.04	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	1.14 ± 0.03	76.54 ± 2.91
	HNO ₃	36.57 ± 0.83	0.56 ± 0.02	0.94 ± 0.01	< 0.01	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.02	76.66 ± 2.39
	NaOH	15.35 ± 0.24	0.61 ± 0.02	1.07 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	34.88 ± 0.95
	KOH	17.85 ± 0.26	0.73 ± 0.01	1.06 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	41.01 ± 0.53
	NH ₄ OH	14.92 ± 0.09	0.19 ± 0.02	0.80 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	28.03 ± 0.93
	Ethanol	10.54 ± 0.16	0.17 ± 0.02	0.10 ± 0.03	< 0.01	< 0.01	< 0.01	21.99 ± 1.51
	Methanol	8.42 ± 0.15	< 0.01	0.12 ± 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	17.16 ± 0.39
	Acetone	11.38 ± 0.11	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.03	< 0.01	< 0.01	< 0.01	24.80 ± 0.88
	Tween 80	13.39 ± 0.14	< 0.01	1.00 ± 0.05	0.54 ± 0.02	< 0.01	< 0.01	26.60 ± 0.07
Surfactants (3%, w/w)	PEG 6000	11.43 ± 0.34	< 0.01	0.14 ± 0.03	< 0.01	< 0.01	0.28 ± 0.01	22.53 ± 1.00
	CTAB	10.35 ± 0.35	0.18 ± 0.01	0.13 ± 0.06	< 0.01	< 0.01	0.39 ± 0.05	21.06 ± 1.33
	H ₂ SO ₄	22.81 ± 0.28	0.29 ± 0.01	1.45 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.01	64.10 ± 1.73
	HCl	23.08 ± 1.56	0.30 ± 0.02	1.53 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.02	64.32 ± 3.90
Alkalis (2%, w/w)	HNO ₃	21.93 ± 0.08	0.35 ± 0.03	1.54 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.01	1.25 ± 0.08	57.28 ± 1.01
	NaOH	9.85 ± 0.06	1.93 ± 0.03	1.67 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	1.92 ± 0.09	29.07 ± 0.36
	KOH	10.91 ± 0.25	2.11 ± 0.02	1.79 ± 0.04	< 0.01	< 0.01	1.84 ± 0.26	30.78 ± 0.55
	NH ₄ OH	12.65 ± 0.72	0.78 ± 0.01	1.59 ± 0.02	< 0.01	< 0.01	< 0.01	28.18 ± 1.56
	Ethanol	9.16 ± 0.10	0.16 ± 0.00	0.31 ± 0.10	< 0.01	< 0.01	< 0.01	23.73 ± 0.72
	Methanol	9.86 ± 0.78	< 0.01	0.32 ± 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	25.66 ± 2.30
Organic Solvents (40%, w/w)	Acetone	11.14 ± 0.32	0.19 ± 0.00	0.26 ± 0.04	< 0.01	0.04 ± 0.01	0.96 ± 0.04	29.22 ± 1.26
	Tween 80	12.57 ± 0.55	0.19 ± 0.01	0.68 ± 0.03	< 0.01	< 0.01	1.47 ± 0.06	30.37 ± 1.58
	PEG 6000	11.90 ± 0.23	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.11	< 0.01	< 0.01	0.90 ± 0.04	28.47 ± 1.39
	CTAB	10.41 ± 1.34	0.16 ± 0.00	0.32 ± 0.08	< 0.01	< 0.01	0.56 ± 0.04	25.27 ± 3.43

Results are expressed as mean ± standard deviation; n = 3. -: not detected. TPC: Total phenolic compounds. Sugar recovery: ratio between the mass of mono- and disaccharides in the hydrolysate and the total mass of carbohydrates in the untreated biomass, expressed as a percentage (%). Note: The percentage below each group of chemical reagents represent the ratio between the mass of reagent and the total mass of aqueous solution that contains the reagent.

Regarding the pretreatments performed with organic solvents and surfactants, only in the cases of AP and PP the yields of sugars recovery were higher than 50%. Organic acid pretreatment increases cellulose digestibility but, although most of the hemicellulose sugars are hydrolyzed, half of them are in the oligomeric form [28]. PEG 6000 was the surfactant that produced the greatest value of sugar concentrations in AP hydrolysates (36.77 g L^{-1}), but there were not significant differences between that value and those obtained with CTAB and Tween 80. Regarding the organic solvents used in the pretreatment of AP (methanol, ethanol and acetone), no significant differences ($p > 0.05$) in the concentration of hydrolyzed sugars ($31.37 - 33.37 \text{ g L}^{-1}$) were observed. In the case of PP, methanol and Tween 80 were the most efficient organic solvent and surfactant (37.03 g L^{-1} and 43.70 g L^{-1} respectively) and the percentages of sugar recovery were 58.27% and 68.79%, respectively. Qing et al. [29] studied the impact of three surfactants (Tween 80, dodecylbenzene sulfonic acid and PEG 4000) on pretreatment of corn stover ($140-220 \text{ }^\circ\text{C}$) and observed that Tween 80 gave better results of enzymatic hydrolysis yields and increased total sugars recovery.

Main ABE fermentation inhibitors in the hydrolysates

In Table 5.2, the concentrations of potential inhibitory compounds in the hydrolysates can also be seen.

Total phenolic compounds (TPC): Regarding TPC, two alkaline pretreatments (NaOH and KOH) produced the maximum concentrations for all the feedstocks followed by acid pretreatments. These results are in agreement with Silverstein et al. [30] who compared four chemicals (H_2SO_4 , NaOH, H_2O_2 and ozone) for pretreatment of cotton stalks and reported the highest level of delignification with NaOH pretreatment (65.63% at 2% NaOH, 90 min, $121 \text{ }^\circ\text{C}$). Nevertheless, pretreatment with ammonia solution generated a much lower concentration of TPC for all the biomasses than those obtained with NaOH and KOH. Naseeruddin et al. [31] studied chemical pretreatment of *Propolis juliflora* (10% (w/v) solid load) and compared alkali reagents in different concentrations (NaOH 0.1 M, KOH 0.3 M and NH_4OH 10% v/v) at room temperature ($30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) to remove lignin. Their results were in accordance with those reported in this work since they found lower concentrations of TPC in ammonia hydrolysates (1.04 g L^{-1}) compared with those found in the NaOH and KOH hydrolysates (3.94 and 3.32 g L^{-1}).

Sugar degradation compounds: In relation to furans (furfural and 5-HMF) and levulinic acid, the maximum concentrations were reached when biomasses were pretreated with acid

solutions. When lignocellulosic material is pretreated with dilute acid solutions combined with high temperature, sugar degradation reactions take place [27]. In this way, pentoses degradation generates furfural whereas hexoses degradation produces 5-HMF, which can also degrade into levulinic acid and formic acid [32]. Nevertheless, the degradation effect observed by nitric acid was much lower. Rodríguez-Chong et al. [26] also reported the generation of lower concentration of inhibitors when sugar cane bagasse was pretreated with nitric acid than when it was pretreated with sulfuric acid or hydrochloric acid. It should be noted that, in the case of AP, the generation of hexose degradation products was remarkable due to the elevated percentage of soluble sugars in the biomass (16.64% calculated as the sum of soluble fructose and glucose) that were easier to degrade because of their easy accessibility.

Acetic acid: Regarding acetic acid (structural component of hemicellulose), the highest concentrations were reached when biomasses were pretreated with alkali solutions (especially NaOH and KOH) followed by pretreatment with acid solutions. The concentrations of acetic acid generated when the raw materials were pretreated with Tween 80 were remarkably higher than those produced in the pretreatments with other surfactants (PEG 6000 and CTAB). On the other hand, the minimum amount of total inhibitory compounds was observed when the biomasses were pretreated with organic solvents and surfactant agents (except Tween 80).

Selection of hydrolysates

Table 5.3 compares the contents of total hydrolyzed sugars and the main fermentation inhibitors (formic, acetic and levulinic acids, 5-HMF, furfural and TPC) determined in the hydrolysates selected to carry out a detailed identification study on ABE fermentation potentially inhibitory compounds. For each agro-food waste (AP, PP, BSG and CS), the criterion was to select the hydrolysate with the highest total sugars content within each group of chemical reagents (acids, alkalis, organic solvents and surfactants) but only if the yield of sugars recovery was higher than 50%.

Regarding AP, the selected hydrolysates were those obtained with nitric acid (with regard to acidic pretreatment), acetone (within organic solvents) and PEG 6000 (within surfactants) and no alkaline reagent was selected since the yield of sugars recovery was less than 50%. In the case of PP, the hydrolysates pretreated with nitric acid, ammonia solution, methanol and Tween 80, were selected. For BSG and CS only the hydrolysates produced with

nitric acid were studied, since the rest of the groups of chemical reagents produced total sugars recoveries lower than 50%.

Table 5.3. Total sugars released, fermentation inhibitors (formic, acetic and levulinic acids, 5-HMF, furfural and TPC) and sugars recovery contained in the selected hydrolysates of AP, PP, BSG and CS obtained by pretreatment with chemical reagents and subsequent enzymatic hydrolysis.

		Tot. Sugars (g L ⁻¹)	Formic Ac. (g L ⁻¹)	Acetic Ac. (g L ⁻¹)	Levulinic Ac. (g L ⁻¹)	5-HMF (g L ⁻¹)	Furfural (g L ⁻¹)	TPC (g L ⁻¹)	Sugar Rec (%, w/w)
AP	HNO ₃	53.08 ± 1.16	0.77 ± 0.05	1.57 ± 0.09	0.05 ± 0.02	0.68 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.95 ± 0.05	87.07 ± 0.24
	Acetone	33.37 ± 0.30	< 0.01	0.39 ± 0.04	< 0.01	0.28 ± 0.00	< 0.01	0.25 ± 0.01	57.35 ± 0.70
	PEG 6000	36.77 ± 0.98	< 0.01	0.44 ± 0.09	< 0.01	0.21 ± 0.01	< 0.01	0.42 ± 0.05	60.76 ± 1.02
PP	HNO ₃	41.17 ± 1.11	0.29 ± 0.10	1.32 ± 0.03	0.02 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.71 ± 0.18	64.77 ± 2.00
	NH ₄ OH	43.17 ± 0.49	0.36 ± 0.01	1.25 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.50 ± 0.03	57.98 ± 4.21
	Methanol	37.03 ± 0.60	0.17 ± 0.01	0.37 ± 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.35 ± 0.02	58.27 ± 1.03
	Tween 80	43.70 ± 0.50	0.10 ± 0.01	2.79 ± 0.07	1.01 ± 0.07	< 0.01	< 0.01	0.75 ± 0.06	68.79 ± 1.79
BSG	HNO ₃	36.57 ± 0.83	0.56 ± 0.02	0.94 ± 0.01	< 0.01	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.60 ± 0.01	76.66 ± 2.39
CS	HNO ₃	21.93 ± 0.08	0.35 ± 0.03	1.54 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.01	1.25 ± 0.08	57.28 ± 1.01

Results are expressed as mean ± standard deviation; *n* = 3. -: not detected. AP: apple pomace, PP: potato peel, BSG: brewers' spent grain, CS: coffee silverskin. TPC: Total phenolic compounds. Sugar recovery: ratio between the mass of mono- and disaccharides in the hydrolysate and the total mass of carbohydrates in the untreated biomass, expressed as a percentage (%).

5.3.2. Identification (GC-MS) of potential fermentation inhibitory compounds in hydrolysates

Sixty-seven compounds were well separated with the GC conditions used and were identified in the extracts of AP, PP, BSG and CS hydrolysates (Table 5.4). The hydrolysates with initial pH adjusted to 7, before carrying out the extraction with ethyl acetate, allowed the identification of compounds such as alcohols, aldehydes and ketones, whereas hydrolysates with initial pH adjusted to 2 were more adequate to identify compounds with acidic characteristics [15,33]. Regarding the main aromatic acids, they were identified as their trimethylsilylated derivatives.

Table 5.4. Compounds identified (GC-MS) in ethyl acetate extracts of the selected hydrolysates of AP, PP, BSG and CS obtained by pretreatment with chemical reagents and subsequent enzymatic hydrolysis.

