



universidad
de león

TESIS DOCTORAL:

**PRODUCCIÓN ECO-SOSTENIBLE DE
BIOCARBURANTES A PARTIR DE SUERO
LÁCTEO**

“Eco-sustainable production of biofuels from cheese whey”

Programa de Doctorado: “Ingeniería de Producción y Computación”

Directoras:

Xiomar Arleth Gómez Barrios

María Hijosa Valseiro

Tesis Presentada por:

Rebeca Díez Antolínez

para optar al grado de Doctor

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han colaborado en el desarrollo de este trabajo.

En especial a mis directoras de tesis, sin ellas no hubiese sido posible. A María darle las gracias por su orientación y supervisión continua, por enseñarme a dar carácter científico a mis ideas y por el apoyo que siempre he recibido por su parte. A Xiomar agradecerle enormemente que aceptase ser tutora y directora de este trabajo, por su ayuda constante, su aliento y supervisión. Asimismo, quisiera agradecer a Antonio Morán las facilidades que siempre me ha puesto como director del programa de doctorado, y lo fácil que es colaborar con él.

Quiero agradecer de un modo muy especial toda la ayuda que he recibido siempre de mis compañeros del Centro de Biocombustibles y Bioproductos del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Ana, Raquel, Nuria, Gerardo y Jerson. Sin ellos tampoco hubiese sido posible.

Deseo dar las gracias al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León por permitirme realizar mi tesis doctoral.

También quiero dar las gracias a Óscar Esteban de Queserías Entrepinares SAU y a Noelia Puebla de Quesería Artesanal del Río Carrión S.L., por su amabilidad y disposición a ayudarme, siempre que ha sido necesario.

Por último, quiero agradecer a mi familia su apoyo incondicional, su paciencia y comprensión durante todo este tiempo.

Muchas gracias a todos.

Tabla de Contenidos

Índice General

Índice General	I
Índice de Tablas.....	IX
Índice de Figuras.....	XI
Resumen.....	XIV
Abstract	XVII
Abreviaturas / Abbreviations	XXI
1. Introducción y Antecedentes	1
1.1. Biocarburantes	3
1.2. Suero lácteo.....	5
1.3. Valorización del suero lácteo	7
1.4. Aplicaciones biotecnológicas del suero lácteo y el permeado de suero.....	8
1.5. Fermentación de lactosa a etanol.....	9
1.5.1. Bioquímica de la fermentación alcohólica	12
1.5.2. Fermentación de alta o muy alta densidad.....	15
1.6. Fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE).....	16
1.6.1. Bioquímica de la fermentación ABE.....	18
1.6.2. Microorganismos.....	21
1.6.3. Sustratos.....	21
1.7. Configuración de fermentación.....	24
1.7.1. Fermentación discontinua o “por lotes”	25

1.7.2.	Fermentación semi-continua o “fed-batch”	26
1.7.3.	Fermentación continua	27
1.7.3.1.	Bioprocesos continuos con inmovilización celular	29
1.8.	Recuperación de solventes	34
1.8.1.	Destilación	35
1.8.2.	Arrastre de vapor o gas-stripping.....	36
1.8.3.	Extracción Líquido-Líquido (L-L)	39
1.8.4.	Pervaporación	40
1.8.5.	Perstracción.....	42
1.8.6.	Adsorción.....	43
	Referencias.....	45
2.	Objetivos y Estructura	65
2.1.	Objetivos	67
2.1.1.	Objetivos específicos.....	67
2.2.	Estructura de la tesis	68
3.	Materiales y Métodos	71
3.1.	Suero lácteo.....	73
3.2.	Microorganismos y condiciones de cultivo	75
3.3.	Pretratamiento del lactosuero	78
3.4.	Descripción de los sistemas de fermentación.....	78
3.4.1.	Fermentación discontinua o por lotes	78
3.4.1.1.	Etanol.....	78

3.4.1.2.	Butanol	80
3.4.2.	Fermentación continua. Inmovilización celular	82
3.4.2.1.	Inmovilización por atrapamiento en geles de alginato cálcico	82
3.4.2.2.	Inmovilización por adsorción	83
3.5.	Recuperación de solventes	85
3.5.1.	Optimización del gas-stripping.....	85
3.5.2.	Gas-stripping en dos etapas.....	87
3.5.3.	Fermentación semicontinua con recuperación de solventes <i>in situ</i> mediante gas-stripping	87
3.6.	Métodos de Análisis	88
3.6.1.	Determinación de metabolitos principales y secundarios.....	88
3.6.2.	Determinación del crecimiento celular.....	89
3.6.3.	Determinación de aniones y cationes.....	89
3.6.4.	Determinación de proteína.....	90
3.6.5.	Caracterización morfológica.....	91
3.7.	Parámetros de seguimiento y control de las fermentaciones	92
3.8.	Análisis estadístico	93
	Referencias.....	94
4.	Very high gravity fermentation of non-supplemented cheese whey permeate (CWP) by immobilized <i>Kluyveromyces marxianus</i>	95
4.1.	Introduction.....	98
4.2.	Material and methods.....	99
4.2.1.	Microorganisms and culture conditions.....	99

4.2.2.	Cell immobilization.....	100
4.2.3.	Cheese whey and fermentation media	100
4.2.4.	Analytical methods.....	100
4.2.5.	Statistical analysis.....	101
4.2.6.	Experimental design.....	101
4.3.	Results and discussion.....	101
4.3.1.	Effect of temperature and initial pH	101
4.3.2.	Effect of substrate concentration	102
4.3.3.	Response surface (RSM) analysis for the optimization of immobilization parameters	104
4.3.4.	Repeated batch fermentation.....	106
4.3.5.	Conclusions.....	107
	Acknowledgments.....	107
	References.....	108
	Anexo 4.1.....	110
5.	Yeast screening and cell immobilization on inert supports for ethanol production from cheese whey permeate with high lactose loads	111
5.1.	Introduction.....	114
5.2.	Material and methods.....	117
5.2.1.	Raw Material	117
5.2.2.	Yeast strains and culture conditions	117
5.2.3.	Kluyveromyces strains and fermentation media comparison	118
5.2.4.	<i>Saccharomyces</i> strains and lactose whey permeate hydrolysis optimization	119

5.2.5.	Optimization of fermentation conditions	120
5.2.6.	Comparison of immobilization supports	120
5.2.7.	Chemical analyses of fermented broths	121
5.2.8.	Statistical analyses.....	122
5.3.	Results and Discussion	123
5.3.1.	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strains and fermentation media comparison	123
5.3.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains and fermentation media comparison	125
5.3.3.	Optimization of fermentation conditions	126
5.3.3.1.	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain	126
5.3.3.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain	128
5.3.4.	Comparison of immobilization supports	130
5.4.	Conclusions.....	134
	Acknowledgements.....	134
	Bibliography	135
	Supplementary Material (SM).....	140
	Anexo 5.1.....	146
6.	Effect of Nutrient Supplementation on Biobutanol Production from Cheese Whey by Acetone–Butanol–Ethanol Fermentation	149
6.1.	Introduction.....	152
6.2.	Material and Methods.....	153
6.2.1.	Microorganisms and culture conditions.....	153
6.2.2.	Cheese whey and fermentation media	154

6.2.3.	Analytical methods.....	155
6.2.4.	Statistical analyses.....	156
6.3.	Results and Discussion	156
6.3.1.	Optimization of nutrient supplements in cheese whey.....	156
6.3.2.	Effect of initial lactose concentration on $Y_{B/L}$ yield and lactose consumption	159
6.4.	Conclusions.....	161
	Acknowledgements.....	161
	References.....	161
7.	In situ two-stage gas stripping for the recovery of Butanol from Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation broths	165
7.1.	Introduction.....	169
7.2.	Material and Methods.....	170
7.2.1.	Media and culture	170
7.2.2.	Gas-stripping optimization	170
7.2.3.	Two-stage gas-stripping	172
7.2.4.	Fed-batch fermentation system coupled with gas-stripping	172
7.2.5.	Analytical methods.....	173
7.2.6.	Statistical analyses.....	173
7.3.	Results and Discussion	173
7.3.1.	Gas stripping optimization	173
7.3.2.	Two-stage gas stripping.....	174
7.4.	Conclusions.....	177

Acknowledgments.....	178
References.....	178
8. Conclusiones/ Conclusions.....	181
9. Anexos.....	189
Anexo I. Estequiometría de las fermentaciones alcohólica y ABE	191
Anexo II. Diseño Experimental	193
Metodología de Superficie de Respuesta	193
Diseños de Plackett-Burman	195
Anexo III. Otras publicaciones científicas.....	197

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Comparación de propiedades de distintos carburantes líquidos.....	5
Tabla 1.2. Recopilación bibliográfica de obtención de etanol en procesos con inmovilización celular.....	32
Tabla 1.3. Recopilación bibliográfica de obtención de butanol en procesos con inmovilización celular.....	33
Tabla 3.1. Características químicas de los sueros utilizados como sustrato.....	74
Tabla 4.1. Fermentation results for T and pH0 evaluation ($L_0 = 120$ g/L, time = 44 h).	102
Tabla 4.2. Experimental central composite design (CCD) runs and responses.....	104
Tabla 4.3. Analysis of variance- ANOVA- of the predicted models for E_f and (ΔL) responses ..	105
Tabla 5.1. Fermentation performance of <i>S. cerevisiae</i> CECT 1383, Ethanol Red [®] , CECT 13152 and Hércules in hydrolyzed CWP ($L_i = 140$ g/L). Parameters: final ethanol concentration (E_f), sugar consumption (ΔL), ethanol yield factor ($Y_{E/S}$), ethanol profit factor (π_E), productivity (W_E) and ethanol yield conversion efficiency (η_E).	126
Tabla 5.2. Experimental results of ethanol concentration (E_f), ethanol yield factor ($Y_{E/L}$), ethanol profit factor (π_E) and ethanol volumetric productivity (W_E) according to a central composite design employing <i>K. marxianus</i> DSM 5422 for the fermentation of CWP ($L_i = 132.5$ g/L).	127
Tabla 5.3. Experimental results of ethanol concentration (E_f), ethanol yield factor ($Y_{E/L}$), ethanol profit factor (π_E) and ethanol volumetric productivity (W_E) according to a central composite design employing <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red [®] for the fermentation of hydrolyzed CWP ($L_i = 132.5$ g/L).	129
Tabla 5.4. Comparison of mean fermentation parameters: Ethanol final concentration (E_f), ethanol yield factor ($Y_{E/L}$), ethanol yield conversion efficiency (η_E), lactose consumption (ΔL), ethanol profit factor (π_E) and ethanol volumetric productivity (W_E) for <i>K. marxianus</i> DSM 5422 during the 14 cycles employing CWP with lactose loads of 130 g/L and 170 g/L for glass Raschig rings (GRR) and alumina beads (AB) supports.	134
Tabla 6.1. Composition of the nanofiltered sheep cheese whey employed in the experiments.	154

Tabla 6.2. Independent variables included in the Plackett-Burman experimental design with their respective minimum and maximum values, and effects of each independent variable on the three response variables.....	157
Tabla 6.3. Conditions of the RSM experiment. In the case of the RSM variables, axial values are indicated.....	158
Tabla 6.4. Fermentation results for different initial lactose concentrations.....	160
Tabla 7.1. Gas stripping performance indicators for a synthetic aqueous medium (5 g/L A; 10 g/L B; 1.67 g/L E) under optimal RSM conditions. Operation conditions: T feed = 60 °C, Gas flow = 1.34 L/min, T refrigeration = 5 °C. A: Acetone, B: Butanol, E: Ethanol.	174
Tabla 7.2. Gas stripping performance indicators for the fermentation broth (cheese whey with <i>C. beijerinckii</i> CECT 508). Stripping conditions T feed = 60 °C, Gas flow = 1.34 L/min, T refrigeration = 5 °C, t = 4 h. Initial concentrations (1st stripping): 3,02 g/L A; 12,04 g/L B; 0,23 g/L E. Initial concentrations (2nd stripping): 4,71 g/L A; 9,63 g/L B; 0,29 g/L E. A: Acetone, B: Butanol; E:Ethanol.	176

Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema de valorización fraccionada e integral de suero lácteo	7
Figura 1.2. Ruta metabólica de fermentación de lactosa a etanol	13
Figura 1.3. Ciclo de vida de <i>Clostridium</i> spp.	18
Figura 1.4. Rutas metabólicas de la lactosa en <i>Clostridium</i> spp. (en el interior de las cajas se muestran los compuestos extracelulares)	20
Figura 1.5. Esquemas de configuraciones de fermentación: A) Discontinuo, B) Semicontinuo, C) Continuo.....	25
Figura 1.6. Etapas de desarrollo de una película de biofilm	31
Figura 1.7. Esquema de la recuperación de solventes por gas-stripping.....	37
Figura 1.8. Esquema de la recuperación de solventes por extracción Líquido-Líquido	40
Figura 1.9. Esquema de la recuperación de solventes por pervaporación	41
Figura 1.10. Esquema de la recuperación de solventes por adsorción, incluyendo tanto el ciclo de carga como el de regeneración.....	44
Figura 2.1. Esquema de la estructura desarrollada.....	70
Figura 3.1. Muestras de suero lácteo utilizados durante el proceso experimental: a) Suero 1 (suero ultrafiltrado) y b) Suero 2 (suero nanofiltrado).	73
Figura 3.2. Unidad experimental de filtración de placas LabStak® M20 (Alfa Laval, Suiza)	74
Figura 3.3. Imágenes de los microorganismos en microscopía de contraste de fases a 400X a) <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSMZ 7239; b) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ethanol Red®; c) <i>Clostridium beijerinckii</i> CECT 508, en sustrato de lactosuero.	77
Figura 3.4. Proceso de producción de etanol mediante fermentación de suero lácteo utilizando la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> . a) Placa de cultivo puro de <i>klumveromyces marxianus</i> ; b) Proceso de inoculación del microorganismo en el medio de fermentación; c) Fermentación de las muestras en el incubador con agitación orbital; d) Aspecto de la muestra tras finalizar la fermentación alcohólica.....	79
Figura 3.5. Proceso de producción de butanol a partir de suero lácteo por fermentación ABE con <i>C. beijerinckii</i> CECT 508. a) Carrusel de fermentación con control de pH automático; b) Cabina de	

anaerobiosis; c) Reactor de fermentación pre (1) y post (2) fermentación y d) Cabina de incubación con agitación controlada.	81
Figura 3.6. Biorreactor Biostat B® de 2 L (Sartorius, Alemania) con Micro-DCU (Braun, Alemania).	81
Figura 3.7. Imágenes de la inmovilización de células de <i>K. marxianus</i> DSM 5422 por atrapamiento en geles de alginato: a) Instalación utilizada para la fabricación de los geles de alginato; b) Detalle de las esferas de alginato.	83
Figura 3.8. Soportes inertes utilizados en la inmovilización celular. De izquierda a derecha: a) Anillos Raschig de plástico; b) Anillos Raschig de Tygon; c) Anillos Raschig de vidrio y d) Esferas de alúmina.....	84
Figura 3.9. Configuración del sistema de extracción de gas utilizado en los experimentos: a) Diagrama del sistema; b) fotografía del montaje de gas stripping.	86
Figura 3.10. Microscopio Electrónico de Barrido Jeol LV 6100okio, Japón).....	92
Figura 4.1. Effect of CWP lactose content on E_f , ΔL , η and W_E variables.	103
Figura 4.2. Kinetic fermentation parameters (E_f , ΔL , η and W_E) at the end of each cycle.....	106
Figura 5.1. Fermentation performance of <i>K. marxianus</i> DSM 7239, DSM 5418, DSM 5422 and DSM 70799 in concentrated synthetic medium ($L_i = 130$ g/L). Parameters: final ethanol concentration, ethanol yield conversion efficiency (η_E), lactose consumption (ΔL) and productivity (W_E).	123
Figura 5.2. Evaluation of the effect of different combinations of nutrients on alcoholic fermentation performance. Response variables: Ethanol final concentration (E_f), ethanol yield conversion efficiency (η_E), lactose consumption (ΔL) and productivity (W_E) of <i>K. marxianus</i> 5422 employing concentrated CWP ($L_i = 130$ g/L).	125
Figura 5.3. Evolution of ethanol concentration during ethanol fermentation for inorganic supports [glass Raschig rings (GRR), plastic Raschig rings (PRR), tygon Raschig rings (TRR) and alumina beads (AB)] during 7 fermentation cycles ($L_i = 130$ g/L) employing <i>K. marxianus</i> DSM 5422.....	131
Figura 5.4. Evolution of ethanol concentration employing <i>K. marxianus</i> DSM 5422 on inorganic supports [glass Raschig rings (GRR) and alumina beads (AB)] during 14 fermentation cycles ($L_i = 130$ g/L).	132