Peak RT (min)	Compound name	AP			PP			BSG		CS	
		HNO ₃	PEG 6000	Acetone	HNO ₃	NH ₄	Methanol	Tween 80	HNO ₃	HNO ₃	
<i>Non-aromatic compounds</i>											
7.01	2-Furancarboxylic acid (2-Furoic acid)	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
7.88	Butanedioic acid (Succinic acid)	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
8.05	2-Methylene butanedioic acid (Itaconic acid)	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
8.43	2-Butenedioic acid (Fumaric acid)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
9.20	Hydroxybutanedioic acid (Malic acid)	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
9.43	2,6-Dimethylquinoline	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9.83	5-Hydroxymethylfuran carboxylic acid	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
9.99	5-Amino-4-imidazolecarboxamide	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.66	1-Ciclohexil-3,4,5,6-tetra methyl-2-pyridone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10.94	1,5-Dihydro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-2,4-dione	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
16.71	1,3,7-Trimethylxanthine (Caffeine)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
20.36	3,4-Dimethylhexanedioic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22.82	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
28.62	Octadecanoic acid (Stearic acid)	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
36.49	2,3-Dihydroxypropyl hexadecanoate	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
40.12	2,3-Dihydroxypropyl octadecanoate	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Aromatic compounds</i>											
7.25	(+)-2,3-Dibenzoyl-D-tartaric acid	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7.59	1,2-Benzenedimethanol (o-Xylene- α , α -diol)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7.76	Benzoic acid	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
8.17	4-Ethenyl-2-methoxyphenol (4-Vinylguaiaicol)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

Peak RT (min)	Compound name	AP			PP			BSG		CS	
		HNO ₃	PEG 6000	Acetone	HNO ₃	NH ₃	Methanol	Tween 80	HNO ₃	HNO ₃	
8.27	4,5-Dimethyl-1,2-phenylenediamine (4,5-Diamino-o-xylene)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8.36	4-Hydroxy-2-methylacetophenone	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8.53	Phenyl-4-hydroxy benzoate (Phenyl paraben)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8.61	4'-Hydroxy-2-phenylacetophenone	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
8.69	2-tert-Butyl-4-methylphenol (2-tert-Butyl-p-cresol)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8.79	4-Hydroxybenzaldehyde	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
8.95	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (Vanillin)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.07	2-Ethyl-4-methyl phenol (2-ethyl-p-cresol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.29	4-hydroxy-3-methoxy-1-propenylbenzene (isoeugenol)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
9.36	4-hydroxy-1-(4-nitrobenzenesulfonyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
9.51	4-Hydroxyacetophenone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.60	3'-Hydroxy-4'-methoxyacetophenone	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
9.70	2,4-Di-tert-butylphenol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
9.91	2,6-Di-tert-butylphenol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.06	4-hydroxy-3-methoxyphenylacetone (Vanillyl-methyl ketone)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
10.15	4-Hydroxybenzoic acid	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
10.21	4-Hydroxyphenyl ethanol (Tyrosol)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10.28	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (Vanillic acid)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
10.36	1,2,3-Trihydroxybenzene	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10.43	3-Methoxy-N-methyl-4-dihydroxyphenethylamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.79	3-Hydroxybenzoic acid (<i>m</i> -salicylic acid)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.14	2,5-Dihydroxybenzoic acid (gentisic acid)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
11.25	3,4,5-Trimethoxyphenol (Antiarol)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11.71	3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-benzaldehyde (syringaldehyde)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12.05	1,3-Diphenyl-1,2-butan-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
12.13	1-[2,4-Dihydroxyphenyl]-2-[4-hydroxyphenyl]-1-propanone	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Peak RT (min)	Compound name	AP			PP			BSG		CS	
		HNO ₂	PEG 6000	Acetone	HNO ₂	NH ₃	Methanol	Tween 80	HNO ₂	HNO ₂	
12.48	3,4-Dimethoxy-benzoic acid (Veratric acid)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
13.01	1-Hydroxy-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
13.20	3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone (acetosyringone)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
13.55	2,6-Dihydroxybenzoic acid (<i>is</i> -Resorcylic acid)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.74	1-[2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl]-1-butanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
13.81	2',4',6'-Trihydroxy-3'-methylbutyophenone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.61	<i>p</i> -Hydroxycinnamic acid (<i>p</i> -Coumaric acid)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
14.77	3,4-Dihydroxybenzoic acid (Protocatechuic acid)	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
14.85	3-Methoxy-4-hydroxy-phenyl-propanol (3-Vanilpropanol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
15.00	3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (Syringic acid)	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
15.87	4-Hydroxy-3-methoxy-cinnamaldehyde (Coniferyl aldehyde)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.50	3,4,5-Trihydroxybenzoic acid (Gallic acid)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
17.91	3-Methoxy-4-dihydroxyphenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.12	4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid (Ferulic acid)	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
20.23	3,4-Dimethoxy-cinnamic acid (Dimethyl-caffeic acid)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21.56	3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamaldehyde (sinapaldehyde)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24.41	6,7-Dihydrocoumarin ether	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25.56	3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
34.41	2,4-Bis(1-phenylethyl) phenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35.39	Butyl phthalate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
40.27	4,4'-Thiobis(2-tert-butyl-5-methylphenol)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+

5.3.2.1. Non-aromatic compounds

Aliphatic acids such as butanedioic, 2-methylene butanedioic, 2-butenedioic and hydroxybutanedioic were found in some extracts (Table 5.4). Luo et al. [12] had previously described these compounds in dilute nitric acid hybrid poplar hydrolysates. Apart from the abovementioned aliphatic acids, 3,4-dimethylhexanedioic acid and the fatty acids hexadecanoic and octadecanoic, together with their monoglyceride derivatives (2,3-dihydroxypropyl hexadecanoate and 2,3-dihydroxypropyl octadecanoate), were identified in most of the analyzed extracts. Del Río et al. [34] studied the chemical composition of lipids in BSG and described the aforesaid compounds as some of the most abundant.

Two furan compounds are listed in Table 5.4: 2-furancarboxylic acid (oxidation product of furfural) and 5-hydroxymethylfurancarboxylic acid (oxidation product of 5-HMF). These furan acids are indicative of oxidation reactions during biomass pretreatment [12]. Furfural was not detected because it was removed from the extracts by vacuum evaporation. On the other hand, 5-HMF was not found in the extracts because it could have been oxidized or polymerized [12].

Four nitrogen-containing compounds were also listed in Table 5.4: 2,6-dimethylquinoline, 5-amino-4-imidazolecarboxamide, 1-ciclohexil-3,4,5,6-tetramethyl-2-pyridone and 1,5-dihydro-pyrrolo(2,3-d)pyrimidine-2,4-dione. Structures related to those nitrogen-containing compounds have been reported in autohydrolysis of rice husks and corn cobs hydrolysates [13].

Regarding the extract of CS, the peak identified as caffeine, a methylxanthine, was the highest peak that appears in its corresponding chromatogram.

It is important to mention that acetic and formic acids were not detected with this chromatographic method even though these acids have been quantified with the analytic method described in section 5.2.3.

5.3.2.2. Aromatic compounds

Phenolic compounds are the main inhibitors in lignocellulosic hydrolysates [11]. This kind of compounds are generated mainly from lignin degradation [12]. A variety of phenolics (alcohols, aldehydes, ketones, acids, esters, amines and ethers) has been found in the analyzed extracts. The type of feedstock and the chemical reagent used in the pretreatment have

important effects on the formation of the compounds in the hydrolysates (Table 5.4). The predominant phenolics found in the extracts were the following 13 compounds: 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin), 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid), 3-hydroxybenzoic acid (*m*-salicylic acid), 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid), 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde (syringaldehyde), *p*-hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid), 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid), 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (syringic acid), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid), 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid), 3,4-hydroxycinnamic acid (caffeic acid) and 4,4'-thiobis(2-tert-butyl-5-methylphenol). Several previous works have reported the presence of the first 12 phenolics cited in hydrolysates obtained from other lignocellulosic materials. In this way, those compounds were found in steam-pretreated hydrolysate of willow impregnated with SO₂ [35], in alkaline wet oxidation hydrolysate of wheat straw [15] or in dilute sulfuric acid hydrolysates of several grasses, softwoods, hardwoods and agaves [36]. Regarding the biomasses studied in the present work, the presence of vanillic, ferulic, *p*-coumaric, *p*-hydroxybenzoic and syringic acids has been previously reported in alkaline hydrolysate of BSG [5] and caffeic acid and ferulic acid in dilute sulfuric acid hydrolysate of AP [37]. Nevertheless, no detailed studies based on the identification of phenolic compounds in hydrolysates of AP, PP, BSG or CS has been found in literature.

Regarding the presence of 4,4'-thiobis(2-tert-butyl-5-methylphenol), this is a sulfur-containing hindered phenol used as antioxidant for thermoplastics [38], so it was assumed that its origin was the use of laboratory consumables.

Additional aromatic compounds found in the extracts, such as other phenolics: 4-ethenyl-2-methoxyphenol (4-vinylguaiacol), 4-hydroxybenzaldehyde and 3'-hydroxy-4'-methoxyacetophenone, and non-phenolics: benzoic acid and butyl phthalate are remarkable for their abundance. These compounds have been reported in other works such as those performed by Raj et al. [21], Garrote et al. [13] and Mitchell et al. [36]. The rest of the aromatic compounds were less abundant and were found only in one or two of the extracts analyzed.

5.3.3. Development of a quantification method (HPLC-DAD)

5.3.3.1. Selection of the target compounds

As described in section 5.3.2, different types of organic compounds (potential ABE fermentation inhibitory compounds) were identified in ethyl acetate extracts of hydrolysates.

Regarding phenolic compounds, the strong inhibitory effects that they produce on fermentative microorganisms have been previously described [10,11]. In this way, a chromatographic method to quantify the main phenolics found in hydrolysates could contribute to a better understanding of the fermentation process, increasing its yield. Therefore, the following 12 phenolic compounds: vanillin, 4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, 3-hydroxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, syringaldehyde, *p*-coumaric acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, syringic acid, gallic acid, ferulic acid and caffeic acid, were selected to develop a simple and rapid HPLC-DAD method, since they were the most frequent phenolics identified (GC-MS) in the studied hydrolysates. As can be seen in Table 5.4, those phenolics were found in at least four of the nine agro-food wastes hydrolysates. In addition, caffeine, although it is a xanthine, was also selected since it produced the highest peak in the GC-MS chromatograms of the extracts obtained from CS hydrolysate. Figure 5.1 shows the chemical structure of the selected compounds.

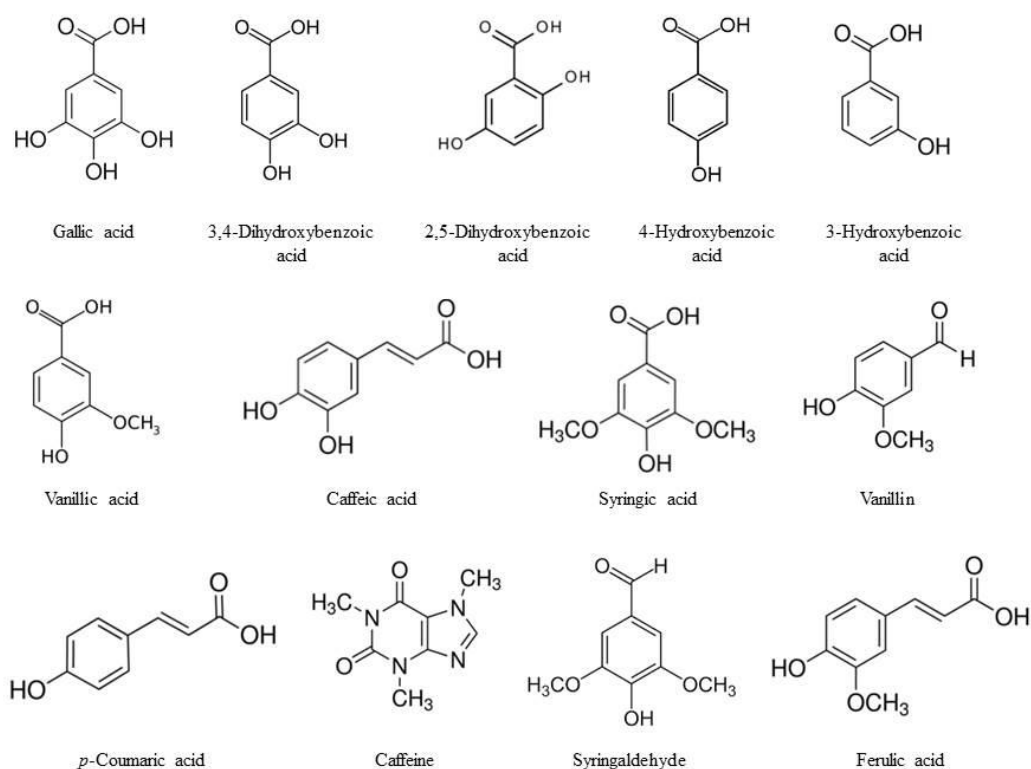


Figure 5.1. Structures of the compounds quantified with the developed HPLC-DAD method.

The determination of some phenolic compounds in different types of biomass hydrolysates using chromatographic methods has been described in other works [5,16,39].

However, no chromatographic method has been reported to determine simultaneously all the phenolic compounds cited above, along with caffeine, in biomass hydrolysates. Besides this, the objective was to develop a simple, fast and robust analytical method to enable the direct injection of the sample in the chromatographic system without performing previous extractions of the target compounds from the samples.

5.3.3.2. Optimization of chromatographic conditions

HPLC-DAD with a C18 column Resolve (Waters, 300 mm x 3.9 mm, 5 μm) was chosen to determine the 13 compounds cited in section 5.3.3.1.

Acetonitrile (as organic modifier) and aqueous acetic acid 1% (v/v) with the pH adjusted to 2.5 by addition H_3PO_4 were assayed as mobile phase to separate those compounds. Mussatto et al. [5] used the same column and mobile phase (with a ratio acetonitrile/aqueous phase 1/8 under isocratic conditions and with a flow rate of 0.9 mL min^{-1}) to determine ferulic and *p*-coumaric acids in alkaline hydrolysate of BSG. However, those conditions did not allow separating all the target compounds studied in this section. Therefore, some isocratic conditions were tested using flow rates from 0.7 to 1.0 ml min^{-1} , acetonitrile percentages in the mobile phase of 5, 6, 7, 8, 9 and 10% and column thermostatization temperatures of 25, 30, 35, 40 and 45 $^\circ\text{C}$. Nevertheless, acceptable separation and satisfactory analysis time could not be obtained in isocratic run. Thereby, the method conditions were optimized to work with a flow rate of 0.9 mL min^{-1} and a gradient run starting with 5% of acetonitrile and 95% aqueous phase for 15 min and then the ratio of acetonitrile increased from 5% to 30% in 13 min. In this point, all the compounds were eluted and the gradient conditions returned to the initial ones in 2 min and the column was conditioned during 5 min. The run time of the chromatogram was 30 min. A variation on elution order of the compounds with the ratio of acetonitrile in the mobile phase was observed. For instance, when the percentage of acetonitrile was 5% in isocratic run, an elution order of syringic acid > caffeine > vanillin > *p*-coumaric acid > syringaldehyde > ferulic acid, and poor resolution was observed. On the other hand, when the gradient flow described above was used, a change for elution time of caffeine was observed, so the elution order was: syringic acid > vanillin > *p*-coumaric > caffeine > syringaldehyde > ferulic acid, with an acceptable resolution. This result indicates that small changes of the method conditions can cause differences in the diffusivity of compounds (caffeine).

Column temperature was an important parameter to reach a proper separation. The resolution of peaks improved when temperature increased from 25 to 35 °C. However, when temperature increased from 35 to 45 °C the resolution decreased, so 35 °C was selected as optimal temperature for the chromatographic method.

A DAD was used to register the UV-VIS spectrum of individual compounds. To get the maximum sensitivity, each compound was detected at its maximum absorption wavelength. In this way, the detection was carried out at four different wavelengths: 235, 254, 276 and 320 nm. Conditions of the HPLC-DAD method are summarized in Table 5.5. Furthermore, retention times and maximum absorption wavelengths of the compounds can be seen in Table 5.6. Two phenolic acids: 2,5-dihydroxybenzoic and 4-hydroxybenzoic, have similar retention times, so their peaks cannot be separated. Nevertheless, those compounds could be quantified on the basis of their maximum absorption wavelength since 2,5-dihydroxybenzoic acid does not absorb at 254 nm nor does 4-hydroxybenzoic acid at 320 nm. Figure 5.2 shows the chromatogram of (S) a standard mixture constituted in water with a concentration of 100 µg mL⁻¹ for each compound and the corresponding four chromatograms of AP, PP, BSG and CS hydrolysates obtained by pretreatment with dilute nitric acid and subsequent enzymatic hydrolysis. Peak identity was confirmed by comparing their retention times and UV-VIS spectrum with reference compounds. All compounds could be identified with no significant interferences from the sample matrix

Table 5.5. Chromatographic conditions of the HPLC-DAD method.

Chromatographic Conditions	
Column	Waters Resolve C18 (300 mm x 3.9 mm, 5 µm)
Mobile Phase Condition	A: Acetonitrile B: Acetic acid 1% (v/v) pH adjusted to 2.5 with H ₃ PO ₄
Gradient Program	95% B isocratic (15 min) 95 – 70 % B (13 min) 70 – 95 % B (2 min) Post Run: 5 min
Flow Rate	0.9 mL min ⁻¹
Column Temperature	35 °C
Injection Volume	20 µL
Wavelength	235, 254, 276, 320 nm

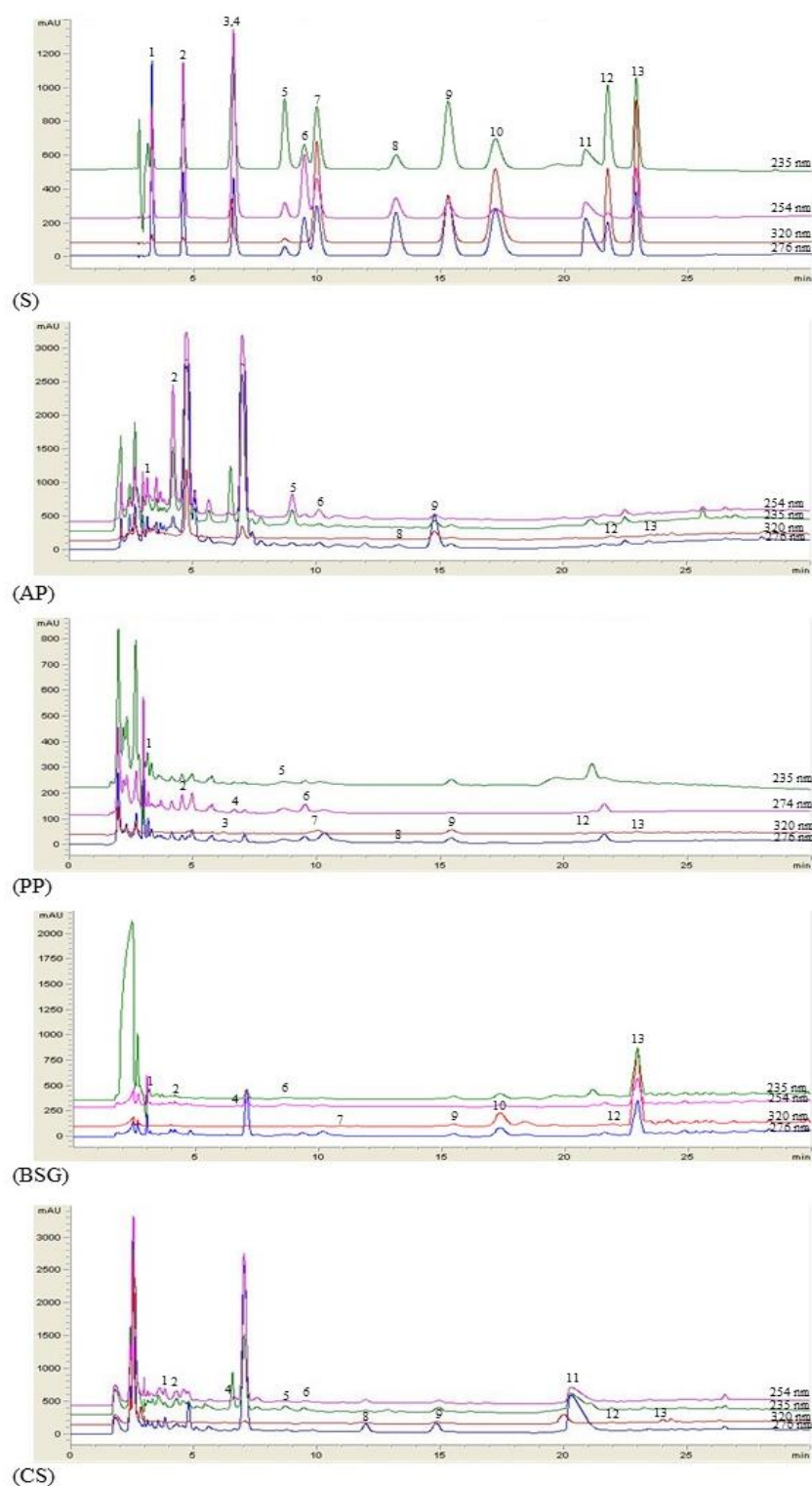


Figure 5.2. Simultaneous HPLC-DAD chromatograms (235, 254, 276 and 320 nm) of reference standards constituted in water (S) and hydrolysates of AP, PP, BSG and CS after a dilute nitric acid pretreatment and a subsequent enzymatic hydrolysis. Peak numbers are the following: (1) gallic acid, (2) 3,4-dihydroxybenzoic acid, (3) 2,5-dihydroxybenzoic acid, (4) 4-hydroxybenzoic acid, (5) 3-hydroxybenzoic acid, (6) vanillic acid, (7) caffeic acid, (8) syringic acid, (9) vanillin, (10) *p*-coumaric acid, (11) caffeine, (12) syringaldehyde, (13) ferulic acid.

5.3.4. Validation of the HPLC-DAD method

The chromatographic method was validated by evaluating linearity range, precision, repeatability, accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

5.3.4.1. Linearity and range

The linearity of the method was evaluated by studying its ability to obtain an analyte response linearly proportional to its concentration in a given range. To determine that parameter, calibration curves were generated by injection in triplicate of standard solutions at eight concentration levels and their square correlation coefficients (R^2) were calculated. As can be seen in Table 5.6, the linearity of the method was good, since the square correlation coefficients obtained varied from 0.9975 to 0.9999 ($R \geq 0.99$ usual value specified in protocols of validation methods). The linear range was 5 – 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for almost all compounds except 3,4-dihydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic and ferulic acids (5 – 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and gallic acid (5 – 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Table 5.6. Retention time, maximum absorption wavelengths and validation parameters for the HPLC-DAD method.

Compound	R.T. (min)	λ_{max} (nm)	L.R. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LI (R^2)	PR (% RSD)	RE (% RSD)	AC (%)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Gallic acid	3.2	276	5 - 200	0.9999	2.19	1.40	97.1	0.1	0.3
3,4-Dihydroxybenzoic acid	4.5	254	5 - 300	0.9982	1.38	1.12	96.7	0.1	0.4
2,5-Dihydroxybenzoic acid	6.6	320	5 - 400	0.9981	1.91	1.33	101.	0.2	0.6
4-Hydroxybenzoic acid	6.7	254	5 - 300	0.9975	2.79	1.92	106.	0.1	0.3
3-Hydroxybenzoic acid	8.6	235	5 - 400	0.9997	2.36	1.24	99.2	0.4	1.3
Vanillic acid	9.4	254	5 - 400	0.9999	0.75	0.45	101.	0.1	0.3
Caffeic acid	10.0	320	5 - 400	0.9999	1.40	0.95	99.6	0.2	0.6
Syringic acid	13.3	276	5 - 400	0.9999	1.41	0.89	101.	0.1	0.3
Vanillin	15.3	276	5 - 400	0.9999	1.73	1.23	100.	0.2	0.4
<i>p</i> -Coumaric acid	17.5	320	5 - 400	0.9999	0.38	0.21	100.	0.2	0.5
Caffeine	21.1	276	5 - 400	0.9999	0.64	0.42	100.	0.1	0.2
Syringaldehyde	21.9	320	5 - 400	0.9999	0.48	0.39	100.	0.1	0.2
Ferulic acid	22.9	320	5 - 300	0.9991	1.54	1.28	98.6	0.1	0.2

R.T.: retention time, λ_{max} : maximum absorption wavelengths, L.R.: linear range, LI: linearity, PR: precision, RE: repeatability, AC: accuracy, LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantification.

5.3.4.2. Accuracy and precision

The precision of the method was evaluated by injecting five times the same sample spiked with three levels of concentration (covering the specific range for each compound) during three consequent days. Repeatability was calculated by analysing ten times the same sample. Both parameters were evaluated by the relative standard deviations (RSDs) and were less than 3% for all the compounds (Table 5.6).

The accuracy of the method was evaluated by the recovery test. In this way, three samples, previously analyzed, were spiked at three concentration levels of the target compounds and were injected by triplicate. The recoveries of the 13 compounds ranged between 96 and 107% (Table 5.6).

5.3.4.3. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

LOD and LOQ were estimated based on a calibration curve calculated for dilute standard solutions, using the formulas $LOD = 3 SD/b$ and $LOQ = 10 SD/b$ (SD, standard deviation of the response; b, slope of the calibration curve), as described in previous literatures [40,41]. As it is shown in Table 5.6, the method allowed the detection of the compounds in the range of 0.1 – 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the quantification in the range of 0.2 – 1.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.3.5. Method application

The developed and validated HPLC-DAD method was applied to determine the concentration of 12 phenolic compounds and caffeine in the AP, PP, BSG and CS hydrolysates in which the identification of compounds with GC-MS was previously carried out. The measured concentrations are shown in Table 5.7. The results showed large variations among feedstocks and pretreatments. In addition, it is important to mention the differences between the sum of the quantified amounts of the compounds for each hydrolysate and the value obtained for TPC using the Folin Denis' assay [20], especially in the case of PP hydrolysates. Those differences could be due to the complexity of the samples that contained an elevated number of phenolic compounds of which only a small number of them have been quantified by HPLC-DAD.

Table 5.7. Phenolic compounds and caffeine quantified in hydrolysates of AP, PP, BSG and CS obtained by pretreatment with chemical reagents and subsequent enzymatic hydrolysis.

Analyte ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AP		PP				BSG		CS	
	HNO ₃	Acetone	PEG 6000	HNO ₃	NH ₄ OH	Methanol	Tween 80	HNO ₃	HNO ₃	
Galic acid	22.9 ± 0.5	7.8 ± 0.1	10.1 ± 0.1	6.2 ± 0.1	3.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0	10.4 ± 0.1	15.8 ± 0.3	10.2 ± 0.2	
3,4-Dihydroxybenzoic acid	217.5 ± 3.0	53.2 ± 0.7	39.2 ± 0.5	6.0 ± 0.1	5.1 ± 0.1	8.9 ± 0.1	11.2 ± 0.1	2.2 ± 0.0	23.2 ± 0.2	
2,5-Dihydroxybenzoic acid	< 0.6	< 0.6	< 0.6	1.4 ± 0.0	2.0 ± 0.0	3.6 ± 0.0	5.4 ± 0.1	< 0.6	< 0.6	
4-Hydroxybenzoic acid	< 0.3	< 0.3	< 0.3	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.0	7.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1	6.2 ± 0.1	9.7 ± 0.2	
3-Hydroxybenzoic acid	53.6 ± 0.7	9.3 ± 0.1	10.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1	< 1.3	1.1 ± 0.0	3.1 ± 0.0	< 1.3	19.4 ± 0.2	
Vanillic acid	10.3 ± 0.1	6.2 ± 0.0	4.3 ± 0.0	9.8 ± 0.1	8.1 ± 0.0	2.3 ± 0.0	14.3 ± 0.1	5.9 ± 0.0	10.4 ± 0.1	
Caffeic acid	< 0.6	< 0.6	< 0.6	2.4 ± 0.0	< 0.6	8.5 ± 0.1	6.2 ± 0.1	1.5 ± 0.0	< 0.6	
Syringic acid	16.3 ± 0.2	8.2 ± 0.1	2.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0	< 0.3	5.1 ± 0.0	8.3 ± 0.1	< 0.3	31.0 ± 0.3	
Vanillin	111.6 ± 1.9	35.8 ± 0.6	59.8 ± 1.0	5.0 ± 0.1	3.1 ± 0.0	1.5 ± 0.0	11.5 ± 0.1	8.1 ± 0.1	34.4 ± 0.5	
<i>p</i> -Coumaric acid	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.0	28.6 ± 0.1	< 0.5	
Caffeine	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2	379.9 ± 1.6	
Syringaldehyde	8.2 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.0	5.1 ± 0.0	< 0.2	0.9 ± 0.0	2.9 ± 0.0	9.8 ± 0.0	6.0 ± 0.0	
Ferulic acid	3.1 ± 0.0	9.3 ± 0.2	10.5 ± 0.2	5.9 ± 0.1	< 0.2	0.8 ± 0.0	2.1 ± 0.0	135.1 ± 1.7	5.9 ± 0.1	

Results are expressed as mean ± standard deviation; n = 3. -: not detected.