Figura 5.5. Evolution of ethanol concentration employing <i>K. marxianus</i> DSM 5422 on inorganic supports [glass Raschig rings (GRR) and alumina beads (AB)] during 14 fermentation cycles (Li= 170 g/L).	132
Figura 6.1. Contour plots for butanol production in the RSM experimental design.....	158
Figura 7.1. Setup diagram of the gas stripping system used in the experiments	171
Figura 7.2. a) Dynamic evolution of ABE solvent concentration in the condensate during second-stage gas stripping; b) Dynamic evolution of ABE solvents recovery during second-stage gas stripping.	175
Figura 7.3. Evolution of ABE fermentation by <i>C. beijerinckii</i> in a fed-batch system with cheese whey during two gas stripping/resting cycles. Stripping conditions T feed = 60 °C, Gas flow = 1.34 L/min, T refr = 5 °C, t = 4 h.	177

Resumen

El suero lácteo, principal subproducto del procesado de leche y queso, supone un gran desafío para el sector lácteo, tanto por los elevados volúmenes generados, como por su elevada carga orgánica. A este desafío en su gestión debe sumarse una legislación medioambiental cada vez más restrictiva para su disposición final.

El lactosuero es una importante fuente de nutrientes, fundamentalmente lactosa y proteínas. Una parte de estos nutrientes, como son las proteínas lácteas, son recuperadas y reincorporadas nuevamente a la cadena alimentaria. Sin embargo, alrededor de la mitad del suero generado no es valorizado y es gestionado por las industrias lácteas como un residuo. Asimismo, durante el proceso de recuperación de las proteínas lácteas se generan como subproducto elevados volúmenes de permeado de suero, corriente residual que conserva la mayoría de los sólidos, fundamentalmente lactosa, generando su vertido un problema similar al del lactosuero, tanto por la magnitud del volumen como por su carga contaminante. El ineficiente aprovechamiento de estos recursos tiene graves implicaciones medioambientales, económicas y de sostenibilidad.

La obtención de bioalcoholes oxigenados, como el etanol y el butanol, mediante procesos fermentativos de bioconversión de la lactosa presente en el lactosuero y en el permeado de suero, puede ser una interesante alternativa para la valorización de este subproducto. Sin embargo, para garantizar la viabilidad comercial de estos procesos es imprescindible mejorar el rendimiento y la productividad de las fermentaciones. Es esencial aumentar la concentración final de solventes en el caldo de fermentación para reducir los elevados costes de recuperación. Para ello, se debe mejorar la osmotolerancia de los microorganismos tanto a sustratos como a productos, así como plantear estrategias de recuperación *in situ* de los solventes generados. También es necesario trabajar en la reducción de los tiempos de fermentación para aumentar la productividad y la viabilidad económica global del proceso.

Esta tesis doctoral se ha centrado en la mejora de las tecnologías de fermentación para la obtención de bioalcoholes, concretamente etanol y butanol, para su uso como biocarburantes, a partir de lactosuero y de permeado de suero. A través de la optimización de las condiciones de fermentación, se trató de aumentar el rendimiento y

la productividad del proceso. Para ello, se emplearon tecnologías eficientes de fermentación como son las fermentaciones a alta densidad (conocidas por sus siglas en inglés, VHG, Very High Gravity) combinadas con inmovilización celular mediante atrapamiento en esferas de alginato y adsorción sobre soportes inertes. Además, se han planteado estrategias de recuperación *in situ* de solventes como el arrastre de vapor o gas stripping, en una o dos etapas, para mejorar el consumo energético del proceso de recuperación y purificación, incidiendo positivamente en la viabilidad global.

Inicialmente, se evaluó el efecto de la temperatura y el pH en el desarrollo de la fermentación alcohólica utilizando levaduras de la especie *Kluyveromyces marxianus*, tanto libres como inmovilizadas por atrapamiento en esferas de alginato. Además, se determinó que la concentración límite de lactosa en el permeado de suero que permite evitar problemas de inhibición por sustrato está en torno a 170 – 190 g/L, alcanzando rendimientos de fermentación del 95,5% y productividades de 1,8 g/L·h. Finalmente, se optimizaron los parámetros más influyentes en la formación de los geles de alginato (concentración de alginato, carga celular y tamaño de la esfera) mediante diseño experimental por Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), validándose la estabilidad de las esferas y los rendimientos de producción de etanol durante 6 ciclos, con producciones medias de etanol de 8,3% (v/v), una productividad de 1,6 g/L·h y una eficiencia de fermentación del 83%.

Posteriormente, se comparó la capacidad fermentativa de cuatro cepas de levadura de la especie *K. marxianus* y cuatro cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* para producir etanol. Se optimizaron las condiciones de operación (temperatura, pH y tiempo) con un diseño experimental por MSR para una cepa seleccionada de cada una de las dos especies. Con la cepa *K. marxianus* DSM 5422 en condiciones optimizadas, se obtuvo una concentración de etanol del 6% (v/v) en sólo 44 horas de fermentación, utilizando como sustrato permeado de suero con una elevada concentración inicial de lactosa ($L_i = 130$ g/L) en procesos discontinuos. En una siguiente etapa, la cepa fue inmovilizada por adsorción en cuatro soportes inertes de bajo coste (anillos Raschig de vidrio, plástico y silicona Tygon®, y esferas de alúmina) para evaluar su comportamiento a lo largo del tiempo. La inmovilización de la levadura en anillos Raschig de vidrio y perlas de alúmina ofreció el

comportamiento más estable a lo largo del tiempo, con rendimientos medios de etanol del 6% (v/v) en un régimen continuo durante más de 40 días (1.000 horas).

De un modo similar a como se hizo con la fermentación alcohólica, mediante diseño experimental de Plackett-Burman y MSR, se determinaron los nutrientes esenciales para la obtención de butanol con la cepa *Clostridium beijerinckii* CECT 508, optimizando sus concentraciones. En este trabajo se alcanzaron rendimientos de fermentación cercanos al teórico, trabajando con suero lácteo de oveja con una concentración inicial de lactosa de 40 g/L, llegando a concentraciones de butanol en el caldo de 8,9 g/L.

Finalmente, se evaluó un proceso de fermentación ABE con recuperación *in situ* de butanol mediante arrastre de vapor o gas-stripping en una y dos etapas consecutivas. Se ha realizado una optimización de las condiciones de operación mediante MSR. Utilizando una recuperación por arrastre a vapor en dos etapas, se consiguió una corriente de condensado muy enriquecida en butanol (30 – 36% v/v), lo que permite disminuir el consumo energético de la etapa de deshidratación durante la purificación. Aunque en las condiciones de recuperación óptimas (T alimentación de 60 °C) las bacterias tuvieron un fuerte estrés térmico, fueron capaces de recuperarse y producir nuevamente butanol. Sin embargo, el rendimiento de fermentaciones consecutivas se demostró comprometido.

En futuras actuaciones de investigación sería muy interesante analizar la capacidad de producir butanol de otras cepas comerciales de *Clostridium*, así como optimizar la inmovilización de las bacterias en soportes inertes en procesos discontinuos en una primera etapa; y en procesos continuos en reactores de biopelícula integrados con recuperación *in situ* de solventes mediante gas-stripping en dos fases, en una posterior etapa de escalado. Asimismo, se deberían evaluar la eficiencia y los costes del proceso global de fermentación ABE a escala demostrativa para determinar la viabilidad comercial del proceso propuesto.

Abstract

Whey, the main by-product of milk and cheese processing, is a great challenge for the dairy sector, due to the huge volumes generated and its high organic load, along with an increasingly restrictive environmental legislation for its management and disposal.

Whey is an important source of nutrients, mainly lactose and proteins. A part of these nutrients, particularly milk proteins, are recovered and newly reintroduced into the food chain. However, about half of the generated whey is not valorized and it is managed by the dairy industries as a residual stream, wasting its valuable nutrients. Likewise, during the recovery process of milk proteins, high volumes of whey permeate are generated as by-product stream. Whey permeate is an effluent enriched in most of the solid nutrients present in whey, mainly lactose, whose uncontrolled disposal generates a problem similar to that of whey, regarding the volume generated and the pollutant load. The inefficient reuse of these resources has serious environmental, economic and sustainability implications.

The production of advanced oxygenated biofuels, such as ethanol and butanol, through fermentation processes for the conversion of lactose present in whey and whey permeate, is an interesting valorization alternative of the main by-product of dairy industry. However, to guarantee the commercial viability of these bioprocesses, it is crucial to improve the yield and the productivity of fermentations. Final solvent titers must be increased in fermentation broths to reduce the high costs of recovery. Therefore, microbial osmotolerance, to both substrates and products, must be increased, while, less energy intensive online solvent recovery and purification technologies have to be proposed. Moreover, it is necessary to work on reducing fermentation time to improve the productivity and therefore, the overall economic process viability.

This doctoral thesis is focused on the improvement of fermentation technologies to produce bioalcohols, specifically ethanol and butanol to be used as biofuels, from whey and whey permeate. By optimizing fermentation conditions, along with the use of efficient technologies such as Very High Gravity (VHG) fermentation combined with cell immobilization, by entrapment in alginate spheres and adsorption on inert supports, it is expected to improve the yield and productivity of alcoholic and ABE fermentations. The

purpose is to obtain a higher concentration of alcohol (ethanol/butanol) in the fermentation broth and to maximize lactose consumption to improve the process from an environmental and economic point of view. In addition, research was done on the setting of in-line recovery strategies for solvents, such as gas-stripping in one or two stages aiming at reducing the energy demand of the recovery and purification step, thereby improving the viability of the global process.

Firstly, the effect of temperature and pH on the performance of alcoholic fermentation was tested using yeasts of the species *Kluyveromyces marxianus*, both free and immobilized by entrapment in alginate spheres. Additionally, it was established that the lactose-load threshold in whey to prevent substrate inhibition problems can be fixed around 170 – 190 g/L, reaching fermentation efficiency yields of 95.5% and productivities of 1.8 g/L·h. Finally, the most influential parameters in the formation of alginate gels (alginate concentration, cell load and sphere size) were optimized with an experimental design using Response Surface Methodology (RSM). The stability of the spheres and the yields of ethanol production were experimentally validated during 6 cycles, with average productions of ethanol of 8.3% (v/v), a productivity of 1.6 g/L·h and a fermentation efficiency of 83%.

After that, the ability of producing ethanol using four yeast strains of the species *K. marxianus* and four strains of the species *Saccharomyces cerevisiae* was evaluated. A strain of each yeast species was selected and the operating conditions (temperature, pH and time) were optimized through experimental design by RSM in discontinuous conditions. The strain *K. marxianus* DSM 5422 showed the best fermentative behavior, obtaining 6% (v/v) of ethanol in just 44 hours of fermentation using whey with a lactose load of 130 g/L as substrate. In the next step, this strain was immobilized by adsorption on four low-cost inert supports (glass, plastic and Tygon® Raschig rings and alumina spheres) and performance over time was assessed. The best result was obtained by immobilizing the yeast on glass Raschig rings and alumina pearls, with average ethanol titers of 6% (v/v) in a continuous configuration for more than 40 days (1.000 hours).

Similarly, the previous work regarding alcoholic fermentation, the use of Plackett-Burman and RSM experimental design for evaluating the effect of essential nutrients for the

production of butanol with the strain *Clostridium beijerinckii* CECT 508 was tested. In this work, fermentation yields close to the theoretical threshold were obtained, working with whey having an initial lactose concentration of 40 g/L, reaching butanol concentrations in the broth of 8.9 g/L.

Finally, a continuous ABE fermentation combined with an in-line butanol recovery gas-stripping system, in one and two consecutive stages, was proposed. Operating conditions were optimized using RSM. By employing a two-stage gas-stripping configuration, a highly enriched-in-butanol condensate was obtained (30 – 36% v/v), reducing the energy demand of the dehydration stage during purification. Under the optimal recovery conditions (T feeding of 60 °C), bacteria were able to recover from temperature stress and produce butanol again, although the process affected the fermentation performance of the subsequent cycles.

Future research activities would focus on analyzing the ability of producing butanol from other commercial strains of *Clostridium*, as well as optimizing the immobilization of bacteria on inert supports in discontinuous processes in a first stage and in continuous processes integrating biofilm reactors with solvent recovery *in situ* by gas-stripping using a two-phase configuration in a second stage. Moreover, it is necessary to evaluate the efficiency and cost of the overall ABE fermentation process on a demonstrative scale to determine its commercial viability.