5.3.5.1. Apple pomace (AP) hydrolysates

Regarding AP hydrolysates, the predominant compound was 3,4-dihydroxybenzoic acid followed by vanillin, 3-hydroxybenzoic, gallic and syringic acids. The highest amounts of those compounds were found in nitric acid hydrolysate (217.5, 111.6, 53.6, 22.9 and 16.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). These results were not in accordance with those obtained by Parmar et al. [37], who determined chlorogenic, caffeic and ferulic acids as main phenolic compounds in hydrolysates of AP pretreated with dilute sulfuric acid. This difference could be due to the wide variety in the composition of apples (types of apples and cropland).

5.3.5.2. Potato peel (PP) hydrolysates

Respecting PP hydrolysates, the most abundant phenolics were vanillic, 3,4-dihydroxybenzoic, gallic and ferulic acids besides vanillin, with important concentration differences ($\mu\text{g mL}^{-1}$) according to the chemical reagent used in the pretreatment. These results are in agreement with Mader et al. [42], who described those compounds as the main phenolic compounds extracted from PP. The major concentration of vanillic acid (14.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$), vanillin (11.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 3,4-dihydroxybenzoic acid (11.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and gallic acid (10.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were found in the hydrolysate obtained when PP was pretreated with Tween 80, and, in the case of ferulic acid, the highest amount was found in the nitric acid hydrolysate (5.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

5.3.5.3. Brewers' spent grain (BSG) hydrolysates

For dilute nitric acid hydrolysate of BSG the most abundant compounds determined were the acids ferulic (135.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *p*-coumaric (28.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$), gallic (15.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 4-hydroxybenzoic (6.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and vanillic (5.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) together with syringaldehyde (9.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and vanillin (8.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Mussatto et al. [5] studied alkaline hydrolysates of acid pretreated BSG and, compared with the results obtained in this work, they found similar amounts of ferulic, *p*-coumaric, vanillic and 4-hydroxybenzoic acids but higher levels of 4-hydroxybenzoic acid.

5.3.5.4. Coffee silverskin (CS) hydrolysates

In the case of dilute nitric acid hydrolysate of CS, the most abundant compound quantified was caffeine (379.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) followed by vanillin (34.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the acids syringic (31.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 3,4-dihydroxybenzoic (23.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and 3-hydroxybenzoic (19.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The

result of caffeine was higher (38 mg g^{-1}) than that obtained by Bresciani et al. [43] in CS subjected to an extraction with acid water (10 mg g^{-1}). The different treatment and type of coffee could have caused that difference. On the other hand, no results have been found about amounts of individual phenolic compounds from CS.

5.4. Conclusions

In this work, 67 potential inhibitory compounds of ABE fermentation were identified in the hydrolysates of four agro-food wastes (AP, PP, BSG and CS) obtained by different chemical pretreatments (acid, alkaline, organic solvents and surfactants) and subsequent enzymatic hydrolysis. Most of the identified compounds were phenolics but, in addition, other aromatic compounds together with aliphatic acids, nitrogen-containing compounds and fatty acids were found. A relatively simple and fast HPLC-DAD method was developed to quantify caffeine and the most frequent phenolic compounds identified in the hydrolysates (vanillin, syringaldehyde, and gallic, 3,4-dihydroxybenzoic, 2,5-dihydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic, 3-hydroxybenzoic, vanillic, caffeic, syringic, *p*-coumaric and ferulic acids). Furthermore, the analytical method was linear, precise, repeatable, accurate and sensitive and allowed the simultaneous quantification of 13 potential fermentation inhibitory compounds in the agro-food wastes hydrolysates without any previous treatment of the samples.

5.5. Acknowledgements

The present work has been performed as part of the H2020-LCE-2015 Waste2Fuels project (Sustainable production of next generation biofuels from waste streams - Waste2Fuels. GA - 654623), funded by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme. The authors thank Novozymes Denmark for kindly providing samples of their enzymes. MH-V is supported by a postdoctoral contract (DOC-INIA, grant number DOC 2013-010) funded by the Spanish National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) and the European Social Fund. Authors thank R. Ant3n del R3o, N. del Castillo Ferreras and G. Sarmiento Mart3nez for their technical assistance.

5.6. References

- [1] N. Mirabella, V. Castellani, S. Sala, Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review, *J. Clean. Prod.* 65 (2014) 28-41.
- [2] FAOSTAT, Statistics of the food and agriculture organization of the United Nations, 2018 <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (accessed 20 November 2018).
- [3] G.S. Dhillon, S. Kaur, S.K. Brar, Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27 (2013) 789-805.
- [4] D. Arapoglou, T. Varzakas, A. Vlyssides, C. Israilides, Ethanol production from potato peel waste (PPW), *Waste Management* 30 (2010) 1898-1902.
- [5] S.I. Mussatto, G. Dragone, I.C. Roberto, Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain, *Ind. Crops Prod.* 25 (2007) 231-237.
- [6] K.M. Lynch, E.J. Steffen, E.K. Arendt, Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health, *J. Inst. Brew.* 122 (2016) 553-568.
- [7] L.F. Ballesteros, J.A. Teixeira, S.I. Mussatto, Chemical, functional and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin, *Food Bioprocess Technol.* 7 (2014) 3493-3503.
- [8] M. Hijosa-Valsero, A.I. Paniagua-García, R. Díez-Antolínez, Industrial potato peel as a feedstock for biobutanol production, *New Biotechnol.* 46 (2018) 54-60.
- [9] A.I. Paniagua-García, R. Díez-Antolínez, M. Hijosa-Valsero, M.E. Sánchez, M. Coca, Response surface optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for fermentable sugars production, *Chem. Eng. Trans.* 49 (2016) 223-228.
- [10] A.I. Paniagua-García, M. Hijosa-Valsero, R. Díez-Antolínez, M.E. Sánchez, M. Coca, Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: The case of *Panicum virgatum*, *Biomass Bioenerg.* 116 (2018) 131-139.
- [11] L.J. Jönsson, C. Martín, Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, *Bioresour. Technol.* 199 (2016) 103-112.
- [12] C. Luo, D.L. Brink, H.W. Blanch, Identification of potential inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolysate to ethanol, *Biomass Bioenerg.* 22 (2002) 125-138.

- [13] G. Garrote, E. Flaqué, H. Domínguez, J.C. Parajó, Autohydrolysis of agricultural residues: Study of reaction byproducts, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 1951-1957.
- [14] J.J. Fenske, D.A. Griffin, M.H. Penner, Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass hydrolysates, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20 (1998) 364-368.
- [15] H.B. Klinké, B.K. Ahring, A.S. Schmidt, A.B. Thomsen, Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw, *Bioresour. Technol.* 82 (2002) 15-26.
- [16] A. Martínez, M.E. Rodríguez, S.W. York, J.F. Preston, L.O. Ingram, Effects of Ca(OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulosic hydrolysates, *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000) 526-536.
- [17] K. Liu, H.K. Atiyeh, O. Pardo-Planas, K.D. Ramachandriya, M.R. Wilkins, T.C. Ezeji, V. Ujor, R.S. Tanner, Process development for biological production of butanol from eastern redcedar, *Bioresour. Technol.* 176 (2015) 88-97.
- [18] M. Hijosa-Valsero, A.I. Paniagua-García, R. Díez-Antolínez, Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes, *Bioenerg. Biofuels.* 101 (2017) 8041-8052.
- [19] Royal Decree 2257/1994, Official analytical methods of feed or food for animals and their raw materials (in Spanish), *Boletín Oficial del Estado* 52, 2nd March 1995, pp 7161-7237. <https://www.boe.es/boe/dias/1995/03/02/pdfs/A07161-07237.pdf>. (accessed 20 August 2018).
- [20] O. Folin, W. Denis, On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, *J. Biol. Chem.* 12 (1912) 239-243.
- [21] A. Raj, M.M.K. Reddy, R. Chandra, Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) from kraft lignin degradation by three *Bacillus* sp., *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59 (2007) 292-296.
- [22] International Conference on Harmonization (ICH), Validation of analytical procedures: Methodology. Technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use, Geneva, Switzerland, 1996.
- [23] P. Lenihan, A. Orozco, E. O’Neill, M.N.M. Ahmad, D.W. Rooney, G.M. Walker, Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Chem. Eng. J.* 156 (2010) 395-403.
- [24] N.G.T. Meneses, S. Martins, J.A. Teixeira, S.I. Mussatto, Influence of extraction solvents on the

- recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains, *Sep. Purif. Technol.* 108 (2013) 152-158.
- [25] S.I. Mussatto, E.M.S. Machado, S. Martins, J.A. Teixeira, Production, composition, and application of coffee and its industrial residues, *Food Bioprocess Technol.* 4 (2011) 661–672.
- [26] A. Rodríguez-Chong, J.A. Ramírez, G. Garrote, M. Vázquez, Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment, *J. Food Eng.* 61 (2004) 143-152.
- [27] L. Da Costa Sousa, S.P.S. Chundawat, V. Balan, B.E. Dale, "Cradle-to-grave" assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies, *Curr. Opin. Biotechnol.* 20 (2009) 339-347.
- [28] F.M. Gírio, C. Fonseca, F. Carvalheiro, L.C. Duarte, S. Marques, R. Bogel-Lukasik, Hemicelluloses for fuel ethanol: A review, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 4775-4800.
- [29] Q. Qing, B. Yang, C.E. Wyman, Impact of surfactants on pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5941-5951.
- [30] R.A. Silverstein, Y. Chen, R.R. Sharma-Shivappa, M.D. Boyette, J. Osborne, A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 3000-3011.
- [31] S. Naseeruddin, K.S. Yadav, L. Sateesh, A. Manikyam, S. Desai, L.V. Rao, Selection of the best chemical pretreatment for lignocellulosic substrate *Prosopis juliflora*, *Bioresour. Technol.* 136 (2013) 542-549.
- [32] E.P. Dagnino, E.R. Chamorro, S.D. Romano, F.E. Felissia, M.C. Area, Optimization of acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production, *Ind. Crops Prod.* 42 (2013) 363-368.
- [33] N. Ahmad, Y. Zuo, X. Lu, F. Anwar, S. Hameed, Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants, *Food Chem.* 190 (2016) 80-89.
- [34] J. Del Río, P. Prinsen, A. Gutiérrez, Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals, *J. Cereal Sci.* 58 (2013) 248-254.
- [35] L.J. Jönsson, E. Palmqvist, N.O. Nilvebrant, B. Hahn-Hägerdal, Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 (1998) 691-697.

- [36] V.D. Mitchell, C.M. Taylor, S. Bauer, Comprehensive analysis of monomeric phenolics in dilute acid plant hydrolysates, *Bioenerg. Res.* 7 (2014) 654-669.
- [37] I. Parmar, V. Rupasinghe, Optimization of dilute acid-based pretreatment and application of laccase on apple pomace, *Bioresour. Technol.* 124 (2012) 433-439.
- [38] M. Bolgar, J. Hubball, J. Groeger, S. Meronek (Eds),
Handbook for the chemical analysis of plastic and polymer additives, CRC Press Taylor & Francis Group, New York, 2018, (2007025615).
- [39] S.F. Chen, R.A. Mowery, V.A. Castleberry, G.P. van Walsum, C.K. Chambliss, High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 54-61.
- [40] H. Dong, K. Xiao, Y. Xian, Y. Wu, L. Zhu, A novel approach for simultaneous analysis of perchlorate (ClO_4^-) and bromate (BrO_3^-) in fruits and vegetables using modified QuEChERS combined with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 270 (2019) 196-203.
- [41] H. Dong, Y. Xian, K. Xiao, Y. Wu, L. Zhu, Development and comparison of single-step phase extraction and QuEChERS clean-up for the analysis of 7 mycotoxins in fruits and vegetables during storage by UHPLC-MS/MS, *Food Chem.* 274 (2019) 471-479.
- [42] J. Mader, H. Rawel, L.W. Kroh, Composition of phenolic compounds and glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine during commercial potato processing, *J. Agri. Food Chem.* 57 (2009) 6292-6297.
- [43] L. Bresciani, L. Calani, R. Bruni, F. Brighenti, D. Del Rio, Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin, *Food Res. Int.* 61 (2014) 196-201.

Capítulo/Chapter 6

6. Conclusiones y propuestas / Conclusions and proposals

6.1. Conclusiones

En la presente Tesis Doctoral, se ha estudiado el proceso de sacarificación de cinco biomásas lignocelulósicas: *P. virgatum*, bagazo de manzana, piel de patata, bagazo de cerveza y piel de grano de café. Se ha comparado la eficacia de distintos tipos de pretratamientos físico-químicos, seguidos de hidrólisis enzimática, para obtener azúcares fermentables y se ha estudiado la producción de biobutanol a partir de los hidrolizados mediante fermentación ABE con bacterias del género *Clostridium*. Además, se han identificado los diferentes tipos de compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación, que están presentes en los hidrolizados lignocelulósicos, mediante técnicas cromatográficas.

Las principales conclusiones que pueden obtenerse de este trabajo se describen a continuación:

1. Para cada tipo de biomasa lignocelulósica estudiada (*P. virgatum*, bagazo de manzana, piel de patata, bagazo de cerveza y piel de grano de café), se observó que el rendimiento de hidrólisis de azúcares fermentables y la generación de compuestos inhibidores depende fuertemente del pretratamiento físico-químico aplicado. Así, el rendimiento de hidrólisis de *P. virgatum* sometido a un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, a una temperatura constante de 121 °C, seguido de hidrólisis enzimática, depende en gran medida de la concentración de ácido, y presenta una dependencia menos significativa de la carga de sólido y del tiempo de hidrólisis. En el caso de los residuos agroalimentarios previamente citados, para cada uno de ellos, el rendimiento de hidrólisis depende del agente químico utilizado en el pretratamiento cuando es realizado bajo idénticas condiciones de temperatura y tiempo (121 °C, 2 h). Así, los resultados muestran que los mayores rendimientos de hidrólisis corresponden a los pretratamientos en los que se utilizaron ácidos diluidos en el caso de bagazo de manzana (75,3 – 87,1%), bagazo de cerveza (75,1 – 76,7%) y piel del grano de café (57,3 – 64,3%). Sin embargo, en el caso de la piel de patata, los rendimientos de hidrólisis de los distintos agentes químicos utilizados en el pretratamiento (ácidos, bases, solventes orgánicos y compuestos surfactantes), no mostraron diferencias tan significativas (58,3 – 68,8%). Por lo tanto, con estos ensayos se puede concluir que, para aumentar la eficiencia del proceso de hidrólisis de cada tipo de biomasa, es necesario seleccionar el agente químico más adecuado y optimizar las condiciones del pretratamiento.

2. La metodología de superficie de respuesta (RSM) es un método eficaz para optimizar las variables de operación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido de *P. virgatum* y predecir, de esta manera, un rendimiento máximo de hidrólisis de azúcares fermentables y una concentración de compuestos inhibidores que no afecte a la etapa siguiente de fermentación ABE con *Clostridium* sp. Así, los valores óptimos para las variables de operación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido de *P. virgatum* fueron: 10% (p/p) de carga de biomasa, 1,72% (p/p) de concentración de ácido sulfúrico y 112,0 min de tiempo de hidrólisis a 121 °C. Bajo estas condiciones se alcanzó una recuperación máxima de azúcares de 502,2 mg g⁻¹ (78,8% rendimiento de hidrólisis) con una generación de compuestos inhibidores totales de 42,9 mg g⁻¹ (calculados como la suma de ácido acético, ácido levulínico, 5-HMF, furfural y compuestos fenólicos totales).

3. Se demostró la viabilidad de la producción de biobutanol a partir del hidrolizado ácido hemicelulósico de *P. virgatum*. Se seleccionó la cepa *C. beijerinckii* CECT 508, entre ocho cepas silvestres de *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii*, por ser la más eficiente para producir butanol a partir de dicho hidrolizado. Para maximizar la producción de biobutanol a partir de los hidrolizados lignocelulósicos, la selección de la cepa bacteriana más adecuada es un punto clave del proceso.

4. En cuanto al efecto inhibitor producido por los compuestos presentes en el hidrolizado ácido de *P. virgatum* sobre la fermentación ABE realizada por *C. beijerinckii* CECT 508, se ha establecido el siguiente orden: ácido acético > compuestos fenólicos > sulfatos > furfural, mientras que el 5-HMF y el ácido levulínico no mostraron efecto inhibitor cuando estaban presentes en el medio de fermentación en concentración de 0,20 g L⁻¹ y 0,30 g L⁻¹, respectivamente. Así, se ha observado que concentraciones de ácido acético, compuestos fenólicos totales y sulfatos superiores a 3,30 g L⁻¹, 1,00 g L⁻¹ y 16,90 g L⁻¹, respectivamente, ejercen un fuerte efecto inhibitor de la fermentación ABE llevada a cabo por *C. beijerinckii* CECT 508.

5. La fermentación ABE del hidrolizado ácido de *P. virgatum* (sin tratamiento previo de detoxificación) realizada por *C. beijerinckii* CECT 508 produjo 4,00 ± 0,71 g L⁻¹ de butanol (rendimiento 0,184 ± 0,032 g g⁻¹ y productividad 0,033 ± 0,006 g L⁻¹ h⁻¹) y 4,70 ± 0,91 g L⁻¹ de ABE (rendimiento 0,216 ± 0,041 g g⁻¹ y productividad 0,039 ± 0,008 g L⁻¹ h⁻¹) a las 120 h de fermentación. La detoxificación previa del hidrolizado mediante evaporación, detoxificación con cal o adsorción con carbón activo, no mejoró la fermentación ABE del

hidrolizado. Este resultado confirma que una adecuada selección de las condiciones de pretratamiento, que maximicen la concentración de azúcares fermentables y minimicen la concentración de inhibidores totales en el medio, además de una correcta selección de la cepa bacteriana, acorde con la composición del medio, evita la necesidad de una etapa de detoxificación previa a la fermentación ABE de *P. virgatum*.

6. Se identificó, mediante GC-MS/MS, la presencia de sesenta y siete compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación ABE en los hidrolizados de cuatro residuos de la industria agroalimentaria (bagazo de manzana, piel de patata, bagazo de cerveza y piel de grano de café), obtenidos mediante diferentes pretratamientos físico-químicos (basados en el uso de ácidos, álcalis, solventes orgánicos y compuestos surfactantes), seguidos de una hidrólisis enzimática. La mayoría de los compuestos identificados fueron compuestos fenólicos, pero también se identificaron ácidos alifáticos, compuestos nitrogenados y ácidos grasos. Así, se observó que los compuestos potencialmente inhibidores más abundantes en los hidrolizados de bagazo de manzana son la vainillina y los ácidos 3,4-dihidroxibenzoico y 3-hidroxibenzoico, mientras que en los de piel de patata son los ácidos vainílico, gálico y 3,4-dihidroxibenzoico. En los hidrolizados de bagazo de cerveza, los ácidos ferúlico, *p*-cumárico y gálico y en los de piel de grano de café la cafeína, vainillina y los ácidos siríngico, 3,4-dihidroxibenzoico y 3-hidroxibenzoico fueron los compuestos mayoritarios. Así, a partir de los resultados obtenidos se confirma que la naturaleza del residuo lignocelulósico y el tipo de pretratamiento aplicado condicionan la presencia de compuestos inhibidores (tipo y concentración) en los hidrolizados.

7. Se desarrolló y validó un método cromatográfico mediante HPLC-DAD para cuantificar cafeína y los compuestos fenólicos predominantes (vainillina, siringaldehído y los ácidos: gálico, 3,4-dihidroxibenzoico, 2,5-dihidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico, 3-hidroxibenzoico, vainílico, cafeico, siríngico, *p*-cumárico y ferúlico) identificados en los hidrolizados de los cuatro residuos agroindustriales indicados en la Conclusión 6. Para ello se empleó una columna C18 Resolve a 35 °C, elución en gradiente con una fase móvil de composición acuosa [pH 2,5, 1% (v/v) ácido acético] y acetonitrilo, a un flujo de 0,9 mL min⁻¹ y detección a cuatro longitudes de onda (235, 254, 276 y 320 nm). Así, el método analítico desarrollado es lineal, preciso, repetible y sensible y permite cuantificar simultáneamente los trece compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación ABE, sin necesidad de realizar un tratamiento previo de la muestra.

Como conclusión general de la Tesis Doctoral es preciso destacar que, para cada biomasa lignocelulósica, la selección del tipo y las condiciones del pretratamiento es una etapa crucial en el aumento de la rentabilidad de la producción de butanol mediante fermentación ABE, ya que condiciona tanto la concentración de azúcares fermentables obtenida en el hidrolizado, como la cantidad y tipo de los compuestos inhibidores presentes. Además, es también fundamental la selección de una cepa productora de butanol adecuada para cada hidrolizado.

6.2. Propuestas

El trabajo futuro debe estar dirigido a hacer que el proceso industrial de producción de biobutanol sea económicamente rentable mediante la integración de las etapas del proceso y la mejora de los microorganismos fermentativos. Para ello, se proponen las siguientes líneas de investigación que deberían abordarse en el futuro, a partir de las conclusiones establecidas en este trabajo:

1. Trabajar en la obtención de enzimas con mayor actividad para incrementar los rendimientos de hidrólisis de azúcares y desarrollar procesos que permitan su recuperación, una vez finalizada la hidrólisis enzimática, de modo que se pueda abaratar el proceso de obtención de butanol por vía fermentativa.
2. Desarrollar y optimizar procesos integrados de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea que permitan alcanzar adecuadas recuperaciones de azúcares fermentables y altos rendimientos de producción de butanol.
3. Diseñar y/o mejorar reactores industriales para trabajar con sistemas integrados de fermentación y recuperación in situ de solventes, de modo que se puedan mejorar el rendimiento y la productividad de butanol y obtener concentraciones de solventes lo suficientemente elevadas para que el proceso bioquímico sea competitivo con la ruta petroquímica convencional.
4. Trabajar en la evolución adaptativa y la mejora genética de los microorganismos para lograr que sean tolerantes a altas concentraciones de producto y de compuestos inhibidores.

6.3. Conclusions

In this doctoral thesis, the saccharification process of five lignocellulosic biomasses has been studied: *P. virgatum*, apple pomace, potato peel, brewers' spent grains and coffee silverskin. The efficiency of different types of physicochemical pretreatments, followed by enzymatic hydrolysis, to obtain fermentable sugars has been compared and the production of biobutanol from hydrolysates by ABE fermentation with *Clostridium* has been studied. In addition, the different types of potentially fermentation inhibitor compounds, which are present in lignocellulosic hydrolysates, have been identified by chromatographic techniques.

The main conclusions that can be drawn from this work are described below:

1. For each type of studied lignocellulosic biomass (*P. virgatum*, apple pomace, potato peel, brewers' spent grains and coffee silverskin), the fermentable sugars hydrolysis yield and the generation of inhibitory compounds depends strongly on the physicochemical pretreatment performed. Thus, the hydrolysis performance of *P. virgatum* subjected to a pretreatment with dilute sulfuric acid, at a constant temperature of 121 °C, followed by enzymatic hydrolysis, depends largely on the acid concentration, and has a less significant dependence on the solid load and hydrolysis time. In the case of the abovementioned agro-food wastes, for each of them, the hydrolysis performance depended on the chemical reagent used in the pretreatment when it was performed under the same conditions of temperature and time (121 °C, 2 h). Thus, the results show that the highest hydrolysis yields are for dilute acid pretreatments in the case of apple pomace (75.3 - 87.1%), brewers' spent grains (75.1 - 76.7%) and coffee silverskin (57.3 - 64.3%). However, the hydrolysis yields of potato peel subjected to the pretreatment with different chemical reagents (acids, alkalis, organic solvents and surfactant compounds) showed no significant differences among pretreatments (58.3 - 68.8 %). Therefore, with these tests it can be concluded that, in order to increase the efficiency of the hydrolysis process of each type of biomass, it is necessary to select the most suitable chemical agent and optimize the pretreatment conditions.

2. Response surface methodology (RSM) is an effective method to optimize the operation variables of dilute sulfuric acid pretreatment of *P. virgatum* to predict the maximum total fermentable sugars yield and a concentration of total inhibitors that does not affect the subsequent ABE fermentation with *Clostridium* sp. Thus, the optimal values

for the operation variables of the dilute sulfuric acid pretreatment of *P. virgatum* were: 10% (w/w) biomass load, 1.72% (w/w) sulfuric acid concentration and 112.0 min hydrolysis time at 121 °C. Under these conditions, a maximum total sugar recovery of 502.2 mg g⁻¹ (78.8% hydrolysis yield) with a generation of total inhibitory compounds of 42.9 mg g⁻¹ (calculated as the sum of acetic acid, levulinic acid, 5-HMF, furfural and total phenolic compounds), were obtained.

3. The viability of biobutanol production from hemicellulosic acid hydrolysate of *P. virgatum* was demonstrated. *C. beijerinckii* CECT 508 was selected, among eight wild strains of *C. acetobutylicum* and *C. beijerinckii*, as the most efficient to produce butanol from that hydrolysate. To maximize the production of biobutanol from lignocellulosic hydrolysates, the selection of the most suitable bacterial strain is a key point of the process.

4. The major effects of inhibitory compounds from the acid hydrolysate of *P. virgatum* on ABE fermentation by *C. beijerinckii* CECT 508, can be ordered as follows: acetic acid > phenolic compounds > sulfates > furfural, while 5-HMF and levulinic acid showed no inhibitory effect when their concentration in the fermentation medium were 0.20 g L⁻¹ and 0.30 g L⁻¹, respectively. Thus, it has been observed that concentrations of acetic acid, total phenolic compounds and sulfates greater than 3.30 g L⁻¹, 1.00 g L⁻¹ and 16.90 g L⁻¹, respectively, cause a strong inhibitory effect on the ABE fermentation carried out by *C. beijerinckii* CECT 508.

5. ABE fermentation of acid hydrolysate of *P. virgatum* (without previous detoxification treatment) by *C. beijerinckii* CECT 508 produced 4.00 ± 0.71 g L⁻¹ butanol (yield 0.184 ± 0.032 g g⁻¹). Detoxification of the hydrolysate based on evaporation, overliming or activated charcoal adsorption, did not improve ABE fermentation of the hydrolysate. This result confirms that an adequate selection of pretreatment conditions, which maximize the concentration of fermentable sugars and minimize the concentration of total inhibitory compounds in the medium, in addition to a correct selection of the bacterial strain, according to the medium composition, avoids a detoxification step previous to the ABE fermentation of *P. virgatum*.

6. Sixty-seven potential inhibitory compounds of ABE fermentation were identified, by GC-MS/MS, in the hydrolysates of four industrial agro-food wastes (apple

pomace, potato peel, brewers' spent grains and coffee silverskin) obtained by different physicochemical pretreatments (acids, alkalis, organic solvents and surfactant compounds) followed by enzymatic hydrolysis. Most of the identified compounds were phenolic compounds, but alifatic acids, nitrogen-containing compounds and fatty acids were also identified. Thus, it was observed that the most abundant potential inhibitory compounds in apple pomace hydrolysates were vanillin and 3,4-dihydroxybenzoic and 3-hydroxybenzoic acids, while in potato peel hydrolysates were vanillic, gallic and 3,4-dihydroxybenzoic acid. In brewers' spent grains hydrolysates, ferulic, *p*-coumaric and gallic acids and in those of coffee silverskin, caffeine, vanillin and syringic, 3,4-dihydroxybenzoic and 3-hydroxybenzoic acids were the majority compounds. Thus, from the results obtained, it is confirmed that the nature of the lignocellulosic residue and the type of pretreatment applied determine the presence of inhibitory compounds (type and concentration) in the hydrolysates.