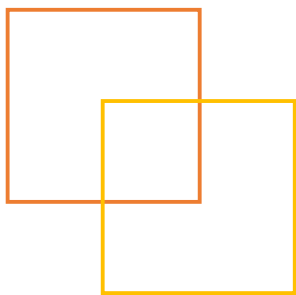
Abreviaturas / Abbreviations

AB	Alumina bead (Esferas de alúmina)
ABE	Acetona-Butanol-Etanol / Acetone-Butanol-Ethanol
ADH	Alcohol deshidrogenasa
AIE	Agencia Internacional de la Energía
AK	Acetoquinasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ANOVA	Análisis de la varianza
BADH	Butiraldehído deshidrogenasa
BCD	Butiril-CoA deshidrogenasa
BDH	Butanol deshidrogenasa
BK	Butiratoquinasa
BOD	Biological oxygen demand
CCD	Central Composite Design (Diseño central compuesto)
CE	Comisión Europea
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CMNUCC	Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático
CoA	Coenzima A
CoAT	CoA transferasa
COD	Chemical Oxygen Demand
COP	Conferencia de las Partes del Clima de Naciones Unidas
CPS	Concentrado de Proteína de Suero
CWP	Cheese Whey Permeate (Permeado de suero de queso)
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DCC	Diseño Compuesto Central

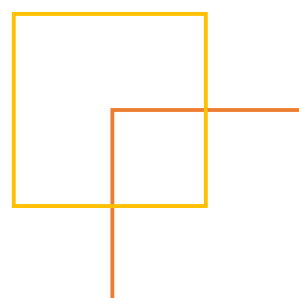
DFA	Dairy Farmers of America (Ganaderos Lácteos de América)
DO	Densidad Óptica
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares)
EEA	European Environmental Agency (Agencia Europea de Medio Ambiente)
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
ELV	Equilibrio Líquido-Vapor
EMP	Embden-Meyerhoff-Parnas
ENO	Enolasa
ETF	Flavoproteína de transferencia de electrones
FBPA	Fructosa-bifosfato aldolasa
FDA	U.S. Food and Drug Administration (Agencia Estadounidense de Administración de Alimentos y Medicamentos)
FGM	Fosfoglucomutasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC	Gas Chromatography (Cromatografía de gases)
GEI	Gases de Efecto Invernadero
GRAS	Generally Recognized as Safe (Generalmente Reconocidos como Seguros)
GRR	Glass Raschig Ring (Anillos Raschig de vidrio)
HBD	Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa
HK	Hexoquinasa
HG	High Gravity (Alta densidad)
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
LDH	Lactato deshidrogenasa

L-L	Líquido-Líquido
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
NF	Nanofiltrado
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OE	Objetivos Específicos
ONU	Organización de Naciones Unidas
PDC	Piruvato descarboxilasa
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEBA	Poliéter Amida en Bloque
PGI	Fosfoglicosa isomerasa
PGK	Fosfoglicerato quinasa
PGM	Fosfoglicerato mutasa
PHA	Polihidroxiálcanoato
PFK	Fosofructoquinasa
PRR	Plastic Raschig Ring (Anillo Raschig de plástico)
PTA	Fosfotransacetilasa
PTB	Fosfotransbutirilasa
PTMSP	Poli (1-trimetilsilil-1-propino)
PYK	Piruvato quinasa
RLF	Reactor de Lecho Fijo
RLFI	Reactor de Lecho Fluidizado
RSM	Response Surface Methodology (Metodología de superficie de respuesta)
SEM	Scanning Electron Microscope (Microscopía electrónica de barrido)
SPE	Sustancias Poliméricas Extracelulares

SGBA	Subgrupo de Trabajo de Biocarburantes Avanzados
TPI	Triosa-fosfato isomerasa
TRR	Tygon® Raschig Ring (Anillos Raschig de silicona Tygon®)
UDP	Uridina difosfato
UF	Ultrafiltrado
VHG	Very High Gravity (Muy alta densidad)
VHGF	Very High Gravity Fermentation (Fermentación de muy alta densidad)



1. Introducción y Antecedentes



1.1. Biocarburantes

Existe una creciente concienciación sobre el cambio climático y sus graves impactos. Por este motivo, en 2015, a través del Acuerdo de París dentro de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), se acordó limitar el aumento de la temperatura media mundial con respecto a la época preindustrial en menos de 2 °C (ONU, 2015a). Ante este nuevo escenario, la UE se ha comprometido a reducir sus emisiones de gases de efecto invernadero (GEIs), principalmente CO₂, entre un 80% y un 95% con respecto a los niveles de 1990, antes de 2050, como parte del esfuerzo colectivo de los países desarrollados (CE, 2018a). A través del acuerdo "Chile-Madrid Tiempo de Actuar" dentro de la 25ª Conferencia de las Partes (COP25) del Clima de Naciones Unidas, se concluye que es necesario aumentar la ambición por parte de los países para responder a la emergencia climática actual. Se reconoce la transversalidad de la lucha por el cambio climático en todos los sectores de la sociedad y la dimensión social del problema, centrando la respuesta a la crisis climática en las personas (ONU, 2019).

El sector del transporte consume un tercio del total de la energía utilizada en la UE-28 y genera el 25% de los GEIs (Bertoldi *et al.*, 2018). Por lo tanto, para alcanzar los objetivos acordados es imprescindible reducir al menos dos tercios las actuales emisiones de CO₂ en el sector de transporte (EEA, 2018). Por subsectores, el transporte por carretera genera el 73% del total, representando los vehículos ligeros el 44,5% frente al 18,8% de los vehículos pesados (EEA, 2018). En la actual economía globalizada, el transporte de bienes y personas es imprescindible. Por ello, la búsqueda de soluciones sostenibles y menos contaminantes que contribuyan a la descarbonización del sector es esencial.

El uso de la electricidad es una alternativa prometedora para reducir las emisiones de CO₂ (Yabe *et al.*, 2012). Sin embargo, los biocarburantes siguen siendo la alternativa energética más viable para reducir dichas emisiones (Ahlgren *et al.*, 2017). De acuerdo al modelo de movilidad desarrollado por la Agencia Internacional de la Energía (AIE) para cumplir con el acuerdo de París, el 30,7% de la energía en el transporte provendrá de los biocarburantes, seguido de la electricidad, con una contribución del 27%. Para cubrir esta futura demanda, la producción de biocarburantes debería multiplicarse por diez (Oh *et al.*, 2018).

La nueva Directiva Europea Renovable “REDII” (CE, 2018b) fija un porcentaje de energía de fuentes renovables en el mix energético europeo del 32% para el año 2030, especificando la necesidad de incrementar la cuota de renovables en sectores difusos como el transporte, la calefacción y la refrigeración. En materia de biocombustibles, se establece la eliminación gradual del uso de biocombustibles que provoquen un cambio indirecto en el uso del suelo y el impulso de biocombustibles, denominados “avanzados”.

Actualmente, el 90% del total de los biocarburantes producidos y comercializados (bioetanol y biodiésel) provienen de biomasa de uso alimentario y son denominados “biocarburantes de primera generación”. El uso de alimentos como sustratos generó gran polémica y un fuerte debate asociado a la controversia existente entre “alimentación vs. combustibles”. Este problema los convierte en una alternativa inviable y carente de sostenibilidad para abastecer la futura demanda de biocarburantes, por motivos económicos, medioambientales, éticos y sociales (Ho *et al.*, 2014; Nanda *et al.*, 2015). Por ello, se trabaja en el desarrollo de un nuevo escenario enfocado en la obtención de biocarburantes a partir de materias primas alternativas de bajo coste y ampliamente disponibles como son los cultivos lignocelulósicos, la biomasa residual de origen agrario, agroalimentario o urbano y la biomasa derivada de algas.

Otra importante barrera para los biocarburantes de primera generación es su complicada implementación en las actuales estructuras de distribución y almacenamiento para carburantes fósiles. Tanto las características físico-químicas como el contenido energético del bioetanol y el biodiésel son muy diferentes a los de los carburantes fósiles tradicionales, lo que modifica las propiedades de la mezcla final y limita la proporción de biocarburante en la mezcla, con el fin de prevenir problemas en los motores convencionales e infraestructuras de almacenamiento (Ranjan y Moholkar, 2012).

Como solución a estos dos problemas, se ha planteado el desarrollo de nuevos biocarburantes “avanzados”. El Subgrupo de Trabajo de Biocarburantes Avanzados (SGBA) del foro para el transporte sostenible constituido por la CE define los biocarburantes avanzados como “aquellos producidos a partir de biomasa no procedente de cultivos alimentarios que cumplen con el régimen de sostenibilidad de la UE conforme a la legislación vigente y que presentan unas características superiores a los biocarburantes actuales” (Maniatis *et al.*, 2017).

En el caso de los alcoholes obtenidos por vía fermentativa, se trabaja en su producción a partir de materias primas no alimentarias (o de segunda generación) tanto en el caso del etanol, como más recientemente, en el del butanol. El butanol tiene unas propiedades carburantes muy superiores a las del etanol (Dürre, 2007; Ranjan y Moholkar, 2012; Sarangi y Nanda, 2018). Este alcohol de 4 átomos de carbono tiene un contenido energético un 30% mayor que el etanol, es menos corrosivo, volátil e inflamable y, por tanto, menos peligroso e higroscópico (Ranjan y Moholkar, 2012; Nanda *et al.*, 2014). Dadas su baja presión de vapor y volatilidad, el butanol puede utilizarse en las actuales tuberías de suministro de gasolina y mezclarse, tanto con gasolina como con diésel, en cualquier proporción en los motores de combustión actuales (Lee *et al.*, 2008; Qureshi y Ezeji, 2008; Sarangi y Nanda, 2018).

Las principales propiedades carburantes de varios combustibles oxigenados se muestran en la Tabla 1.1., donde se observa que las del butanol son más similares a las de la gasolina que las del resto de biocarburantes evaluados.

Tabla 1.1. Comparación de propiedades de distintos carburantes líquidos (Ranjan y Moholkar, 2012).

Carburante	Fórmula	Densidad energética (MJ/L)	Relación Aire /Carburante	Calor de vaporización (MJ/kg)	Índice de Octano Experimental	Índice de Octano Motor	Punto de Ebullición (°C)
Gasolina	H, C ₄ -C ₁₂	32	14,6	0,36	91 – 99	81 – 89	32 – 210
Butanol	C ₄ H ₉ OH	29,2	11,2	0,43	96	78	118
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	19,6	9	0,92	129	102	78
Metanol	CH ₃ OH	16	6,5	1,2	136	104	65

1.2. Suero lácteo

El suero lácteo o lactosuero, principal subproducto de la industria láctea, es la fracción líquida resultante de la coagulación de la caseína de la leche durante la producción de queso o caseína de leche (De Wit, 2001). El lactosuero es un líquido de carácter ácido y color amarillo-verdoso, que contiene alrededor del 55% de los nutrientes presentes en la leche, fundamentalmente lactosa (4,5 – 5,0% p/v), proteínas solubles (0,6 – 0,8% p/v),

lípidos (0,4 – 0,5% p/v) y sales minerales (8 – 10% de extracto seco) (De Jesus *et al.*, 2015). La composición y el tipo de suero dependerán del origen de la leche (cabra, oveja, vaca, búfala, etc.), el tipo de queso elaborado y la tecnología de producción empleada (De Wit, 2001; Pescuma *et al.*, 2015).

El suero lácteo representa un importante problema medioambiental dados los elevados volúmenes generados y su alto contenido orgánico (Prazeres *et al.*, 2012; Ahmad *et al.*, 2019). Se estima que por cada kilogramo de queso producido se generan 9 litros de suero (Gonzalez-Siso, 1996). A nivel mundial se producen anualmente en torno a 205 millones de toneladas de suero lácteo, alcanzando los 90 millones de toneladas sólo en la UE-28 (OCDE-FAO; 2018). La elevada carga orgánica está vinculada fundamentalmente a la lactosa, que representa el 75% de los sólidos del suero y en menor medida a la proteína y la grasa (De Jesus *et al.*, 2015). El suero lácteo se caracteriza por presentar unos valores de demanda química de oxígeno (DQO) de alrededor de 30 – 50 g/L y una demanda biológica de oxígeno (DBO₅) de 60 – 80 g/L (Prazeres *et al.*, 2012).

El aprovechamiento del lactosuero supone un gran desafío tanto económico como medioambiental para la industria láctea. Dadas su elevada concentración de macronutrientes, el suero es una importante fuente de ingredientes de alto valor añadido y un interesante sustrato para procesos bioquímicos. Por otra parte, la elevada carga orgánica puede causar importantes problemas de polución en el aire, el suelo y la calidad del agua si se producen vertidos inadecuados (Chen *et al.*, 2018). La regulación medioambiental vigente impide su vertido directo (CE, 1996). Por este motivo, la gestión del suero ha evolucionado hacia la búsqueda de soluciones integradas y circulares que consideran este efluente como un recurso valioso, en lugar de una corriente residual (Singh, 2014; Yadav *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2019). La producción de suero aumenta anualmente un 1 – 2%; sin embargo, menos del 50% del total producido es valorizado (Panghal *et al.*, 2017), lo que genera una importante pérdida de nutrientes valiosos. Se estima que anualmente se desaprovechan más de 4 millones de toneladas de lactosa y 0.6 millones de toneladas de proteína de alta calidad (Macwan *et al.*, 2016). Este ineficiente uso de recursos tiene graves implicaciones sobre la sostenibilidad, además de suponer un fuerte problema de contaminación ambiental, contribuyendo al cambio climático y a la propagación de enfermedades (Al-Wasify *et al.*, 2018). Por todo ello,

desarrollar e implementar comercialmente un uso sostenible del lactosuero, está especificado como uno de los objetivos de desarrollo sostenible (ONU, 2015b).

1.3. Valorización del suero lácteo

En la Figura 1.1, se muestra un esquema de las principales alternativas de procesado y valorización del lactosuero implementadas industrialmente. El principal uso del suero líquido no procesado es la alimentación animal, aunque su transporte a largas distancias es difícil de manejar, no resulta económico y es poco sostenible ambientalmente. Por este motivo, la concentración del lactosuero mediante evaporación u osmosis inversa hasta el 20 – 40%, es una práctica muy extendida que permite reducir los costes de almacenamiento y transporte (Cheryan y Alvarez, 1995). Otra importante fracción del suero se seca hasta obtener suero en polvo para alimentación humana y animal. En este formato se conservan todas las cualidades del suero fresco y se facilitan su almacenamiento, manipulación y transporte, a pesar del elevado coste energético (Gonzalez-Siso, 1996).

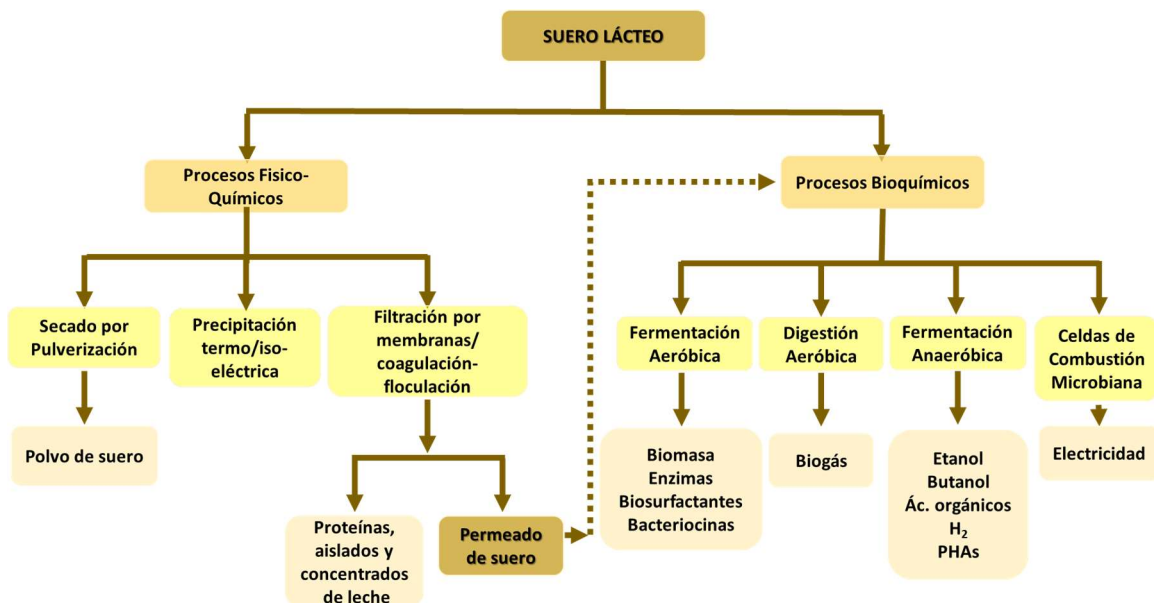


Figura 1.1. Esquema de valorización fraccionada e integral de suero lácteo (Adaptado de Yadav et al., 2015).