7. A chromatographic method, by HPLC-DAD, was developed and validated to quantify caffeine and the predominant phenolic compounds (vanillin, syringaldehyde and gallic, 3,4-dihydroxybenzoic, 2,5-dihydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic, 3-hydroxybenzoic, vanillic, caffeic, syringic, *p*-coumaric and ferulic acids) identified in the hydrolysates of the four agro-food wastes cited in Conclusion 6. For that purpose, a C18 Resolve chromatographic column was used, at 35 °C, under gradient elution with a mobile phase of aqueous composition [pH 2.5, 1% (v/v) acetic acid] and acetonitrile, with a flow rate of 0.9 mL min⁻¹ and detection at four different wavelengths (235, 254, 276 and 320 nm). Thus, the developed analytical method is linear, precise, repeatable and sensitive and allows the simultaneous quantification of thirteen potential fermentation inhibitory compounds, without any previous treatment of the samples.

As the main conclusion of this Doctoral Thesis, it should be noted that, for each lignocellulosic biomass, the selection of the type and conditions of pretreatment is a crucial step to increase the profitability of butanol production by ABE fermentation, since it affects both the concentration of fermentable sugars and the amount and type of the inhibitory compounds released in the hydrolysates. In addition, for each type of hydrolysate, the selection of a suitable butanol producing strain is also essential.

6.4. Proposals

Future work should be focused on making the industrial process of biobutanol production economically profitable by integrating the stages of the process and improving fermentative microorganisms. Therefore, based on the conclusions established in this work, the following lines of research are proposed to be developed in the future:

1. To work on obtaining enzymes with greater activity to increase the sugar hydrolysis yields and to develop processes that allow their recovery, when the enzymatic hydrolysis is finished, so that butanol production by fermentation can be economically cheaper.
2. To develop and to optimize integrated processes of enzymatic hydrolysis and fermentation that allow achieving adequate recoveries of fermentable sugars and high butanol production yields.
3. To design and/or to improve industrial reactors to work with integrated systems of fermentation and in situ solvent recovery, so that butanol yield and butanol productivity can be improved and solvent concentrations can be increased enough to make the biochemical process as competitive as the conventional petrochemical route.
4. To work on the adaptive evolution and genetic improvement of microorganisms to make them tolerant to high concentrations of products and inhibitory compounds.

7. Anexos

Anexo I: *Panicum virgatum*

7.1. Preparación de hidrolizados

Descripción de la biomasa

Los ejemplares de *Panicum virgatum*, variedad *Álamo* (Figura 7.1), se cultivaron en Valladolid (España) en una parcela experimental del ITACyL (Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León), y se cosecharon a principios de noviembre de 2013. Las muestras de *P. virgatum* se secaron a 45 °C durante 48 h, en una estufa de ventilación forzada modelo Digitronic (Selecta, Barcelona, España), se picaron en un molino rotativo modelo SM100 (Retsch GmbH, Haan, Alemania) y se tamizaron a un tamaño de partícula comprendido entre 0,5 y 1,0 mm. El material picado y tamizado se conservó en recipientes cerrados a temperatura ambiente hasta que fue usado en los experimentos.



Figura 7.1. Cultivo de *P. virgatum* en la parcela experimental del ITACyL.

Pretratamiento ácido

Las muestras de *P. virgatum* fueron sometidas a pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, en tres concentraciones diferentes: 0,5%, 1,0% y 1,5% (p/p), en botellas de vidrio de 500 mL dentro de un autoclave a 121°C y 15 psi de presión, durante tiempos de 30, 60 y

90 min. En todos los casos se partió de 10,0 g de biomasa y se añadió el peso suficiente de ácido sulfúrico diluido para obtener tres cargas de sólido diferentes: 10,0%, 17,5% y 25,0% (p/p). Las diferentes combinaciones de concentración de ácido, carga de sólido y tiempo de pretratamiento fueron definidas mediante un diseño experimental rotativo central compuesto (CCRD) siguiendo la metodología de superficie de respuesta (RSM), descrita en el apartado 7.3 de este Anexo.

Después de ser tratadas las muestras en autoclave, se dejaron enfriar y se separó el residuo sólido del hidrolizado mediante filtración a vacío, utilizando un matraz con un embudo Büchner y filtros de celulosa de 90 mm de diámetro modelo 1238 (Filter Lab, Barcelona, España). Se midió el volumen del hidrolizado recuperado en el filtrado y se tomó una muestra del mismo para determinar la concentración de azúcares (xilosa, glucosa y arabinosa) y de compuestos inhibidores (ácido acético, ácido levulínico, 5-HMF y furfural) generados en el pretratamiento. Los análisis de estos compuestos se hicieron con un HPLC modelo 1200 de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) con detector RID modelo G1362A (Agilent Technologies) siguiendo el procedimiento descrito por NREL (2008a). El residuo sólido filtrado se lavó con agua dos veces. El primer lavado se hizo con 200 mL de agua (relación 1:20 respecto al peso inicial de biomasa utilizada en cada ensayo de pretratamiento), que se añadió desde la botella de vidrio (con el fin de arrastrar las partículas sólidas que quedaban en la botella) a la biomasa retenida en el filtro. Se midió el volumen del primer lavado y se tomó una muestra del mismo para determinar la concentración de azúcares e inhibidores en el agua de lavado, siguiendo el mismo procedimiento utilizado con el hidrolizado. De este modo, se pudo calcular la cantidad total de azúcares hidrolizados y de inhibidores generados y así poder evaluar el rendimiento de azúcares liberados en el pretratamiento. Para terminar, se hizo un segundo lavado del sólido retenido en el filtro con un volumen de agua adecuado para conseguir que el pH del filtrado estuviera comprendido entre 5 y 6. Para este control se utilizaron tiras indicadoras de pH.

El residuo sólido lavado se secó en una estufa de ventilación forzada (Selecta) a 45 °C durante 48 horas y se guardó en contenedores de plástico a temperatura ambiente hasta ser sometido a hidrólisis enzimática. Además, todos los sólidos pretratados fueron analizados químicamente para estudiar cómo afectaron las variables del pretratamiento en la composición de la biomasa.

Efecto de las variables del pretratamiento sobre *P. virgatum*

La biomasa, después de ser sometida a los distintos ensayos de pretratamiento con ácido sulfúrico, fue analizada para ver los efectos que produjeron las variables estudiadas (concentración de ácido, carga de biomasa y tiempo de tratamiento en un autoclave a 121 °C) en su composición. Así, se determinó el contenido en cenizas (NREL, 2008b) y glucano, xilano, arabinano, lignina insoluble en ácido (AIL) o lignina Klason y lignina soluble en ácido (ASL) (NREL, 2012). En la Tabla 7.1 se recogieron los resultados, en % (p/p), que se obtuvieron para los mencionados parámetros, junto con los valores de las variables del pretratamiento y factores de severidad (SF) asociados a cada ensayo.

Como puede verse en la Tabla 7.1, los ensayos con condiciones de pretratamiento más suaves (SF menores) produjeron biomasa pretratada con porcentajes mayores de hemicelulosa (suma de xilano y arabinano) y de ASL, lo que justifica que el ataque y disolución de la hemicelulosa y lignina (que se lleva a cabo en la etapa de pretratamiento ácido) es menor bajo condiciones más suaves, y, por lo tanto, los porcentajes de glucano, AIL y cenizas fueron más bajos, ya que estos porcentajes disminuyen al aumentar los porcentajes de los constituyentes anteriormente mencionados. Se observó también que, para ensayos con el mismo valor de SF, pero con valores diferentes de las variables independientes, se producen diferencias en cuanto a la composición físico-química de la biomasa pretratada. Así, los experimentos número 3 y 19, a pesar de tener idéntico valor de SF (1,1), reflejan diferencias significativas en cuanto a su composición. De esta manera, los contenidos en xilano, arabinano y ASL de la biomasa sometida a las condiciones de pretratamiento del ensayo número 3 son menores que los correspondientes de la biomasa sometida a las condiciones del ensayo número 19, y por lo tanto, los contenidos en glucano, AIL y cenizas son mayores para la biomasa pretratada bajo las condiciones del ensayo número 3. La explicación para la diferencia en la composición de ambas biomasa pretratadas hay que buscarla en los valores de las variables independientes de los pretratamientos. Ambos ensayos se realizaron con idénticos valores de concentración de ácido y de tiempo de pretratamiento (0,5% y 30 min) pero con distintos valores de carga de sólido (10% para el ensayo número 3 y 25% para el ensayo número 19), lo que indica una relación inversamente proporcional entre la carga de sólido y el ataque y disolución de la hemicelulosa y de la lignina. Este efecto también se comprobó al comparar los experimentos número 5 y 17.

Tabla 7.1. Valores de las variables del pretratamiento de cada ensayo, factor de severidad (SF) y caracterización del *P. virgatum* pretratado.

Ensayos	Ácido (%)	Biomasa (%)	Tiempo (min)	SF	Glucano (%)	Xilano (%)	Arabinano (%)	AIL (%)	ASL (%)	Cenizas (%)
1	1,5	25,0	30,0	1,58	46,05	9,44	0,44	29,12	2,39	5,91
2	1,0	17,5	60,0	1,71	45,36	8,48	0,44	29,80	2,20	6,37
3	0,5	10,0	30,0	1,10	42,04	13,27	0,87	27,34	2,39	6,50
4	1,0	17,5	60,0	1,71	47,20	9,01	0,66	28,27	1,66	6,51
5	0,5	10,0	90,0	1,58	44,15	9,20	0,66	30,42	2,10	6,28
6	1,0	17,5	9,6	0,91	44,53	12,91	0,88	25,77	2,64	5,33
7	1,0	17,5	60,0	1,71	47,41	8,49	0,44	30,08	1,69	6,92
8	1,0	17,5	110,5	1,97	50,31	7,47	0,44	29,27	2,20	6,93
9	1,0	30,1	60,0	1,71	44,50	11,81	0,88	27,51	1,82	6,58
10	1,5	10,0	30,0	1,58	44,56	7,01	0,44	30,56	2,04	6,26
11	1,5	10,0	90,0	2,06	47,64	5,27	0,44	32,24	2,00	5,94
12	1,8	17,5	60,0	1,97	50,08	6,12	0,44	32,28	1,64	7,08
13	1,0	17,5	60,0	1,71	47,98	8,73	0,44	29,18	1,70	6,69
14	1,0	17,5	60,0	1,71	46,53	8,79	0,44	30,41	2,33	6,46
15	1,5	25,0	90,0	2,06	49,79	7,46	0,44	29,83	2,29	6,06
16	0,2	17,5	60,0	0,91	31,61	20,16	1,53	20,9	3,33	5,02
17	0,5	25,0	90,0	1,58	41,11	15,73	0,87	23,56	2,74	5,46
18	1,0	4,9	60,0	1,71	49,36	7,46	0,66	30,19	1,88	6,25
19	0,5	25,0	30,0	1,10	33,08	17,26	1,31	22,71	2,90	5,60

Los porcentajes están expresados en masa (% p/p).

Hidrólisis enzimática

Los residuos sólidos pretratados fueron sometidos a hidrólisis enzimática en unas condiciones favorables (carga de sólido baja) para poder analizar el efecto que tienen las variables de operación del pretratamiento (carga de biomasa, concentración de ácido y duración del pretratamiento en un autoclave a 121 °C) en la hidrólisis posterior del sólido realizada por enzimas.

Los enzimas utilizados fueron la celulasa Novozyme 50013 (actividad enzimática 70 FPU g⁻¹ y densidad 1,20 g mL⁻¹) y la β-glucosidasa Novozyme 50010 (actividad enzimática 250 CBU g⁻¹ y densidad 1,24 g mL⁻¹), ambos suministrados por Novozymes (Bagsvard, Dinamarca). Las actividades enzimáticas y densidades fueron proporcionadas por el proveedor. Una unidad internacional de papel de filtro (FPU) se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de glucosa por minuto durante la reacción de hidrólisis. Una unidad de celobiosa (CBU) se

define como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de de celobiosa por minuto durante la reacción de hidrólisis.

Los ensayos de hidrólisis enzimática se realizaron con 1,0 g de la biomasa pretratada en matraces Erlenmeyer de 50 mL a los que se les añadieron 33 mL de buffer de citrato de sodio 50 mM a pH 4,8 y 10 mM de azida de sodio para inhibir la contaminación bacteriana. De este modo, se trabajó con una carga de sólido del 3% (p/v). Las dosis de enzimas utilizadas fueron de 300 μL de celulosa NS50013 y 80 μL de β -glucosidasa NS50010 (25,2 FPU g^{-1} de biomasa pretratada y 24,8 CBU g^{-1} de biomasa pretratada, respectivamente). Los matraces se taparon con tapón de goma y fueron introducidos en un agitador orbital Infors HT Minitrom (Infors AG, Bottmingen, Suiza) a 50 °C con una agitación de 150 rpm durante 48 horas.

Para fijar el tiempo de hidrólisis, se realizaron unos ensayos previos en las condiciones de hidrólisis descritas, y se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 h para analizar la concentración de azúcares sencillos en el medio. Se observaron grandes diferencias en la concentración de azúcares en el medio de hidrólisis entre las muestras analizadas a las 24 h y a las 48 h, pero apenas se observaron diferencias entre las correspondientes a las 48 h y a las 72 h, por lo que se decidió fijar como tiempo de hidrólisis del experimento 48 h.



Figura 7.2. Filtración a vacío de los hidrolizados de *P. virgatum*.

Transcurrido el tiempo de hidrólisis enzimática, los matraces se retiraron del agitador orbital y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. A continuación, se siguió el

procedimiento de filtración (Figura 7.2) y lavado del sólido retenido en el filtro (con 20 mL de agua) que se ha descrito en el apartado 7.1.2 (Pretratamiento ácido). Se midieron los volúmenes del filtrado y del agua de lavado y se cogieron muestras de ambos para determinar, mediante HPLC-RID, la concentración de azúcares hidrolizados (glucosa, xilosa y arabinosa).

Para calcular el rendimiento de recuperación de azúcares (Ecuación 1) en los experimentos realizados bajo los distintos valores de las variables de operación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, se sumaron los mg de azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa) recuperados en el hidrolizado obtenido por el pretratamiento de la biomasa, en el agua de lavado del sólido pretratado, en el hidrolizado obtenido mediante la hidrólisis enzimática y en el agua de lavado del sólido hidrolizado enzimáticamente. Los mg de glucano, mg de xilano y mg de arabinano se corresponden con los determinados en la biomasa sin tratar.

$$Rto\ de\ azúcares\ (\%) = \frac{100 * (mg\ glucosa + mg\ xilosa + mg\ arabinosa)}{1,111 * mg\ glucano + 1,136 * mg\ xilano + 1,136 * mg\ arabinano} * 100 \quad (1)$$

7.2. Microscopía electrónica de barrido.

La microscopía electrónica de barrido (MEB) se basa en el principio de la microscopía óptica en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones. De este modo, se consiguen hasta 100 Å de resolución, lo cual es muy superior a cualquier instrumento óptico. Su funcionamiento consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre la muestra. La muestra (salvo que ya sea conductora) está generalmente recubierta de una capa muy fina de oro o carbón, lo que le otorga propiedades conductoras. De cara a la preparación de las muestras para MEB, debe tenerse en cuenta el hecho de que la información microscópica va a obtenerse de la superficie de la muestra, tanto durante la manipulación, de cara a evitar posibles alteraciones, como en la limpieza previa de todos los artefactos que pudiera haber sobre la misma. Es importante tener cuidado de que la muestra esté siempre cubierta en medio líquido, ya que las superficies sensibles se dañan fácilmente si se exponen momentáneamente al aire.

Se prepararon tres tipos de muestras de *P. virgatum* para obtener las imágenes de MEB y poder observar los cambios estructurales producidos. Tanto la preparación de las muestras

como la obtención de las imágenes se realizaron en el Laboratorio de Microscopía de la Universidad de León (León, España). Las muestras analizadas mediante MEB fueron:

- *P. virgatum* sin tratar: preparado según apartado 7.1.1 (Descripción de la biomasa).
- *P. virgatum* pretratado: preparado según el apartado 7.1.2 (Pretratamiento). Las variables de operación elegidas para realizar el pretratamiento fueron: 10% (p/p) de carga de biomasa, 1,72% (p/p) de ácido sulfúrico en agua y 112,0 min de tratamiento en un autoclave a 121 °C (punto óptimo). Véase el apartado 3.3.4 (Optimization and response surface plots).
- *P. virgatum* después de hidrólisis enzimática: preparado según apartado 7.1.3 (Hidrólisis enzimática). Como en el caso de las dos muestras anteriores, el sólido retenido en el filtro se secó en estufa de ventilación forzada (Selecta) a 45 °C durante 48 h.

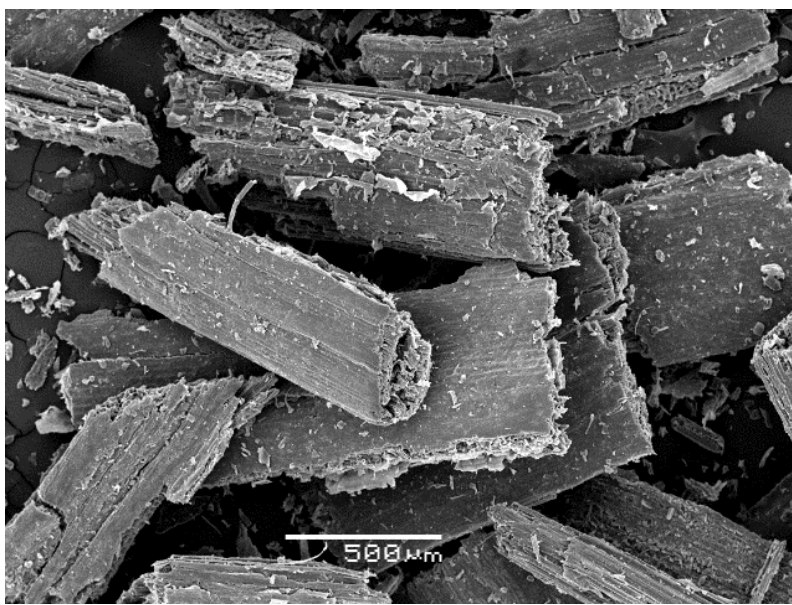
Preparación de las muestras

El proceso de preparación de las muestras para MEB consistió en dos etapas:

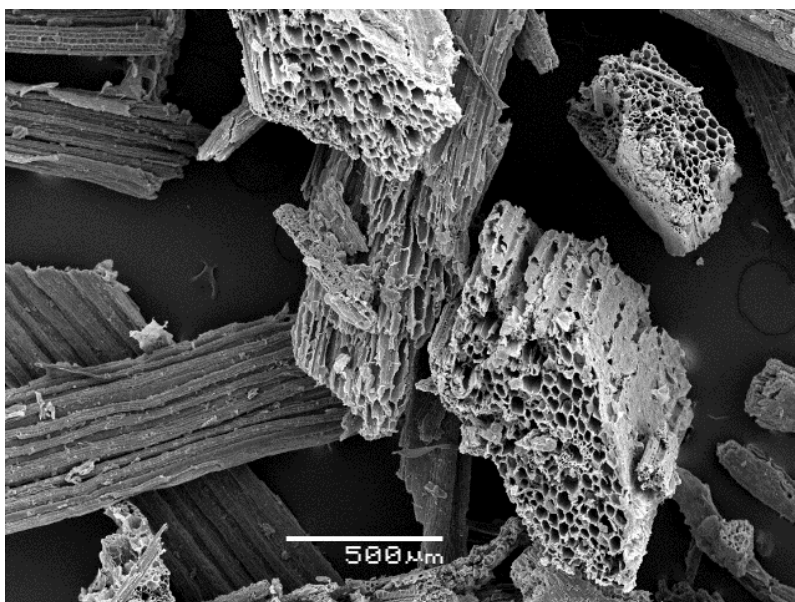
1. Secado de las muestras. Las condiciones de alto vacío a las que van a ser sometidas las muestras en el interior del MEB hacen necesario el completo secado de las mismas. Se requiere un método que permita la eliminación de la humedad de la muestra a la vez que preserve su estructura. Esto se consigue mediante el método del punto crítico, que consiste en someter a la muestra a unos valores de presión y temperatura a partir de los cuales la densidad del gas de un elemento o compuesto es la misma que la del líquido. Es decir, se pasa de fase líquida a gaseosa sin límites visibles y sin fuerzas de distorsión. Para ello se requiere intercambiar la humedad residual de la muestra por un líquido en el que se alcance fácilmente el punto crítico: el CO₂ (31 °C y 73,8 bares). Se realizó utilizando un desecador de punto crítico modelo CPD 030 de BAL-TEC Inc. (Principado de Liechtenstein). Estas muestras desecadas son muy higroscópicas, por lo que se realizó su recubrimiento metálico inmediatamente.
2. Recubrimiento metálico. Las superficies de las muestras que se van a observar en el MEB deben ser conductoras eléctricas a fin de evitar la formación de cargas que perturben la imagen y para obtener una mejor emisión de electrones secundarios, fundamentales para la formación de las características imágenes con alta plasticidad tridimensional. Para ello, las piezas se montaron previamente con una cola conductora sobre soportes cilíndricos

metálicos adecuados para introducir en el MEB. Se creó una superficie conductora utilizando un aparato de pulverización modelo SCD 004 (BALZERS Union Limited, Principado de Liechtenstein).

Obtención de imágenes



(A)



(B)



(C)

Figura 7.3. *P. virgatum* sin tratar (A), pretratado con H₂SO₄ diluido (B) y después de pretratamiento con H₂SO₄ diluido e hidrólisis enzimática (C).

Las muestras preparadas fueron introducidas en el MEB. Así, se obtuvieron imágenes digitales a distintos aumentos utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6480 LV (JEOL, Tokio, Japón). La Figura 7.3 muestra las imágenes obtenidas de *P. virgatum* sin tratar (A), pretratado con ácido sulfúrico diluido (B) y después de pretratamiento con ácido sulfúrico diluido e hidrólisis enzimática (C), con una resolución de 500 μm. En ellas, se puede observar cómo la estructura lignocelulósica se deconstruye a medida que aumenta el número de tratamientos a los que es sometida.

7.3. Metodología de superficie de respuesta (RSM)

La metodología de superficie de respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas que se utilizan para analizar conjuntos de datos en los que una respuesta de interés está influida por varias variables, con las cuales el objetivo es establecer modelos de ajuste para el conjunto de datos y optimizar esa respuesta (Myers y col., 2016).

El diseño experimental rotativo central compuesto (CCRD) es uno de los diseños de superficie de respuesta más utilizados. Siendo n el número de variables independientes del proceso, un CCRD consta de $(2^n + 2n + c)$ experimentos. Así, el término 2^n corresponde con los puntos factoriales del diseño con su origen en el centro, $2n$ son los puntos axiales (valores

extremos; dos para cada variable) para generar los términos cuadráticos del modelo y c es el número de veces que se replica el punto central. En un CCRD hay que especificar adicionalmente dos parámetros: la distancia α del origen a los puntos axiales (en unidades codificadas) y el número de veces que se replica el punto central.

Una vez ejecutados los experimentos definidos por el CCRD, se realizan los ajustes de las variables independientes a modelos cuadráticos o de segundo orden, de acuerdo con la Ecuación (2):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k \sum_j^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

donde Y es el resultado de la respuesta del experimento, β_0 es la constante independiente, β_i , β_{ii} , β_{ij} son constantes para los efectos lineales, cuadráticos y las interacciones entre efectos, respectivamente, x_i es cada variable independiente y ε es un error aleatorio.

Las ecuaciones de segundo orden son utilizadas para representar diagramas de superficies tridimensionales (3-D) y diagramas de contorno bidimensionales (2-D) para los efectos individuales y las interacciones entre efectos de las variables del proceso dentro de sus rangos predefinidos. En la representación gráfica de ambos tipos de diagramas, se fija el valor de una de las variables independientes (valor del punto central) para reflejar el efecto de interacción de las otras dos variables independientes de interés, para cada variable de respuesta descrita por la ecuación de ajuste al modelo cuadrático.

Por último, se procede a buscar los puntos óptimos del proceso. Para ello se calcula la primera derivada de las ecuaciones de ajuste y se iguala a cero. Esta condición permite la localización de un punto de inflexión, lo cual no es suficiente para que podamos asegurar que el punto hallado sea el óptimo (máximo o mínimo) del proceso, ya que también puede ser un punto de silla. Para que el punto hallado sea el óptimo, es necesario que cumpla también la condición de que la segunda derivada sea distinta de cero. Además, es necesario que el punto estacionario (máximo o mínimo) de cada variable de respuesta esté localizado dentro de la región experimental estudiada (rango en el que se estudiaron las variables independientes).

La significación estadística de las ecuaciones del modelo se determina por los coeficientes de regresión (R^2) y por el análisis de la varianza (ANOVA) a través del p-valor. Así, cuanto menor es el p-valor, mayor efecto tiene la variable independiente en cuestión sobre la

variable de respuesta utilizada. Además, la importancia de cada variable independiente y su efecto también se explica por la magnitud y el signo del coeficiente que tiene asociado en cada ecuación. La idoneidad de los valores calculados para cada variable independiente de modo que optimicen la respuesta, es evaluada mediante la función de deseabilidad.

Respecto al pretratamiento de *P. virgatum* con ácido sulfúrico diluido, hay varias variables de operación que pueden afectar a la eficiencia del proceso. En esta Tesis Doctoral, se utilizó un CCRD para evaluar el efecto de tres variables de operación del pretratamiento ácido de *P. virgatum*, en el rendimiento de recuperación de azúcares hidrólizados. El diseño del experimento, los resultados y la discusión de los mismos pueden verse en el Capítulo 3. Las variables del pretratamiento elegidas para optimizar el proceso fueron: carga de biomasa (% p/p), concentración de ácido sulfúrico (% p/p) y tiempo de hidrólisis (min) en un autoclave a 121 °C. Las variables de respuesta del proceso fueron las cantidades de azúcares totales hidrolizados en el pretratamiento y en la hidrólisis enzimática (calculados como suma de glucosa, xilosa y arabinosa) y de inhibidores totales generados (calculados como suma de ácido acético, ácido levulínico, 5-HMF y furfural). Se realizaron 19 experimentos que incluyeron 8 puntos factoriales, 6 puntos axiales y 5 puntos centrales. La distancia α del origen a los puntos axiales, en unidades codificadas, fue de 1,6818. La ejecución del orden de los ensayos se llevó a cabo de manera aleatoria para minimizar los efectos de cualquier variación inexplicable en las respuestas observadas debido a los factores externos.

Se utilizó el programa estadístico Minitab 17 (State College, Pennsylvania, USA) para realizar el diseño del experimento y para ajustar las variables independientes a una ecuación de segundo orden para cada variable respuesta obtenida tras la ejecución de los experimentos. Las ecuaciones obtenidas se representaron gráficamente (2-D y 3-D) y se optimizó el valor de cada variable independiente de modo que se pudiera maximizar la respuesta de azúcares totales recuperados en el pretratamiento ácido y la hidrólisis enzimática posterior vinculada a cada pretratamiento, así como minimizar la respuesta de los inhibidores totales obtenidos en dichos procesos (Capítulo 3). Los valores de las variables independientes calculados para alcanzar el punto óptimo del proceso fueron verificados experimentalmente.