Cuando se plantea una valorización fraccionada de nutrientes, una de las primeras etapas es la recuperación de la fracción proteica. El suero contiene alrededor del 20% de las proteínas de la leche, con un elevado valor nutricional y un importante potencial terapéutico. La tecnología de membrana (ultrafiltración y diafiltración) es el método de separación más utilizado, recuperando concentrados de proteína de suero con múltiples aplicaciones en la industria alimentaria (Cheryan y Alvarez, 1995; Gonzalez-Siso, 1996) y no alimentaria, incluyendo productos cosméticos y farmacéuticos. Del proceso de separación de las proteínas, se generan como subproducto grandes cantidades de permeado de suero, una corriente rica en lactosa, que contiene más del 70% del total de sólidos presentes en el suero. Esta corriente es la principal responsable de los problemas de vertido, tanto por los volúmenes generados como por su elevada carga contaminante, generando un problema ambiental similar al del lactosuero (Prazeres *et al.*, 2012; Pescuma *et al.*, 2015; Parashar *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2019).

La lactosa es el azúcar presente en la leche. Este disacárido está formado por una molécula de glucosa y una molécula de galactosa, y se define químicamente como O-β-D-galactopiranosil-(1→4)- β-D-glucopiranososa, C₆H₂₂O₁₁ (Adam *et al.*, 2005; Gänzle *et al.*, 2008). Casi la totalidad de la lactosa se recupera por cristalización. Sin embargo, la demanda de lactosa purificada representa sólo el 5% del total de suero disponible (Adam *et al.*, 2005). La lactosa purificada se utiliza fundamentalmente como ingrediente alimentario, para la formulación de alimentos infantiles, agente de relleno o recubrimiento en la industria farmacéutica. También puede emplearse como sustrato para la producción de derivados de la lactosa como lactulosa, lactitol o ácido lactobiónico (Nooshkam *et al.*, 2018) o el desarrollo de hidrolizados de lactosa (Gänzle *et al.*, 2008). Otra importante aplicación de la lactosa presente en el lactosuero o en el permeado de suero es su uso como sustrato de procesos fermentativos para la obtención de bioproductos de alto valor añadido (Yadav *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2019).

1.4. Aplicaciones biotecnológicas del suero lácteo y el permeado de suero

La lactosa ha sido utilizada como sustrato de múltiples procesos fermentativos para obtener bioproductos tan diversos como biogás, ácidos orgánicos (acético, propiónico,

láctico, cítrico, glucónico, etc.), hidrógeno, alcoholes (etanol, butanol, 2-butanodiol, glicerol, etc.), vitaminas, enzimas (β -galactosidasa y poligalacturonasa), proteínas unicelulares (SCP) o polihidroxialcanatos (PHAs), utilizando distintos microorganismos (Pescuma *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2015; De Jesus *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2019).

Los procesos fermentativos se caracterizan por ser altamente intensivos en el uso de capital y presentar bajos rendimientos de reacción (Westman y Franzen, 2015), motivo por el que el desarrollo de aplicaciones a escala piloto o industrial está muy limitado (Singh, 2014). La mayoría de publicaciones que describen la utilización de lactosuero o permeado de suero lácteo en procesos fermentativos son de carácter científico o a escala de laboratorio, a excepción de algunas instalaciones industriales de producción de etanol en Irlanda, Nueva Zelanda o EE.UU. (Parashar *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2016).

La conversión de la lactosa en bioalcoholes mediante procesos fermentativos para su uso como biocarburante, puede ser una alternativa interesante, viable y sostenible para la reutilización de este subproducto industrial (Mollea *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2016). Sin embargo, estos procesos son complejos e incluyen etapas de pretratamiento como la deshidratación y desmineralización (Jelen, 2009). Entre los principales inconvenientes del proceso están las bajas concentraciones de etanol en el caldo de fermentación, la baja tolerancia osmótica de las levaduras y los prolongados tiempos de fermentación (Ling, 2008; Prazeres *et al.*, 2012; Parashar *et al.*, 2016;).

Simplificar el proceso, utilizando tecnologías alternativas y novedosas que reduzcan las etapas de pretratamiento, mejorará el atractivo y el desarrollo comercial de la fermentación de la lactosa. Algunas de las estrategias que deben estudiarse para aumentar el rendimiento y la productividad global de los bioprocesos comprenden el cultivo a alta densidad celular y/o el empleo de cepas microbianas modificadas genéticamente o adaptadas evolutivamente, que permitan mejorar los rendimientos de transformación de la lactosa y reducir las inhibiciones por sustrato o producto (Westman y Franzen, 2015; Das *et al.*, 2016; Parashar *et al.*, 2016; Saini *et al.*, 2017).

1.5. Fermentación de lactosa a etanol

La producción mundial de etanol está en torno a 97 millones de m³ anuales (Datos de 2016. Alternative Fuel Data Center. <https://www.afdc.energy.gov/data/?q=ethanol>). El

bioetanol se produce por vía fermentativa a partir de materias primas agrícolas tanto de origen amiláceo (60%), maíz y trigo, fundamentalmente, como de azúcares simples procedentes de la caña de azúcar o la remolacha (40%) (Vohra *et al.*, 2014). Entre las principales aplicaciones del etanol están su uso como carburante (> 80%), la industria química (10%) y la industria alimentaria (9%). El principal productor mundial de etanol es EE.UU. (58% de la producción total), obtenido en un 98% a partir de grano de maíz, seguido de Brasil (28% del total de la producción) a partir de caña de azúcar (OCDE, 2018) y la UE-28, con una producción del 5,4% del total, obtenido fundamentalmente a partir de maíz (43%), trigo (26%) y jugos azucarados (21%) (ePure, 2019).

Una de las principales barreras al etanol derivado de materias primas alimentarias es la limitación en el suministro de las mismas y la inestabilidad de los precios (Vohra *et al.*, 2014). Se calcula que en torno al 75% de los costes de producción de los biocombustibles corresponde al abastecimiento de la materia prima. Por lo tanto, su adecuada selección es crucial para garantizar la competitividad final de los biocarburantes (Hirani *et al.*, 2018).

El uso de materias primas alternativas no-alimentarias de bajo coste y ampliamente disponibles como son los residuos agrícolas, los cultivos energéticos o los residuos agroalimentarios es a la vez una necesidad y una oportunidad para la industria del bioetanol teniendo en cuenta las tres dimensiones de la sostenibilidad: económica, ambiental y social (Baker *et al.*, 2017).

Aunque la conversión de lactosa en etanol por vía fermentativa a partir de lactosuero o permeado de suero no es económicamente competitiva frente al uso de los sustratos tradicionales como son el almidón de maíz o caña de azúcar (Das *et al.*, 2016; Parashar *et al.*, 2016). Sin embargo, la fermentación de corrientes residuales de permeado de suero a etanol bajo un criterio de biorremediación, utilizando tecnologías mejoradas, puede ser una alternativa interesante (Guimarães *et al.*, 2010; Pasotti *et al.*, 2017).

Se estima que en torno al 55% de la lactosa presente en el suero lácteo es lactosa excedentaria no valorizada (Ling, 2008). Así, la cantidad disponible para emplear como sustrato en procesos fermentativos es superior a 5,5 millones de toneladas anuales. Considerando una eficiencia de conversión a etanol del 85%, se podrían obtener

anualmente en torno a 2,6 millones de m³ de etanol, lo que supone cerca de 2,7% de la producción total de 2016.

La viabilidad económica de la fermentación directa de lactosuero o permeado de suero a etanol está fuertemente comprometida debido a su baja concentración en lactosa, generando concentraciones de etanol a su vez bajas (2 – 3% v/v), siendo necesarios procesos de destilación muy costosos energéticamente (Risner *et al.*, 2018; Tomaszewska y Białończyk, 2016). La búsqueda de nuevas estrategias que mejoren la productividad y el rendimiento global, unida a una disminución de los costes de operación y de inversión, son aspectos en los que es necesario continuar trabajando (Gabardo *et al.*, 2014).

Aumentar la concentración final de etanol en el caldo de fermentación es imprescindible. Para lograrlo, se deben utilizar concentraciones de lactosa superiores a las que presenta el lactosuero. La concentración de lactosa se puede aumentar fácilmente empleando tecnologías de membrana como la ultrafiltración o la osmosis inversa. Trabajar con concentraciones de sustrato muy elevadas como plantean las tecnologías de Fermentación a Alta Densidad (de las siglas en inglés Very High Gravity, VHG) permite obtener una elevada concentración de producto, reduciendo significativamente los consumos de agua y energía, aunque pueden producirse problemas importantes de inhibición microbiana (Zhang *et al.*, 2015). Por otro lado, favorecer el desarrollo de fermentaciones rápidas aumentará la productividad final, garantizando la viabilidad económica del proceso.

Los procesos continuos ofrecen importantes ventajas frente a los procesos discontinuos, como la mejora de los rendimientos de fermentación, la reducción de los tiempos de procesamiento y las pérdidas de producto (Gabardo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). La inmovilización celular es una estrategia muy interesante para mejorar la productividad, ya que aumenta la estabilidad microbiana, al proteger a los microorganismos de inhibiciones y variaciones ambientales, a la vez que permite trabajar con reactores de menor tamaño y disminuir los tiempos de reacción y de latencia durante el crecimiento microbiano, lo cual contribuye a reducir los costes de operación (Mussatto *et al.*, 2010; Es *et al.*, 2015). No obstante, para el diseño de procesos de fermentación empleando permeado lácteo concentrado es imprescindible establecer un compromiso entre maximizar la producción y la productividad del proceso con el consumo de lactosa;

minimizando la concentración de lactosa residual en el efluente, ya que debe cumplir con el doble objetivo de valorización de corrientes residuales y de producción de biocarburantes.

La primera referencia a la producción de etanol a partir de lactosuero data de 1939 y utiliza una levadura que directamente transformaba lactosa a etanol (Willem y Van Der, 1939. U.S. Patent 2,183,141). La especie *Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizada durante milenios para la producción de bebidas y es el principal microorganismo empleado para producir bioetanol (Radecka *et al.*, 2015). Sin embargo, al igual que otras muchas levaduras, tiene la capacidad de asimilar lactosa, pero no de metabolizarla a etanol. Muy pocas especies fermentan lactosa directamente a etanol, destacando las cepas de la especie *Kluyveromyces marxianus* (que actualmente incluye a la antigua especie *K. fragilis*) y su forma anamorfa *Candida pseudotropicalis* (Zafar y Wais, 2006).

1.5.1. Bioquímica de la fermentación alcohólica

La capacidad para metabolizar naturalmente lactosa se debe a la presencia de dos genes, *LAC12* y *LAC4*, que codifican las enzimas lactosa-permeasa y β -galactosidasa, respectivamente (Rubio-Teixeira, 2006). La lactosa-permeasa se encarga de transportar la lactosa a través de la membrana citoplasmática hacia el interior de la célula. La β -galactosidasa es la enzima responsable de la hidrólisis de la molécula de lactosa en dos monómeros, glucosa y galactosa. Ambos monómeros se metabolizan por la vía glicolítica Embden-Meyerhof-Parnas (E-M-P), aunque la galactosa sigue previamente la ruta Leloir, transformándose previamente en el metabolito glicolítico glucosa-6-fosfato (Frey, 1996; Rubio-Teixeira, 2006; Bai *et al.*, 2008), tal y como se muestra en la Figura 1.2.

La especie *Kluyveromyces* pertenece al grupo de levaduras no convencionales o no-*Saccharomyces* con gran potencial para aplicaciones industriales (Spencer *et al.*, 2002). *Kluyveromyces marxianus* presenta atributos de gran interés, como su termotolerancia hasta temperaturas de 45 °C, su elevada tasa de crecimiento, su capacidad para metabolizar una amplia variedad de carbohidratos como pentosas, hexosas y disacáridos (Lane y Morrissey, 2010; Radecka *et al.*, 2015) y su estado GRAS (generalmente reconocido como seguro) para la producción de proteínas (FDA, 2018; EFSA, 2018). Estas propiedades hacen que sea particularmente adecuada para fines industriales, como la

producción de compuestos farmacéuticos, proteínas de grado alimenticio, enzimas (β -galactosidasa, β -glucosidasa, inulina y poligalacturonasas, entre otras), proteínas monocelulares y bioetanol (Fonseca *et al.*, 2008). Tradicionalmente, *K. marxianus* ha sido clasificada como una levadura Crabtree negativa, aunque su capacidad respiro-fermentativa ha generado cierta controversia (Lane *et al.*, 2011; Radecka *et al.*, 2015). Además, esta especie presenta el efecto Kluver positivo para las pentosas y para la lactosa en ciertas etapas (Lane *et al.*, 2011; Pentjuss *et al.*, 2017).

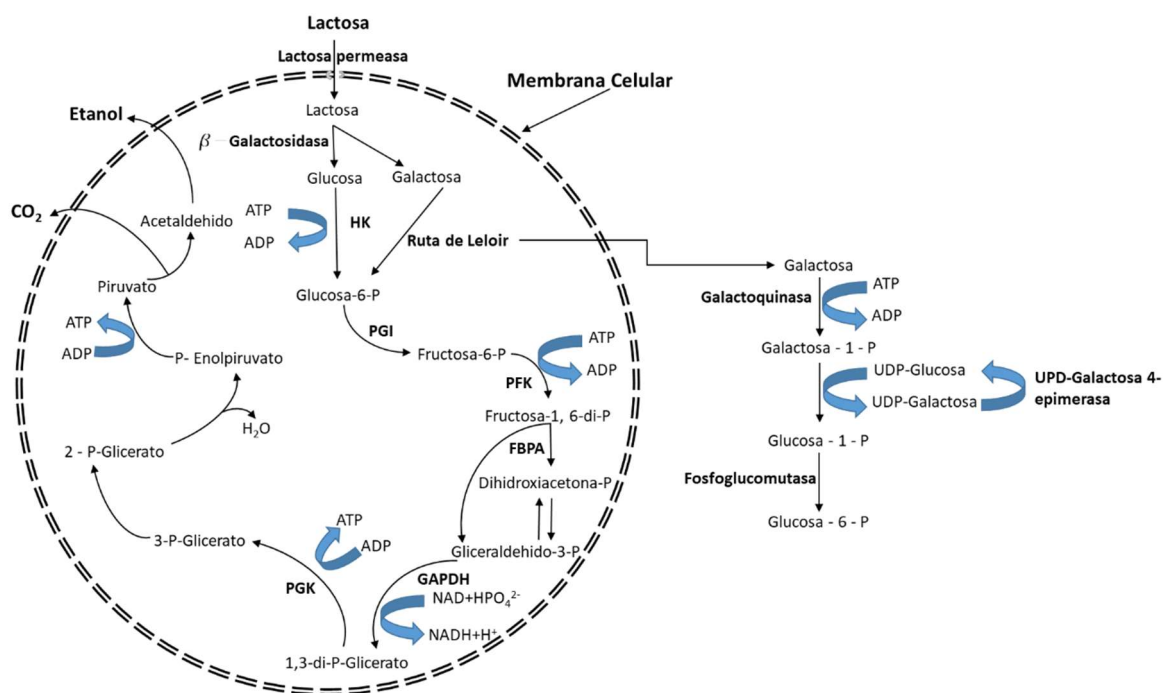


Figura 1.2. Ruta metabólica de fermentación de lactosa a etanol (Adaptado de: Frey, 1996; Rubio-Teixeira, 2006; Bai *et al.*, 2008).

Las enzimas: HK: hexoquinasa, UDP-galactosa: uridina difosfato lactosa, PGI: fosfoglicosa isómera, PFK: fosfofructoquinasa, FBPA: fructosa-bisfosfato aldolasa, TPI: triosa-fosfato isomerasa, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa, PGK: fosfoglicerato quinasa, PGM: fosfoglicerato mutasa, ENO: enolasa, PYK: piruvato quinasa, PDC: piruvato descarboxilasa, ADH: alcohol deshidrogenasa.