Bibliografía

Lee, J.Y., Ryu, H.J., Oh, K.K. (2013). Acid catalyzed hydrothermal severity on the fractionation of agricultural residues for xylose rich hydrolyzates. *Bioresource Technology*. 132: 84-90.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M. (2016). Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. 4th Edition. Wiley Series in Probability and Statistics. ISBN: 978-1-118-91601-8.

NREL (National Renewable Energy Laboratory, USA). (2008a). Determination of sugars, byproducts and degradation products in liquid fraction process samples. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>. Último acceso: 22/12/2019.

NREL (National Renewable Energy Laboratory, USA). (2008b). Determination of ash in biomass. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>. Último acceso: 22/12/2019.

NREL (National Renewable Energy Laboratory, USA). (2012). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>. Último acceso: 22/12/2019.

7. Anexos

Anexo II: Residuos de la industria agroalimentaria

7.4. Preparación de hidrolizados

Descripción de biomásas

En el estudio de identificación de compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación, descrito en el Capítulo 5, se utilizaron hidrolizados generados a partir de cuatro residuos de la industria agroalimentaria. Las biomásas utilizadas y sus proveedores fueron: bagazo de manzana de Muns Agroindustrial S.L. (Lleida, España), piel de patata de Aperitivos Gus S.L. (Riego de la Vega, España), bagazo de cerveza procedente de una cervecera ubicada en el centro de Italia y piel de grano del café de Illycaffè S.p.A. (Trieste, Italia). Las biomásas se secaron a 45 °C durante 48 h en una estufa de ventilación forzada (Selecta), se molieron en un molino rotativo (Retsch GmbH) y se tamizaron a tamaño de partícula comprendido entre 0,5 y 1,0 mm. Las muestras se conservaron hasta su uso en recipientes cerrados, a temperatura ambiente.

Pretratamientos físico-químicos

La generación de hidrolizados a partir de los cuatro residuos de la industria agroalimentaria, descritos en el apartado anterior, se hizo de acuerdo al proceso que se muestra en la Figura 7.4.

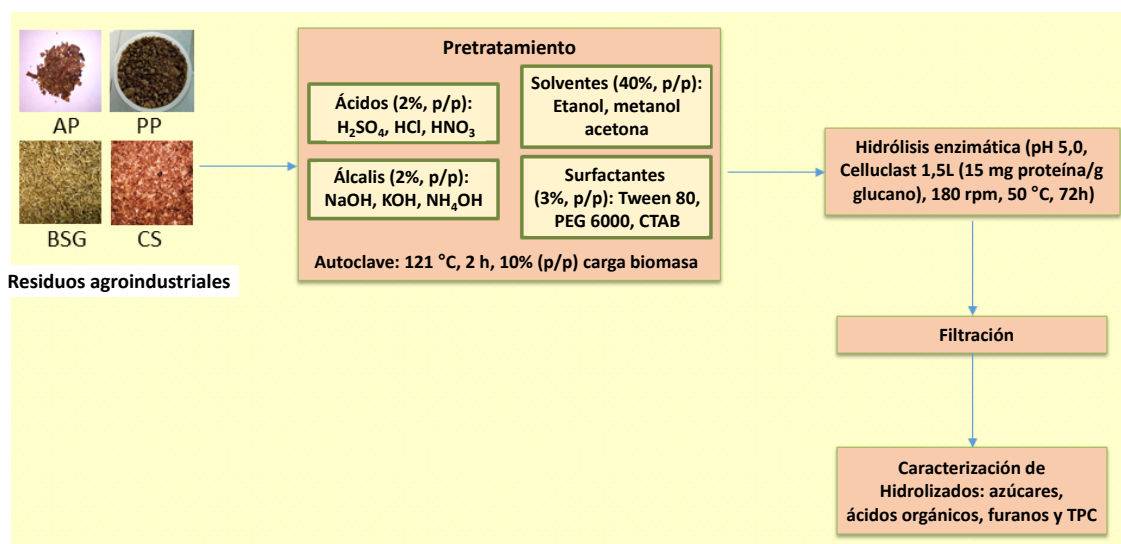


Figura 7.4. Esquema del proceso de generación de hidrolizados a partir de cuatro residuos de la industria agroalimentaria: bagazo de manzana (AP), piel de patata (PP), bagazo de cerveza (BSG) y piel de grano de café (CS).

Cada biomasa fue sometida a un pretratamiento físico-químico con doce compuestos químicos diferentes, disueltos en agua, pertenecientes a cuatro grupos generales (ácidos, bases, disolventes orgánicos y compuestos tensoactivos). Para ello, se pesaron 10,0 g de biomasa seca en una botella de vidrio de 500 mL y 90,0 g de solución acuosa que contiene uno de los compuestos químicos siguientes, con la dosis indicada (% p/p): 2% H₂SO₄, 2% HCl, 2% HNO₃ (ácidos), 2% NaOH, 2% de KOH, 2,5% de NH₄OH (bases), 40% de etanol, 40% de metanol, 40% de acetona (solventes orgánicos), 3% de Tween 80, 3% de PEG 6000 y 3% de CTAB (compuestos tensoactivos). A continuación, las botellas se cerraron y se trataron en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión, durante 2 h. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Una vez finalizado el pretratamiento en autoclave, se dejaron enfriar las botellas hasta temperatura ambiente. En el caso de muestras tratadas con solventes orgánicos, se observó que se había perdido por evaporación una pequeña masa de muestra dentro del autoclave y para compensar esta pérdida se agregó una masa equivalente de agua destilada. A continuación, se realizó la hidrólisis enzimática (sin separar el hidrolizado obtenido en el pretratamiento) como se describe en el apartado siguiente.

Hidrólisis enzimática

Cada botella que contenía la biomasa pretratada y el hidrolizado obtenido mediante pretratamiento con los distintos reactivos químicos, fue sometida a hidrólisis enzimática. Se utilizó la enzima Celluclast 1.5L (Novozymes) cuya actividad enzimática y densidad fueron 88 FPU mL⁻¹ y 1,22 g mL⁻¹, respectivamente. A cada botella se añadieron 0,97 g de ácido cítrico disueltos en 5 mL de agua, y se ajustó el pH a 5,0 con una disolución concentrada de NaOH ó de HCl. Así, se consiguió un tampón citrato de aproximadamente 50 mM y pH 5,0. Posteriormente, se añadieron 409 µL de la enzima Celluclast 1.5L (Novozymes), que correspondió a 15 mg de proteína g de glucano⁻¹. Las botellas se taparon y se colocaron en un agitador orbital (Infors AG) a 50 °C y 180 rpm durante 72 h.

Al finalizar la hidrólisis enzimática, las muestras se filtraron a vacío con un embudo Büchner y filtro de celulosa (Filter Lab) y el filtrado se centrifugó a 2480 × g durante 10 min, utilizando una centrífuga Jouan CR3i (Château-Gontier, Francia). A continuación, cada muestra líquida se filtró a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,20 µm de tamaño de poro (Agilent Technologies). Las muestras filtradas fueron analizadas para determinar las concentraciones de azúcares totales (suma de celobiosa, glucosa, xilosa, galactosa, manosa, ramnosa y

arabinosa), ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido acético y ácido levulínico), 5-HMF y furfural, mediante HPLC-RID, siguiendo el procedimiento descrito por NREL (2008). Además, se determinaron los compuestos fenólicos totales siguiendo el método de Folin-Denis (Folin y Denis, 1912).

A continuación, se seleccionaron los hidrolizados con mayores rendimientos de hidrólisis de azúcares, para llevar a cabo un estudio de identificación de compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación ABE. Así, a partir de cada hidrolizado se generaron cuatro muestras (pH 2 sin derivatizar, pH 2 derivatizada, pH 7 sin derivatizar y pH 7 derivatizada), siguiendo la metodología que se muestra en la Figura 7.5. Cada muestra fue analizada mediante GC-MS/MS. Para más información, ver Capítulo 5.

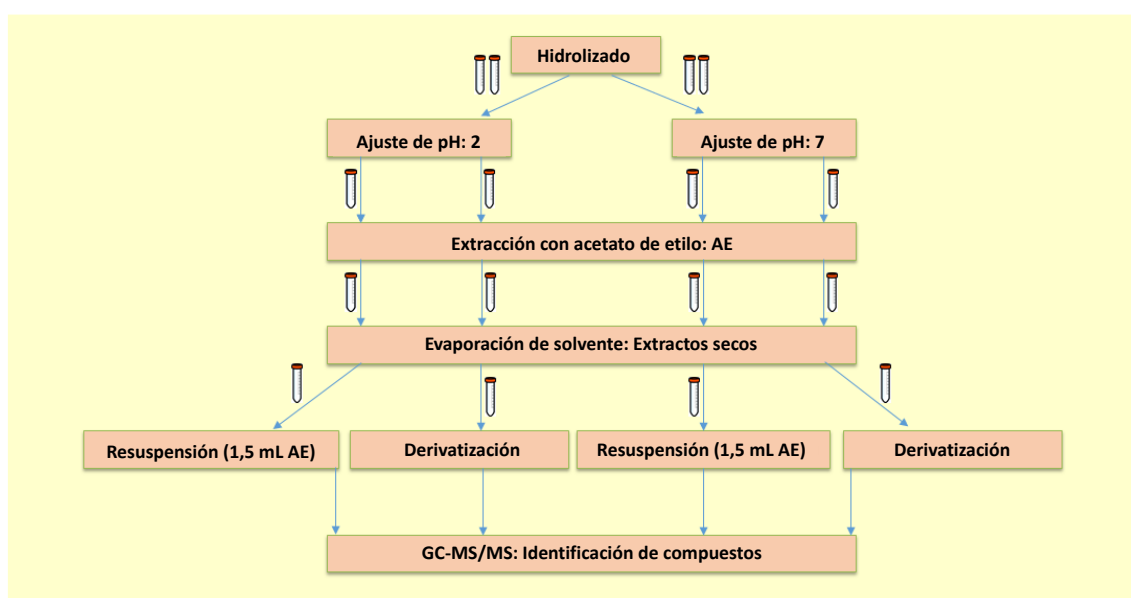


Figura 7.5. Esquema de la metodología de preparación de muestras para análisis mediante GC-MS/MS.

Bibliografía

Folin, O., Denis. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. The Journal of Biological Chemistry. 12: 239-243.

NREL (National Renewable Energy Laboratory, USA). (2008). Determination of sugars, byproducts and degradation products in liquid fraction process samples. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>. Último acceso: 22/12/2019.

7. Anexos

Anexo III: Publicaciones

Primera autora

1. Paniagua-García, A.I., Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambronero, J., Coca, M., Díez-Antolínez, R. (2019). Development and validation of a HPLC-DAD method for simultaneous determination of main potential ABE fermentation inhibitors identified in agro-food waste hydrolysates. *Microchemical Journal*. 150: 104147. DOI: 10.1016/j.microc.2019.104147.
2. Paniagua-García, A.I., Hijosa-Valsero, M., Díez-Antolínez, R., Sánchez, M.E., Coca, M. (2018). Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: The case of *Panicum virgatum*. 116: 131-139. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.06.006.
3. Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R., Hijosa-Valsero, M., Sánchez, M.E., Coca, M. (2016). Response surface optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for fermentable sugars production. *Chemical Engineering Transactions*. 49: 223-228. DOI: 10.3303/CET1649038.

Co-autora

1. Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambronero, J., Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R. (2020). A global approach to obtain biobutanol from corn stover. *Renewable Energy*. 148: 223-233. DOI: 10.1016/j.renene.2019.12.026
2. Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambronero, J., Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R. (2019). Tomato waste from processing industries as a feedstock for biofuel production. *Bioenergy Research*. 12: 1000-1011. DOI: 10.1007/s12155-019-10016-7.
3. Díez-Antolínez, R., Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I., Garita-Cambronero, J., Gómez, X. (2018). Yeast screening and cell immobilization on inert supports for ethanol production from cheese whey permeate with high lactose loads. *PLoS ONE*. 13: 12. DOI: 10.1371/journal.pone.0210002.
4. Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambronero, J., Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R. (2018). Biobutanol production from coffee silverskin. *Microbial Cell Factories*. 17: 154. DOI: 10.1186/s12934-018-1002-z.

5. Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R. (2018). Industrial potato peel as a feedstock for biobutanol production. *New Biotechnology*. 46: 54-60. DOI: 10.1016/j.nbt.2018.07.002.
6. Díez-Antolínez, R., Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I., Gómez, X. (2018). In situ two-stage gas stripping for the recovery of butanol from acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation broths. (2018). *Chemical Engineering Transactions*. 64: 37-42. DOI: 10.3303/CET1864007.
7. Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I., Díez-Antolínez, R. (2017). Biobutanol production from apple pomace: The importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food waste. *Bioenergy and Biofuels*. 101: 8041-8052. DOI: 10.1007/s00253-017-8522-z.
8. Malmierca, S., Díez-Antolínez, R., Paniagua, A.I., Martín, M. (2017). Technoeconomic study of biobutanol AB production. Part 2: Process design. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 56 (6): 1525-1533. DOI: 10.1021/acs.iecr.6b02944.
9. Malmierca, S., Díez-Antolínez, R., Paniagua, A.I., Martín, M. (2017). Technoeconomic study of biobutanol AB production. Part 1: Biomass pretreatment and hydrolysis. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 56 (6): 1518-1524. DOI: 10.1021/acs.iecr.6b02943.
10. Díez-Antolínez, R., Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I., Gómez, X. (2016). Effect of nutrient supplementation on biobutanol production from cheese whey by ABE (Acetone-Butanol-Ethanol) fermentation. *Chemical Engineering Transactions*. 49: 217-222. DOI: 10.3303/CET1649037.
11. Díez-Antolínez, R., Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A.I., Gómez, X. (2016). Very-high-gravity fermentation of non-supplemented cheese whey permeate by immobilized *Kluyveromyces marxianus*. *Chemical Engineering Transactions*. 49: 529-534. DOI: 10.3303/CET1649089.