La bioconversión de lactosa a etanol a partir de las levaduras *Kluveromyces* spp. y *S. cerevisiae* ha sido ampliamente investigada. La mayoría de los trabajos se han centrado en el empleo de cepas de la especie *K. marxianus*, identificándose problemas de inhibición cuando se trabaja con concentraciones de lactosa elevadas (superiores a 100 g/L),

asociados a fermentaciones lentas con ineficiente consumo de azúcares (Silveira *et al.*, 2005; Ozmihci y Kargi, 2007; Dragone *et al.*, 2011; Gabardo *et al.*, 2014). Asimismo, a pesar de su incapacidad para metabolizar lactosa a etanol, hay un gran interés en emplear *S. cerevisiae* para este tipo de fermentación dado que: a) presenta una buena productividad y tolerancia al etanol (> 20% v/v); b) su estado GRAS; c) su rápido crecimiento en condiciones anaerobias; d) su generalizado uso industrial; y e) es uno de los microorganismos mejor conocidos y más estudiados (Guimarães *et al.*, 2008; Walker y Stewart, 2016). Inicialmente las estrategias se centraron en una hidrólisis preliminar de la lactosa en sus monómeros. Sin embargo, los avances biomoleculares han derivado los estudios hacia la construcción de cepas modificadas genéticamente con capacidad de metabolizar lactosa (Guimarães *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012).

Múltiples estrategias han sido evaluadas para obtener etanol a partir de lactosa empleando tanto *K. marxianus* como *S. cerevisiae*. Como sustratos de fermentación se han empleado, tanto lactosuero crudo (Zafar y Owais, 2006; Sansonetti *et al.*, 2009; Gabardo *et al.*, 2014) como diversos subproductos, incluyendo el suero en polvo reconstituido (Kargi y Ozmihci, 2006; Ozmihci y Kargi, 2007; Dragone *et al.*, 2011) y el permeado de suero (Silveira *et al.*, 2005; Diniz *et al.*, 2013). La suplementación con nutrientes esenciales del suero o el permeado de suero no es necesaria cuando se trabaja con *K. marxianus* al tratarse de un sustrato rico en macro y micro-nutrientes (Gabardo *et al.*, 2014). Sin embargo, algunos autores consideran esencial la adición de nutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo, así como algunas vitaminas, que favorecen el crecimiento celular, el consumo de lactosa y aumentan la producción de etanol (Parrondo *et al.*, 2009). Con el objeto de mejorar el rendimiento del proceso fermentativo, distintas configuraciones de reacción han sido evaluadas, en procesos discontinuos (Ghaly y El-Taweel, 1995; Zafar y Owais, 2006; Sansonetti *et al.*, 2009) y en biorreactores continuos con inmovilización celular bajo diversos soportes (Ozmihci y Kargi, 2008, 2009; Sansonetti *et al.*, 2013; Gabardo *et al.*, 2014, 2015).

A pesar de los trabajos científicos publicados, hay pocas instalaciones que produzcan etanol a partir de suero lácteo o sus subproductos. La primera planta industrial de producción de etanol a partir de suero de leche fue construida en 1978 por el grupo Carbery Milk Products Ltd. en Irlanda para producir etanol tanto para uso alimentario

como para uso biocarburante, con una producción anual en torno a los 11 millones de litros (www.carbery.com). El proceso Carbery, consistente en la fermentación de permeado de suero desproteinizado utilizando *K. marxianus* para la fermentación de lactosa, fue trasladado a Nueva Zelanda y Estados Unidos. En Estados Unidos hay dos plantas de etanol a partir de suero de escala industrial construidas en la década de 1980 y operadas por la cooperativa láctea Dairy Farmers of America (DFA), con una producción de aproximadamente 30 millones de litros anuales (<http://www.dfamilk.com>). En 2007, el grupo cooperativo Fonterra a través de su división Anchor Ethanol Ltd., comenzó a comercializar 17 millones de litros de etanol anuales para su uso en la industria cosmética, farmacéutica y química (<https://www.fonterra.com/nz/en.html>). Asimismo, el grupo Theo Müller, comenzó a operar en 2007 una planta de producción de bioetanol a partir de sus residuos lácteos, con una producción de 10 millones de litros anuales en Alemania (<https://www.muellergroup.com/>).

1.5.2. Fermentación de alta o muy alta densidad

La incorporación de tecnologías de fermentación de alta densidad o muy alta densidad [del inglés “high gravity” (HG) o “very high gravity” (VHG)], implica una importante mejora de la productividad de la fermentación alcohólica y una significativa disminución de los requerimientos de agua de los procesos (Puligundla *et al.*, 2019). Esta tecnología ofrece altos rendimientos de etanol, baja generación de residuos, menor coste de operación y una reducción del equipamiento requerido (Arshad *et al.*, 2017). Sin embargo, la generación de una mayor concentración de etanol resulta inhibitoria para la actividad de las levaduras, reduciendo el rendimiento final del proceso y la eficiencia de la fermentación. El mayor desafío de la fermentación HG/VHG es el control y la eliminación del estrés osmótico celular derivado de la elevada concentración de azúcar al inicio de la fermentación y el estrés por concentración elevada de etanol al final del proceso (Puligundla *et al.*, 2019).

Una alternativa efectiva para aliviar los efectos de una elevada presión osmótica sobre las levaduras es la de suplementar el medio de cultivo con diversos nutrientes, tales como amonio, urea, extracto de levadura o harina de soja, los cuales mejoran la viabilidad y la

tasa de crecimiento celular, así como la tasa de producción de etanol (Deesuth *et al.*, 2015; Phukoetphim *et al.*, 2017), aunque se encarezca el proceso.

Para reducir los costes de producción es imprescindible trabajar con sustratos de bajo coste y utilizar suplementos nutricionales de nitrógeno baratos. Además, la selección de cepas osmotolerantes altamente productoras de etanol y el establecimiento de estrategias de control también resultan recomendables (Puligundla *et al.*, 2019). El uso de técnicas de inmovilización celular está ampliamente documentado como un método efectivo para evitar inhibiciones, tanto por sustrato como por producto. Por lo tanto, la combinación de ambas técnicas permitirá mejorar el rendimiento de la fermentación consiguiendo un proceso más eficiente y sostenible.

1.6. Fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE)

La producción de butanol mediante fermentación microbiana fue publicada por primera vez por Louis Pasteur en 1861 (Gabriel, 1930). Sin embargo, el gran avance en este proceso se logró entre 1912 y 1914, cuando Weizmann consiguió aislar una cepa bacteriana de *Clostridium acetobutylicum*, que posteriormente se convertiría en el caballo de batalla de la fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE) a escala industrial, capaz de utilizar diversos sustratos, incluyendo el almidón, con un rendimiento de butanol superior a otras cepas (Jones y Woods, 1986). La creciente demanda de solventes para producir munición durante la I y II Guerra Mundial, unida a la rápida expansión de la industria del automóvil, provocó que la fermentación ABE se convirtiese en el segundo proceso fermentativo industrial más importante, después de la fermentación alcohólica, durante la primera mitad del siglo XX (Green, 2011). Además, la fermentación ABE tuvo un papel muy destacado en el desarrollo de la industria bioquímica, ya que fue el precursor de la fermentación industrial a gran escala en condiciones asépticas, dada la naturaleza anaerobia del proceso (Lee *et al.*, 2008).

En los años 1950, la fermentación ABE fue drásticamente desplazada por la industria petroquímica, la cual producía grandes cantidades de acetona y butanol a precios muy bajos. Esto unido a la escalada de precios de los sustratos de fermentación de origen alimentario (Green, 2011) ocasionó que dicha fermentación a nivel industrial fuese

progresivamente abandonada y sólo se mantuviera a pequeña escala en China (Ni y Sun, 2009; Wong *et al.*, 2017).

No obstante, en las últimas dos décadas, el interés de la industria y la comunidad científica sobre la fermentación ABE ha resurgido a causa de la preocupación por el agotamiento de las reservas de petróleo y sus elevadas fluctuaciones de precio (Ni y Sun, 2009). Sin embargo, actualmente su empleo a escala industrial se encuentra limitado por varios factores que comprometen de forma importante su viabilidad económica frente a los procesos petroquímicos. Entre los principales factores destacan: el elevado coste de los sustratos tradicionalmente empleados (maíz y melazas), la baja concentración de butanol en el caldo de fermentación, el bajo rendimiento y productividad volumétrica y el elevado coste asociado a la recuperación de solventes, debido a la gran variedad presente en el caldo de fermentación, así como al elevado punto de ebullición del butanol (Lee *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2011; Ezeji *et al.*, 2013; Becerra *et al.*, 2015).

Para tratar de reducir estas limitaciones, la investigación actual se dirige hacia la mejora global del proceso mediante el empleo de sustratos más baratos, el uso de las cepas microbianas más adecuadas para cada sustrato, el empleo de técnicas de mejora genética microbiana y la utilización de estrategias de recuperación de productos más eficientes (Ranjan y Moholkar, 2012; Kujawska *et al.*, 2015; Becerra *et al.*, 2015).

Ni y Sun (2009) listaron once empresas dedicadas a la producción de butanol por vía fermentativa en la República Popular China, además de dos proyectos en ejecución y dos proyectos en planificación. Otro proyecto comercial destacado es el de Saudi Butanol Company (SABUCO) que produce en Arabia Saudí, desde 2016, anualmente 330.000 toneladas de butanol y 11.000 toneladas de iso-butanol (<https://www.saharapcc.com/en/pages.aspx?pageid=52>). En fase de diseño o construcción hay proyectos como el de SGBio Renewable [Joint Venture entre GranBio (Brasil) y Rhodia (Bélgica)], que ha adquirido la empresa de base tecnológica americana Cobalt para el desarrollo de instalaciones en Brasil y Estados Unidos o el de Green Biologist (Reino Unido) que ha adquirido la cooperativa Central MN Ethanol en Minnesota (Estados Unidos) para transformar la instalación y producir 65.000 toneladas/año de butanol.

1.6.1. Bioquímica de la fermentación ABE

En condiciones discontinuas, la fermentación ABE se desarrolla en dos etapas: una primera etapa de acidogénesis asociada con un rápido crecimiento celular y con una secreción de ácidos carboxílicos, acetato y butirato, hidrógeno y CO₂ y una segunda etapa de solventogénesis, que se corresponde con la producción de solventes; la transición entre etapas ocurre a pH bajo (Jones y Woods, 1986). Durante la transición, el metabolismo celular se disocia para la reproducción celular de células acidogénicas y la producción de solventes, modificándose para ello su morfología, convirtiéndose las células activas en endoesporas incapaces de reproducirse, pero capaces de metabolizar ácidos y nutrientes para producir solventes (Ross, 1961) (Figura 1.3.).

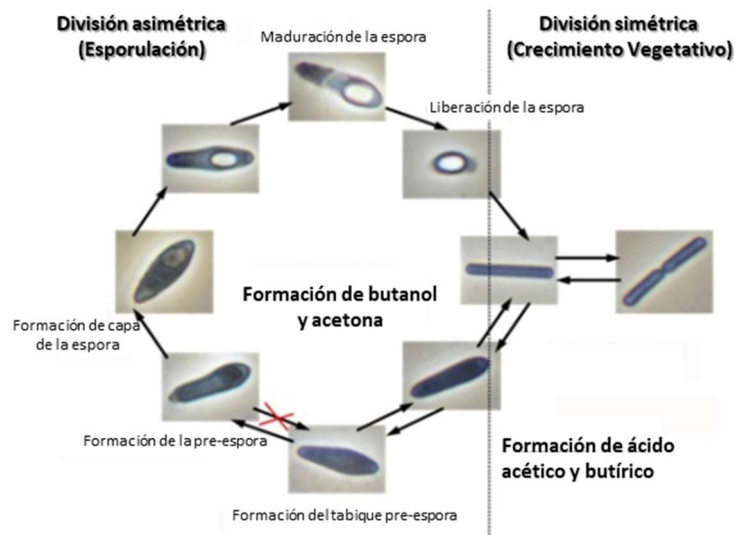


Figura 1.3. Ciclo de vida de Clostridium spp. (Patakova et al. (2011)).

La ruta metabólica de *C. acetobutylicum* a partir de lactosa se muestra en la Figura 1.4. La lactosa presente en el medio circula a través de la membrana del microorganismo por difusión, la β -galactosidasa facilita su división en sus monómeros (glucosa y galactosa). La glucosa se oxida directamente a piruvato mediante la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (Jones y Woods, 1986). Asimismo, la galactosa es transformada en glucosa-1-fosfato a través de la vía de Leloir. El piruvato, formado durante la glucólisis (vía EMP), se escinde por la acción de la enzima ferredoxina oxidoreductasa piruvato en presencia de

la coenzima-A (CoA) produciendo CO₂, acetyl-CoA y ferredoxina reducida. El pH del medio disminuye a medida que se producen estas conversiones, con la acumulación de ácidos butírico y acético. Estos ácidos pueden penetrar la membrana celular y activan la fase solventogénica (Jones y Woods, 1986; Mitchell, 1997).

Durante la solventogénesis, los productos de la fase acidogénica son reasimilados y convertidos en acetona y butanol. La enzima que cataliza esta conversión es la CoA transferasa. Durante las etapas de oxidación, tanto la glucosa como la galactosa se transforman a piruvato de modo equivalente.

Los productos obtenidos durante la acidogénesis y la solventogénesis provocan la inhibición de la reacción cuando se alcanza una determinada concentración en el medio fermentado (Jones y Woods, 1986). La presencia de butanol genera un aumento de la fluidez de la membrana celular provocando su desestabilización (Haggstrom, 1985). Para la mayoría de cepas de *Clostridium* spp., la cantidad máxima de solventes que las células pueden tolerar se sitúa en torno a 20 g/L. Este valor limita la cantidad máxima de azúcar utilizable por lote de fermentación situándola en torno a 60 g/L (Jones y Woods, 1986). Para evitar el problema de la toxicidad generada por el butanol, se utiliza la eliminación continua de solventes del caldo de fermentación o el desarrollo de cepas más resistentes y tolerantes al butanol.

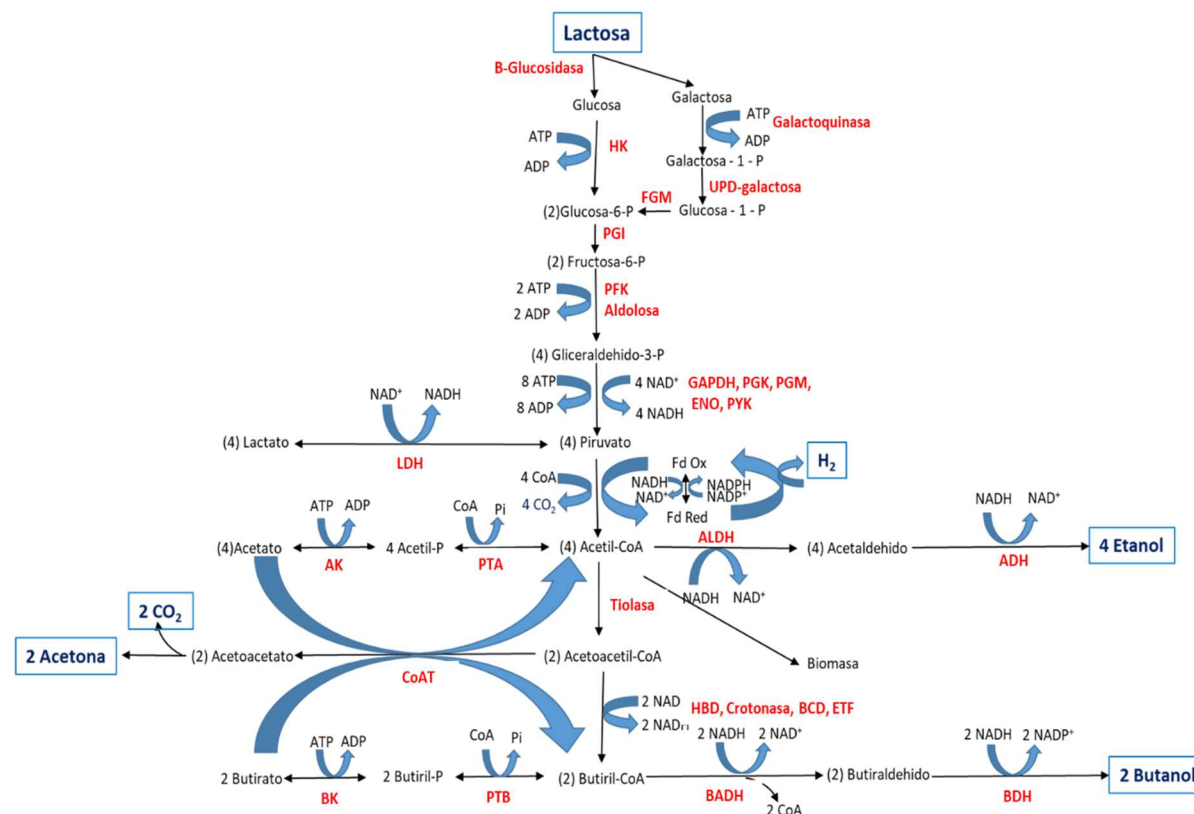


Figura 1.4. Rutas metabólicas de la lactosa en *Clostridium* spp. (en el interior de las cajas se muestran los compuestos extracelulares) (Adaptado de: Napoli, 2009; Corrales *et al.*, 2015 y Zhang *et al.*, 2018).

Las enzimas: HK: hexoquinasa, UDP-galactosa: uridina difosfato galactosa, FGM: Fosfoglucomutasa, PGI: fosfoglicerato isómera, PFK: fosfofrutoquinasa, GAPDH: gliceralehído-3-fosfato deshidrogenasa, PGK: fosfoglicerato quinasa, PGM: fosfoglicerato mutasa, ENO: enolasa, LDH: Lactato deshidrogenasa, ALDH: aldehído deshidrogenasa, ADH: alcohol deshidrogenasa, PTA: fosfotransacetilasa, AK: Acetatoquinasa, CoAT: CoA transferasa, HBD: hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, BCD: Butiril-CoA deshidrogenasa, ETF: Flavoproteína de transferencia de electrones, PTB: Fosfotransbutirilasa; BK: Butiratoquinasa, BADH: Butiraldehído deshidrogenasa y BDH: Butanol deshidrogenasa.

1.6.2. Microorganismos

Varias especies del género *Clostridium* tienen la capacidad de metabolizar compuestos orgánicos, incluyendo azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos o polialcoholes, en determinadas condiciones de operación para producir acetona, butanol, isopropanol y etanol durante la última fase de la fermentación. Sin embargo, relativamente pocas especies (incluyendo los mutantes de las especies más conocidas) se usan a nivel industrial (Dürre, 1998). Tras exhaustivos estudios taxonómicos, las cepas de interés industrial se clasificaron en cuatro especies: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* y *C. saccharobutylicum* (Mitchell *et al.*, 1997; Karakashev *et al.*, 2007). La especie *C. acetobutylicum* es la más adecuada para sustratos a base de almidón, mientras que las especies *C. saccharobutylicum* y *C. beijerinckii* presentan un mejor comportamiento con otros sustratos, como la biomasa lignocelulósica (Shaheen *et al.*, 2000).

En los últimos años, se ha intensificado la investigación sobre ingeniería metabólica de cepas y especies de *Clostridium*, con el fin de mejorar la producción de butanol por fermentación. Se han establecido dos grandes estrategias: la ingeniería regulatoria y metabólica de la bacteria y la incorporación de la ruta de biosíntesis del butanol en levaduras y bacterias no productoras de butanol (Becerra *et al.*, 2015). Entre los principales objetivos de la ingeniería metabólica están favorecer la producción de butanol frente al resto de solventes y aumentar la concentración y pureza del butanol en el caldo de fermentación. Asimismo, se intenta mejorar la tolerancia al oxígeno y aumentar la tolerancia a los solventes generados para disminuir las inhibiciones. También se trabaja en disminuir la represión catabólica por carbono en mezclas de azúcares, así como simplificar la ruta metabólica del microorganismo o prolongar la viabilidad celular (Lee *et al.*, 2008; Visioli *et al.*, 2014).

1.6.3. Sustratos

El precio de las materias primas tiene una gran influencia en la competitividad global de la fermentación ABE frente a los procesos petroquímicos. Se estima que el coste de los sustratos representa más del 70% del total de los costes de producción (Gu *et al.*, 2011).

Inicialmente, los sustratos empleados eran jugos azucarados y almidones, pero su alto precio hace que el proceso sea inviable económicamente (Visioli *et al.*, 2014).

Una de las estrategias para reducir los costes de producción es utilizar sustratos más económicos y sostenibles ambientalmente, tales como los residuos agrarios (Qureshi *et al.*, 2010 a, b; Paniagua-García *et al.*, 2018; Hijosa-Valsero *et al.*, 2020) y agroalimentarios (Hijosa-Valsero *et al.*, 2017, 2018, 2019; Wechgama *et al.*, 2017) o suero lácteo (Becerra *et al.*, 2015). Las cepas de *Clostridium* no pueden usar directamente el material lignocelulósico como fuente de carbono. Por este motivo, esta biomasa debe ser hidrolizada para obtener azúcares de cinco y seis átomos de carbono que pueden ser metabolizados por este grupo bacteriano; este paso de hidrólisis dificulta la viabilidad económica de los procesos fermentativos (Sarangi *et al.*, 2018).

El suero lácteo es un sustrato que ha despertado mucho interés en la fermentación ABE debido a su amplia disponibilidad, su elevada carga contaminante y su adecuada concentración de lactosa (5% p/v) para producir butanol (Napoli, 2009; Silva *et al.*, 2010). Es posible someter el lactosuero a una etapa preliminar para la recuperación de las proteínas, fundamentalmente la caseína. Este paso previo es compatible con la fermentación ABE, ya que las proteínas interfieren en el proceso y conviene eliminarlas antes de la fermentación (Schoutens *et al.*, 1985). El filtrado de suero libre de proteínas presenta una concentración de lactosa muy baja para muchos microorganismos, lo que hace que no sea un sustrato adecuado para algunos procesos fermentativos, como es la fermentación alcohólica, la cual requiere concentraciones de lactosa superiores al 10%, para garantizar su viabilidad y rentabilidad (Dragone *et al.*, 2011). Sin embargo, la concentración de lactosa en el filtrado de suero es idónea para la fermentación ABE, ya que permite evitar problemas de inhibición por producto (Jones y Woods, 1986).

Múltiples derivados y subproductos del suero lácteo han sido investigados, desde polvo de suero ácido (Schoutens *et al.*, 1985; Qureshi y Maddox, 1995, 2005; Maddox *et al.*, 1995); permeado de suero ácido (Ennis y Maddox, 1985; Qureshi y Maddox, 1987) y medios sintéticos con diversas concentraciones de lactosa (Napoli *et al.*, 2010, 2011). Sin embargo, apenas hay publicaciones que utilicen suero crudo, con rendimientos de fermentación muy bajos (Foda *et al.*, 2010).

El rendimiento de la conversión de lactosa en butanol presenta un valor teórico en torno a $0,41 \text{ g}_{\text{butanol}}/\text{g}_{\text{lactosa}}$ (Napoli, 2009). En condiciones experimentales, el rendimiento es inferior debido a la inevitable presencia de sustratos no transformables por los microorganismos durante el proceso. La selectividad del butanol respecto a otros solventes está en un rango de $0,6 - 0,8 \text{ g}_{\text{butanol}}/\text{g}_{\text{ABE}}$.

En fermentaciones discontinuas, la productividad global del reactor utilizando suero lácteo como sustrato es relativamente baja en comparación con otros sustratos como el almidón o las melazas, con concentraciones de solventes entre $5 - 15 \text{ g/L}$, productividades de $0,1 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ y rendimientos de fermentación entre $0,23 - 0,41 \text{ g}_{\text{solventes}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ (Qureshi y Maddox, 1995; 2005; Maddox *et al.*, 1995; Becerra *et al.*, 2015). Esto unido a la incompleta utilización de la lactosa durante el proceso, representan los principales inconvenientes de las fermentaciones discontinuas.

El hecho de que la concentración total de solventes al final de la fermentación sea menor que la alcanzada con otros sustratos convencionales evita problemas de inhibición. La mayoría de las cepas de *Clostridium* spp. toleran concentraciones de solventes de 20 g/L (Maddox, 1983) y hasta el momento no se han alcanzado estos valores de producción empleando suero como sustrato (Becerra *et al.*, 2015). En cualquier caso, la relación butanol/acetona al final de la fermentación trabajando con *C. acetobutylicum* es mayor que la obtenida fermentando glucosa, alcanzando relaciones 20:1 frente a las tradicionales 3:1 con glucosa (Linden *et al.*, 1986). Los cambios metabólicos que tienen lugar para incrementar la relación butanol/acetona aún se desconocen. Distintos estudios indican que tanto la composición del suero como la temperatura de reacción afectan a la productividad tanto de acetona como de butanol (Voget *et al.*, 1985).

Además de los carbohidratos, las especies *C. acetobutylicum* (Madihah, 2001) y *C. beijerinckii* (Nimcevic *et al.*, 1998) requieren nutrientes adicionales como proteínas y sales minerales para su crecimiento y metabolismo celular. La mayoría de estudios sobre fermentación ABE emplean complejos medios de cultivo, que contienen nutrientes suplementarios del crecimiento como extracto de levadura, triptona, vitaminas y sales minerales. Por lo general, las especies de *Clostridium*, requieren valores bajos del potencial redox para su metabolismo celular y crecimiento (Douglas *et al.*, 1973). Sin

embargo, durante la fase de solventogénesis se producen reacciones redox por lo que, para mantener un bajo potencial, debe suplementarse el medio con minerales férricos.

Otros factores que afectan de modo importante la fermentación ABE son el pH o la presencia de oxígeno en el medio de cultivo. Así, las cepas de *Clostridium* spp. tienen una gran sensibilidad a cambios de pH (Ezeji *et al.*, 2005). Como ya se ha indicado, la fermentación ABE se desarrolla en dos etapas. En la etapa acidogénica se producen ácidos, que son secretados al medio y disminuyen su pH. La fase de solventogénesis, comienza después de superar un punto de pH denominado “pH breakpoint”, a partir del cual los ácidos son reasimilados dando inicio a la producción de solventes (Jones y Woods, 1986). Por lo tanto, un valor bajo de pH es un requisito para que se desarrolle la solventogénesis. El hecho de que elevadas concentraciones de butirato y acetato aparezcan en el medio, hace que parámetros como el pH, la concentración de ácidos débiles y una elevada densidad celular favorezcan la producción de solventes (George y Chen, 1983). Sin embargo, en medios poco tamponados, el pH puede disminuir por debajo de 4,5 durante la acidogénesis, lo que provoca la finalización inmediata de la solventogénesis, mediante el sistema denominado “rotura ácida o acid crash”. Este fenómeno está asociado con una concentración de ácido acético y butírico que supera un valor límite en el caldo de fermentado (Maddox *et al.*, 2000). Además, las especies del género *Clostridium* inhiben su crecimiento incluso con concentraciones de oxígeno muy bajas (Bahl y Dürre, 2000). Por ello, es imprescindible garantizar condiciones de anaerobiosis durante toda la fermentación.

1.7. Configuración de fermentación

El diseño y el modo de operación de los biorreactores juegan un importante papel en la industria bioquímica (Amarasekara, 2013). Evaluar la cinética de reacción, los fenómenos de transporte, la hidrodinámica y las condiciones de operación óptimas permiten mejorar los procesos y aumentar la productividad (Qureshi y Blaschek, 2001). Con mayor productividad, se pueden utilizar fermentadores más pequeños, reduciéndose los costes de construcción (Amarasekara, 2013). Múltiples configuraciones de reacción han sido evaluadas para mejorar la baja productividad típica

de los procesos fermentativos. La selección de la configuración de fermentación óptima debe considerar tanto la simplicidad de operación como la productividad específica.

Los tres procesos básicos de fermentación son la fermentación discontinua por lotes o en “batch”, la fermentación semi-continua o “fed-batch” y la fermentación continua (Figura 1.5)

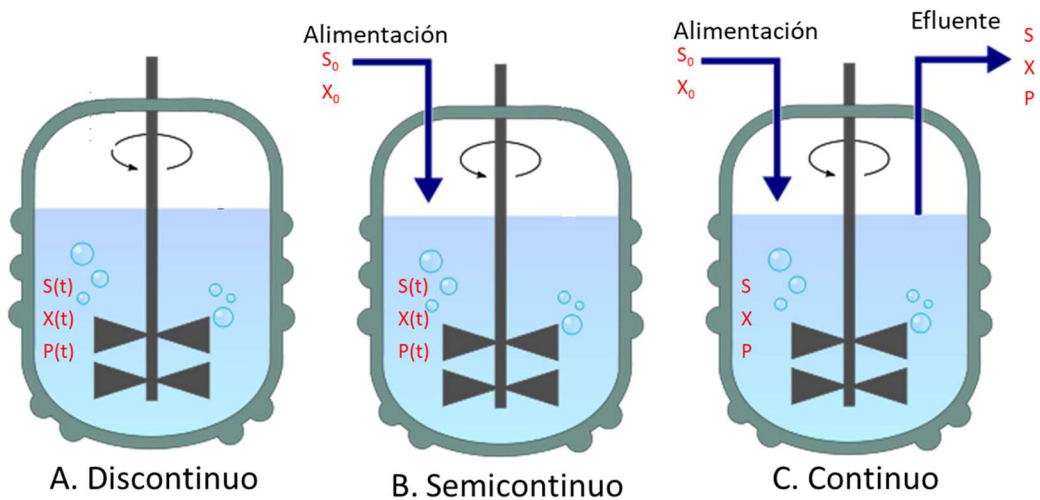


Figura 1.5. Esquemas de configuraciones de fermentación: A) Discontinuo, B) Semicontinuo, C) Continuo.

1.7.1. Fermentación discontinua o “por lotes”

La fermentación discontinua es la configuración tradicionalmente empleada en la industria. Este modelo de fermentación es un sistema de cultivo cerrado, en el que el medio de fermentación es inoculado con un microorganismo. Durante el periodo de crecimiento celular, no se realiza ninguna modificación del medio de fermentación a excepción de la adición de ácidos o bases para controlar el pH y el proceso finaliza cuando se agota la fuente de carbono disponible y los productos de fermentación han sido generados. Durante la fermentación, tanto los sustratos y nutrientes como los productos y la biomasa celular cambian continuamente (Dunn *et al.*, 1992). Con esta configuración, los microorganismos inicialmente trabajan en medios con alta concentración en sustratos, por lo que el microorganismo necesita un tiempo de adaptación al nuevo medio, denominado etapa de latencia. Pasado esta etapa, hay una posterior etapa de crecimiento microbiano exponencial, seguida de una fase

estacionaria de generación de producto. En la fase final de la fermentación, los microorganismos están sometidos a un fuerte estrés debido a la elevada concentración de producto en el medio, que en la mayoría de los casos provoca un decrecimiento de la actividad metabólica hasta la autólisis (Díaz-Montaña, 2013).

La fermentación por lotes es un proceso de múltiples recipientes que permite una operación flexible y un fácil control sobre el proceso (Ingledew, 2003; Godoy *et al.*, 2008). La principal desventaja de esta configuración es la baja productividad del proceso, vinculada principalmente a los periodos de inactividad derivados de los periodos de latencia durante el arranque y los periodos de limpieza del fermentador, una vez finalizado el proceso antes de iniciar el siguiente lote de fermentación. Además, hay un bajo control sobre el crecimiento microbiano y la producción de los compuestos de interés frente a la generación de metabolitos secundarios. Esta configuración requiere fermentadores de mayor tamaño, lo que supone un mayor coste de construcción y operación, propios de los sistemas discontinuos (Napoli, 2009; Amarasekara, 2013).

1.7.2. Fermentación semi-continua o “fed-batch”

La fermentación semi-continua o “fed-batch” permite mantener un entorno nutricional relativamente constante durante todo el proceso. El reactor se inicia en modo discontinuo con baja concentración de sustrato, ocupando el caldo aproximadamente la mitad del volumen inicial del fermentador. Cuando el sustrato es consumido por el cultivo, se comienza a adicionar sustrato a una velocidad que permite mantener la concentración total de solvente en el caldo por debajo de niveles tóxicos (Díaz-Montaña, 2013).

Esta configuración se emplea industrialmente cuando a una elevada concentración de sustrato se producen inhibiciones o toxicidades en el microorganismo. Esto ocurre tal y como se ha comentado en los apartados 1.5 y 1.6, tanto en la fermentación alcohólica como en la fermentación ABE. Además, controlar la represión catabólica mediante el control del sustrato, permite una adaptación más rápida de las bacterias y las levaduras, favoreciendo la metabolización del carbono como fuente de energía (Napoli, 2009).

La fermentación semicontinua permite alargar los periodos de operación de los microorganismos, alcanzando concentraciones celulares superiores, lo que mejora el

rendimiento y la productividad de los procesos. Además, se controla la producción de metabolitos a través de la dosificación controlada del sustrato. Con esta configuración, se pueden controlar desviaciones durante el crecimiento microbiano y es posible reemplazar el agua perdida por evaporación (Amarasekara, 2013).

Entre las principales desventajas de esta configuración están la necesidad de tener mejores habilidades de operación durante el arranque y el desarrollo del proceso, ya que es muy importante mantener tanto la concentración como el volumen constante. Además, trabajar con este modo de fermentación implica tener un amplio conocimiento sobre la fisiología y el metabolismo de los microorganismos. En procesos semicontinuos cíclicos, es necesario controlar la formación y acumulación de toxinas, lo que repercutirá en el rendimiento final del proceso (Dunn *et al.*, 1992; Diaz-Montaña, 2013).

1.7.3. Fermentación continua

En procesos continuos, el sustrato o medio de fermentación es alimentado al reactor de modo constante, donde se mezclará con los microorganismos, bien directamente, bien mezclándolo en un pre-fermentador, para posteriormente dosificar la mezcla en un fermentador agitado o en un set de agitadores paralelos de volumen de operación constante. El tiempo de residencia en cada fermentador debe ser controlado en función del tiempo de residencia previamente definido (Amarasekara, 2013). De modo continuo, se extrae del fermentador el mismo volumen de caldo fermentado que el medio fresco adicionado, a través de un sistema de bombeo hasta la unidad de recuperación de producto, para mantener un volumen de fermentación constante. Así, esta fermentación es un proceso que no para y la fase exponencial se alarga hasta que el sustrato se agota (Stanbury *et al.*, 1999).

Con esta configuración, si el medio se alimenta de modo continuo en una relación adecuada, se llega a alcanzar un estado estable en el reactor, en el que la formación de nueva biomasa microbiana está equilibrada con la muerte celular. En un estado estable, la tasa de crecimiento específica está controlado por la velocidad de dilución, que es un parámetro determinado experimentalmente. Por lo tanto, las fermentaciones continuas deben ser operadas con velocidades de dilución inferiores a la máxima tasa de

crecimiento microbiana específica, al contrario que las fermentaciones discontinuas que operan con la máxima tasa de crecimiento específica (Díaz-Montaña, 2013).

Las fermentaciones continuas presentan ciertas ventajas frente a los procesos discontinuos a nivel industrial. Dado que la inoculación y el crecimiento celular no se realizan cada ciclo y los microorganismos están bloqueados en la fase de crecimiento exponencial, se mejoran la productividad y concentración de los solventes, aumenta el tiempo de fermentación efectivo, lo que permite reducir el volumen de los reactores, a la vez que se reduce drásticamente el tiempo de limpieza y esterilización de los equipos (Ezeji *et al.*, 2005), reduciendo tanto los costes materiales como laborales (Ingledew, 2003). Sin embargo, al igual que con la fermentación semicontinua, es imprescindible una capacidad técnica superior de los operarios de las instalaciones. Las principales desventajas en líneas generales de esta configuración de fermentación son los problemas de contaminación y los problemas para mantener la velocidad de fermentación elevadas, lo que reduce el rendimiento del proceso, así como garantizar la estabilidad genética de los microorganismos con el tiempo (Ingledew, 2003).

Además, en bioprocesos complejos como la fermentación alcohólica o la fermentación ABE, la producción de solventes no es estable y se reduce con el tiempo (Ingledew, 2003; Ezeji *et al.*, 2005; Godoy *et al.*, 2008). Esto genera grandes fluctuaciones de los niveles de solventes a lo largo del tiempo, con el consiguiente aumento de la formación de metabolitos secundarios, lo que disminuye la productividad global del proceso. Además, la concentración final de solventes es bastante inferior a los valores documentados para los procesos discontinuos, lo que dificulta su empleo a escala industrial (Ezeji *et al.*, 2005; Godoy *et al.*, 2008). Otro grave problema asociado a esta configuración en el caso de la fermentación ABE es la posible degeneración de la capacidad de producir solventes en el caso de la especie *C. acetobutylicum*, debida a la pérdida del megaplásmido (pSOL1) que contiene los genes solventogénicos. En el caso de la especie *C. beijerinckii*, estos genes se encuentran en su cromosoma, por lo que presenta un problema menor de degeneración (Milne *et al.*, 2011). Para tratar de mejorar la productividad y rendimiento final, procesos en dos fases o multifase han sido estudiados para tratar de separar las fases de crecimiento (acidogénesis) de la fase de producción (solventogénesis).

1.7.3.1. Bioprocesos continuos con inmovilización celular

En base en resultados publicados hasta el momento, las configuraciones con células libres, tanto discontinuas como continuas, no garantizan un prometedor desarrollo de los procesos demostrativos a escala comercial. La viabilidad del proceso exige superar las limitaciones tanto del proceso continuo (baja productividad) como del discontinuo (largos periodos de inactividad) (Godoy *et al.*, 2008; Napoli, 2009). Por tanto, se debe continuar trabajando en aumentar el rendimiento por unidad de volumen de reactor y reducir los costes de operación (Becerra *et al.*, 2015; Sarangi y Nanda, 2018).

Los reactores operados en continuo que utilizan microorganismos inmovilizados o en reactores de membrana con reciclado en continuo de microorganismos, ofrecen una productividad superior a los procesos en continuo con microorganismos libres, gracias a la mayor concentración celular (Es *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2018).

Los procesos de inmovilización celular consisten en confinar las células en una estructura física que las obligue a permanecer en una determinada región espacial, preservando su actividad catalítica (Karel *et al.*, 1985). Las tecnologías de inmovilización más comunes son la adsorción, el atrapamiento y la formación de enlaces covalentes (Nuñez y Lema, 1987). Las técnicas de atrapamiento y formación de enlaces covalentes requieren el empleo de sustancias químicas que en muchas ocasiones interfieren en la propagación o crecimiento celular en el reactor y aumentan los costes de operación.

Los sistemas con inmovilización de microorganismos presentan importantes ventajas frente a los sistemas de células libres como son la facilidad de separación de las células al estar retenidas en una matriz, la elevada densidad celular por unidad de volumen de reacción, lo que permite reducir el volumen de fermentación y los costes de inmovilizado material, así como una mayor flexibilidad en el diseño del reactor, pudiéndose emplear reactores tanto de lecho fijo como de lecho percolado o fluidizado, en procesos continuos. Además, con esta configuración se consigue un mayor control de la cinética de reacción, un mejor aprovechamiento de los nutrientes y una menor inhibición por producto, a la vez que se logra una mejor transferencia de masa debido a la menor viscosidad del medio y un menor riesgo de contaminación (Kourkoutas *et al.*,

2004; Eş *et al.*, 2015). Sin embargo, las técnicas de inmovilización celular también presentan desventajas, como una disminución de la accesibilidad del sustrato, alteraciones en la conformación y la actividad del biocatalizador y problemas de estrés en el biocatalizador, además de costosos sistemas de reacción (Eş *et al.*, 2015).

La adsorción es un proceso de adhesión natural de las células a los soportes de fijación con el posterior crecimiento celular sobre el mismo soporte (Qureshi y Maddox, 1987). La adsorción es la técnica de inmovilización celular que consigue una retención celular alta en procesos reversibles del modo más simple, rápido y barato, pudiéndose utilizar superficies de adsorción tanto orgánicas como inorgánicas. Sin embargo, los enlaces no son específicos, por lo que se producen problemas de sobrecarga celular, impedimentos estéricos en los soportes, contaminación por producto o desorción celular por agentes externos, como el pH o el estrés iónico (Elnashar, 2011). Los problemas intrínsecos de la adsorción se pueden solventar utilizando enlaces alternativos como la adsorción-reticulación, la adsorción selectiva con enlace covalente o la adsorción-revestimiento (Cao, 2015).

Los soportes inorgánicos presentan ciertas ventajas sobre los soportes orgánicos, al ser fáciles de manejar, estables, reutilizables, esterilizables con vapor y baratos. Además, no requieren pretratamientos previos como la deslignificación o la derivatización, lo que simplifica los procesos de inmovilización (Gonçalves *et al.*, 1992; Genisheva *et al.*, 2011).

Sobre los soportes pueden adherirse células microbianas para producir compuestos químicos, tal y como ocurre con la fermentación ABE o la fermentación alcohólica, en estructuras de biopelícula o biofilm. Las biopelículas se desarrollan en cinco etapas tal y como se muestra en la Figura 1.6. Hay una etapa inicial de fijación, seguida de una etapa de unión irreversible, al generarse sustancias poliméricas extracelulares (SPE), una etapa de desarrollo, seguida de una etapa de maduración de la arquitectura de las biopelículas y una etapa final de liberación de células del biofilm (Stoodley *et al.*, 2002). La capa SPE ejerce como nexo de unión del microorganismo con la superficie, protegiendo a las células de tensiones mecánicas o toxicidades por compuestos químicos o microorganismos. Sin embargo, la capa SPE es una barrera a los nutrientes necesarios para el crecimiento de las células, generando un microambiente en la biopelícula muy diferente del microambiente del medio de fermentación (Karaguler *et al.*, 2017).

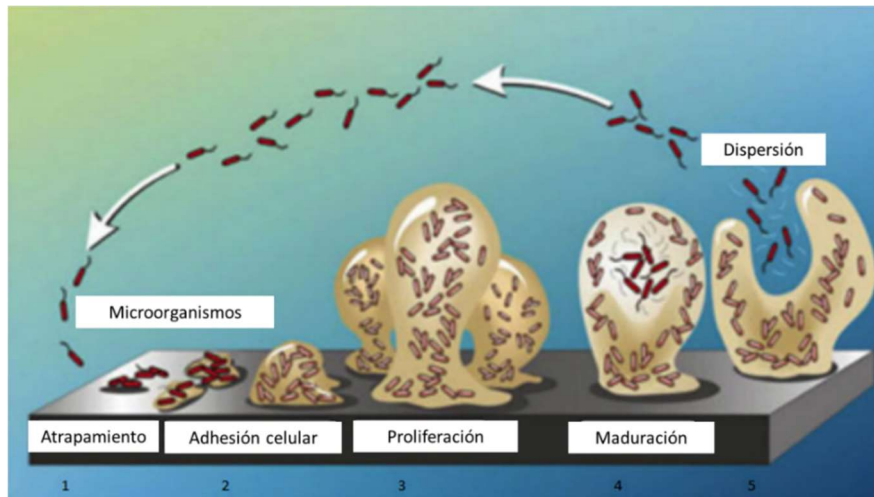


Figura 1.6. Etapas de desarrollo de una película de biofilm (Karaguler et al., 2017).

Las superficies rugosas facilitan la formación de biopelículas y los materiales porosos generan un ambiente protegido para la adhesión celular (Van der Wende *et al.*, 1990). La formación de las biopelículas se favorece en materiales hidrofóbicos, formándose mucho más rápidamente en teflón y otros plásticos que en vidrio o metal (Donlan y Costerton, 2002). Las temperaturas elevadas (Annachhatre y Bhamidimarri, 1992) y las concentraciones de nutrientes elevadas (Cowan *et al.*, 1991) aumenta la tasa de crecimiento celular y en la producción de la SPE, favoreciendo la inmovilización.

Diversos soportes de inmovilización han sido utilizados para la producción de etanol y butanol, incluyendo: polímeros (p.j., alginato, agar, carragenina, colágeno, quitosano, etc.), materiales inorgánicos (p.j. arcilla, vidrio sinterizado, plástico o alúmina) y materiales orgánicos (p.j. algodón, carbón vegetal, residuos agrícolas y forestales, etc.) (Nedovic y Willaert, 2005; Margaritis y Kilonzo, 2005; Saratale y Oh, 2012; Kilonzo y Bergougnou, 2012; Eş *et al.*, 2015).

En la Tabla 1.2, se recogen ejemplos de producción de etanol en procesos con inmovilización celular utilizando lactosa como sustrato. Asimismo, en la Tabla 1.3, se recopilan ejemplos de producción de butanol mediante fermentación ABE en procesos con inmovilización celular utilizando como sustrato lactosa.

Tabla 1.2. Recopilación bibliográfica de obtención de etanol en procesos con inmovilización celular

Sustrato	Levadura	Soporte/Tipo bioreactor	$Y_{E/S}$ (g/g)	Q_E (g/L·h)	η (%)	Referencia
Suero hidrolizado/ Permeado suero hidrolizado (L=56 g/L)	<i>K.marxianus</i> CCT4086	Alginato/ RLFI	0,49/0,47	1,68/1,39	96,0/90,2	Gabardo <i>et al.</i> , 2015
	<i>S. cerevisiae</i> CAT-1		0,44/0,35	0,78/0,32	86,0/68,4	
	PE-2		0,43/0,36	0,78/0,31	83,6/70,4	
	CAT-1/CCT48086		0,44/0,40	1,32/1,30	86,0/79,2	
Permeado de suero (L=90 g/L)	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Alginato/ RLFI	0,45	1,96	83,6	Gabardo <i>et al.</i> , 2014
	CCT4086		0,47	2,53	89,2	
	CCT2653		0,33	0,75	61,8	
Suero (L=100 g/L)	<i>K. marxianus</i> TY-3	Alginato/ RLFI	0,34	0,68	63,1	Guo <i>et al.</i> , 2010
	<i>S. cerevisiae</i> TY-3/ AY-5 (mezcla)		0,43	0,88	79,9	
	TY-3/AY-5 (co-inmovilizado)		0,42	0,85	77,0	
Suero (L=60 g/L)	<i>K. marxianus</i> CCT 6556	Alginato/ RLFI	0,45	0,96	83,3	Gabardo <i>et al.</i> , 2012
	CCT 4086		0,43	0,81	79,1	
	CCT 2653		0,45	0,84	73,3	
Suero en polvo (L=100 g/L)	<i>K. marxianus</i> DSMZ-7239	Pepita aceituna/ RLF	0,52		--	Ozmihci y Kargi, 2008
Medio sintético (L=150 g/L)	<i>K. fragilis</i> NRRL 665	Alginato	0,36	0,74	51,7	Gunasekaran <i>et al.</i> , 1991
	<i>Zymomonas mobilis</i> NRRL B4286		0,44	0,88	61,9	
	665/B4286 (mezcla)		0,47	0,89	62,9	
	665/B4286 (co-inmovilización)		0,47	1,0	70,0	
Permeado de suero (L=100 g/L)	<i>K. marxianus</i> NCYC 179	Alginato/ carragenina	0,43	-	82,2	Marwaha y Kennedy, 1984

RLFI = Reactor de lecho fluidizado; RLF = Reactor de lecho fijo; $Y_{E/S}$ = rendimiento etanol-sustrato; Q_E = Productividad; η = Rendimiento porcentual de fermentación; L = concentración de lactosa.

Tabla 1.3. Recopilación bibliográfica de obtención de butanol en procesos con inmovilización celular

Sustrato	Bacteria	Soporte/Tipo biorreactor	$Y_{B/S}$ (g/g)	Q_B (g/L·h)	C_{ABE} (g/L)	Referencia
Medio sintético (L= 100 g/L)	<i>C. acetobutylicum</i> DSM 792	Anillos de Tygon®/ RLF (4 en serie)	0,18	9,2	15,0	Raganati <i>et al.</i> , 2016
Medio sintético (L= 50 g/L)	<i>C. acetobutylicum</i> DSM 792	Bioreactor de membrana de microfiltración	0,15	0,5	5,62	Procentese <i>et al.</i> , 2015
Suero lácteo (L= 28 g/L)	<i>C. acetobutylicum</i> DSM 792	Anillos de Tygon®/ RLF	0,26	2,7	6,01	Raganati <i>et al.</i> , 2013
Medio sintético (L=30 g/L)	<i>C. acetobutylicum</i> DSM 792	Silicagel, arena, bolas de cristal, Anillos de teflón, anillos de PVC, anillos de Tygon®/ RLF	0,88	4,4	5,19	Napoli <i>et al.</i> , 2010
Permeado de suero (L=60-160 g/L)	<i>C. acetobutylicum</i> P262	Hueso/ RLF + pervaporación	0,22	2,0	3,59	Friedl <i>et al.</i> , 1991
Permeado de suero (L=50 g/L)	<i>C. acetobutylicum</i> P262A	Bioreactor de membrana de microfiltración	--	--	7,13	Ennis y Maddox, 1989
Permeado de suero (L=45-50 g/L)	<i>C. acetobutylicum</i> P262	Carbón vegetal/ RLF	0,23	4,1	4,1	Qureshi y Maddox, 1987
Permeado de suero (L= 37 g/L)	<i>C. beyerinckii</i> LMD 27.6	Alginato/RLFI	--	0,5-1,0	2,1 (B)	Schoutens <i>et al.</i> , 1985

RLFI=Reactores de lecho fluidizado; RLF=Reactor de lecho fijo; $Y_{B/S}$ = rendimiento butanol-sustrato; Q_B = Productividad butanol; C_{ABE} = concentración de solventes ABE (Acetona-Etanol-Butanol); L = concentración de lactosa.

1.8. Recuperación de solventes

Para recuperar los alcoholes generados en la fermentación alcohólica y ABE de los caldos de fermentación, se utilizan tecnologías de separación y purificación, incluyendo la destilación, la adsorción, el arrastre de vapor o gas stripping, la extracción líquido-líquido, la pervaporación, la perstracción o las separaciones híbridas (Abdehagh *et al.*, 2014; Friedl, 2016; Patraşcu *et al.*, 2017).

La destilación clásica es la tecnología de recuperación más consolidada y utilizada industrialmente a pesar de su elevada demanda energética (Friedl, 2016; Patraşcu *et al.*, 2017). Es una tecnología robusta con un factor de recuperación del alcohol alto y fácil de escalar (Vane, 2008). Sin embargo, hay una gran necesidad en mejorar la eficiencia energética de las tecnologías de separación de alcoholes y buscar alternativas a la destilación. Además, la purificación de estos compuestos hasta el grado requerido industrialmente no puede lograrse utilizando una única tecnología de separación, sino que requiere el uso de combinaciones de tecnologías de separación y purificación (Venkatesen, 2013).

Por otro lado, tanto en la fermentación alcohólica como en la fermentación ABE, a partir de ciertas concentraciones de solventes se observan importantes inhibiciones microbianas. Así, en el caso de la fermentación alcohólica, las levaduras comienzan a sufrir inhibiciones a partir del 5% (p/p) de etanol que se intensifican a partir del 10% (p/p) de etanol (Vane, 2008). Con concentraciones de butanol entre 1 – 2% (p/p), se observan importantes inhibiciones en el crecimiento bacteriano debido a las interacciones con la membrana plasmática (Kumar y Gayen, 2011), lo cual supone una limitación importante para la generación de butanol por vía fermentativa. Para solventar este problema, se trabaja tanto en la obtención de cepas bacterias más tolerantes al butanol mediante ingeniería genética como en el empleo de tecnologías de recuperación *in situ* de los solventes generados en el reactor a medida que se produce.

Mediante técnicas *in situ* de recuperación de producto, se mejora el aprovechamiento de los sustratos y se minimizan las inhibiciones microbianas, a la vez que se reducen los costes de recuperación, mejorando el rendimiento y la productividad global de los procesos fermentativos (de Vrije *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2014). Diferentes técnicas

integradas de recuperación de solventes *in situ* junto con la fermentación y diversos tipos de sustratos han sido estudiadas (Vane, 2008; Ramaswamy *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014). Todas estas tecnologías presentan tanto ventajas como desventajas en función de su capacidad, selectividad, ensuciamiento, atascos, escalado, simplicidad operacional o requerimientos energéticos (Ezeji *et al.*, 2007, 2010; Vane, 2008; Oudshoorn *et al.*, 2009). A continuación, se desarrollan esquemáticamente las principales técnicas viables de recuperación *in situ* de alcoholes en procesos de recuperación combinados con la fermentación.

1.8.1. Destilación

Tanto el etanol como el butanol presentan un Equilibrio Líquido-Vapor (ELV) favorable en soluciones acuosas para la concentración de los alcoholes en la fase vapor. A presión atmosférica, el etanol forma un azeótropo con agua al 95,6% de etanol a 78,2 °C (Weast, 1988). Por encima del azeótropo, la volatilidad relativa del etanol es muy baja. Como el etanol para uso carburante requiere una pureza del 99,7% (p/p) (EN 15489 y EN 15692), está aceptado industrialmente el empleo de técnicas de adsorción por tamiz molecular para la deshidratación del alcohol.

El sistema de destilación estándar de la industria del bioetanol es el uso de hasta tres columnas de separación (unidad de stripping, unidad de rectificación y unidad de rectificación en colas) unido a un tamiz molecular empleando zeolitas (Kwiatkowski *et al.*, 2006). Con esta configuración se consigue mejorar significativamente la integración energética del proceso frente a la destilación clásica a pesar de su mayor complejidad y coste de equipamiento asociado (Vane, 2008).

Al contrario de lo que ocurre con la mezcla etanol-agua, la mezcla butanol-agua se puede separar combinando columnas de destilación y equipos de separación. A presión atmosférica, el sistema butanol-agua, presenta un azeótropo a 93 °C con sólo un 55,5% (p/p) de butanol (Weast, 1988). Además, el butanol sólo es soluble en agua a concentraciones de butanol inferiores a 7,7% (p/p). Dado que el azeótropo se produce por encima de este límite de solubilidad, se forman dos fases en el azeótropo. La fase superior contiene un 79,9% en peso de butanol mientras que la fase inferior contiene un 7,7% de butanol (Weast, 1988). Dada la separación de fases azeotrópicas y la relativa

buena volatilidad del butanol, los sistemas de destilación multi-columna o la integración de un sistema de destilación a la fermentación se convierten en una alternativa viable para recuperar butanol al 99,9% (p/p) (Seader *et al.*, 1998; Mariano *et al.*, 2011).

En el caso del butanol, la destilación supone una demanda excesiva de energía. Se requieren 79,5 MJ/kg de butanol recuperado en un proceso de destilación clásico. Cuando se parte de un caldo de fermentación con una concentración de butanol alrededor de 0,5% (p/v), se traduce en un requerimiento energético del 220% de la energía contenida en el butanol (Patraşcu *et al.*, 2017). Esta energía puede disminuir hasta 36 MJ/kg de butanol, si se parte de una solución con una concentración inicial de butanol del 1% (p/v), que equivale a la energía que contiene el propio butanol (Matsumura *et al.*, 1988; Oudshoorn *et al.*, 2009). Para tratar de garantizar la viabilidad global de la fermentación ABE es imprescindible reducir drásticamente este valor (hasta un 20% o incluso menos). Esto se puede conseguir combinando tecnologías de recuperación *in situ* de producto (Bildea *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2014).

1.8.2. Arrastre de vapor o gas-stripping

El arrastre de vapor o gas-stripping es una buena opción alternativa a la destilación para la recuperación *in situ* de alcoholes (Xue *et al.*, 2014; Friedl, 2016). Las principales ventajas de esta técnica son la simplicidad de operación, su inocuidad para los microorganismos, el bajo aporte energético necesario y la moderada inversión de capital para las instalaciones (Xue *et al.*, 2014;). Además, esta técnica es fácilmente integrable en configuraciones de fermentación discontinuas, semi-continuas y continuas, lo que la hace muy adecuada para su aplicación a escala industrial (Ezeji *et al.*, 2005; Rom *et al.*, 2016). En la Figura 1.7, se muestra un esquema de esta técnica de recuperación de alcohol de caldos de fermentación.

El principio de operación del arrastre de vapor se basa en el contacto directo líquido-gas a contracorriente, gobernado por el equilibrio líquido-vapor, de un modo similar a la destilación clásica. Así, solventes volátiles contenidos en el caldo de fermentación se transfieren en fase vapor a un gas inerte, que actúa como agente portador, hasta recuperarse en una trampa de frío o un tamiz molecular (Huang *et al.*, 2008).

Una variante del gas-stripping es la *fermentación a vacío*, basada en la recuperación de los solventes en condiciones de vacío, lo que disminuye las temperaturas de ebullición, y por lo tanto, la temperatura de condensación. Se pensaba que la fermentación a vacío no era válida para recuperar solventes más volátiles que el agua, lo cual excluye al butanol, con un punto de ebullición superior al del agua (118 °C) (Roffer *et al.*, 1984). Sin embargo, Mariano *et al.* (2008) demostraron la viabilidad de recuperar butanol mediante esta técnica, consiguiendo una productividad de 0,43 g/L·h de butanol, sin dañar a los microorganismos y disminuyendo los tiempos de fermentación a 44 horas, con un consumo total del sustrato y un mayor crecimiento celular y (Mariano *et al.*, 2011).

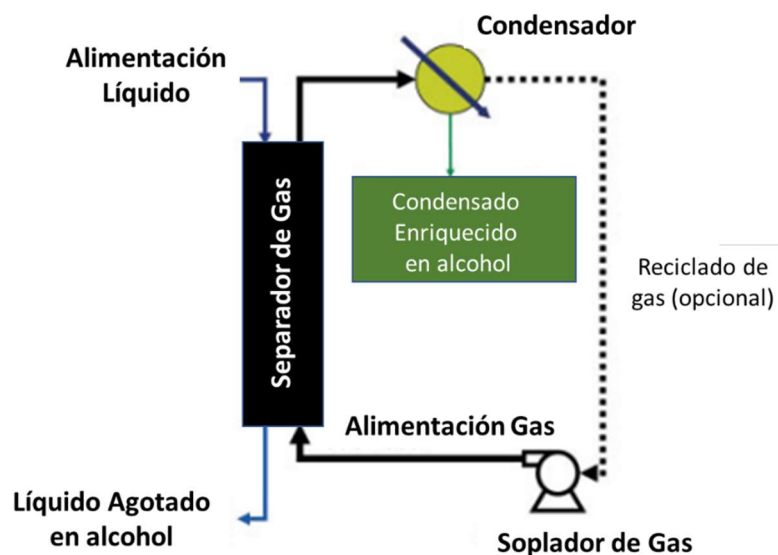


Figura 1.7. Esquema de la recuperación de solventes por gas-stripping (Adaptado de Vane, 2008).

El arrastre de vapor permite obtener alcoholes de gran pureza, a pesar de ser una técnica poco selectiva, ya que la separación está regida por el equilibrio líquido-vapor. No obstante, el contacto contracorriente entre el caldo de fermentado y el gas de arrastre incrementa el área de contacto y, por tanto, la velocidad de recuperación. Además, el uso del propio gas generado de la fermentación como gas de arrastre permite mejorar la economía del proceso.

La relación alcohol-gas inerte es una función que depende de un modo importante de la temperatura de operación, ya que la presión de vapor de los compuestos volátiles en la fase gaseosa se determina, según la ecuación:

$$P_i = y_i P_{Total} = x_i \gamma_i P_i^{sat} \quad (\text{ec. 1.1})$$

donde P_i es la presión parcial, P_{Total} es la presión total de la fase gaseosa, y_i y x_i son la fracción molar de la fase gaseosa y la fase líquida, respectivamente, γ_i es el coeficiente de actividad en la fase líquida y P_i^{sat} es la presión de vapor saturado.

La presión de saturación es muy sensible a la temperatura. Así, ligeros aumentos de la temperatura provocan importantes incrementos en la presión de saturación de los compuestos. Por lo que, para una misma presión, el volumen de gas necesario para eliminar el solvente se reduce significativamente. El alcohol transferido a la fase vapor se puede recoger por diversos medios, destacando el uso de la condensación (Ennis *et al.*, 1986), aunque se pueden emplear distintos métodos de separación como tecnologías de membranas o adsorción (Vane, 2008).

La selectividad de la separación del butanol (α_B), el factor de recuperación (η_B) y la concentración de butanol recuperado, dependen de las condiciones de operación, incluyendo el flujo de gas utilizado, la temperatura de enfriamiento y los parámetros de fermentación (concentración de butanol, temperatura y densidad celular en el medio) (Ezeji *et al.*, 2003; Thang *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2014). El gas stripping presenta una selectividad baja en comparación con otros métodos de separación (Oudshoorn *et al.*, 2009), con concentraciones finales de butanol inferiores a 70 g/L de butanol y 120 g/L de solventes ABE (Xue *et al.*, 2013). Dadas las bajas concentraciones de butanol, se requiere una etapa posterior de recuperación con un elevado consumo energético. El consumo energético de la recuperación de butanol por gas-stripping, seguido de una etapa de destilación o evaporación a vapor es de 14 – 31 MJ/kg, dependiendo del proceso y la concentración de butanol en el caldo de fermentación (Xue *et al.*, 2014).

La optimización de los parámetros claves en el gas-stripping permite mejorar la recuperación de butanol y el ahorro energético para un proceso integrado de fermentación ABE con recuperación *in situ* mediante gas-stripping (Xue *et al.*, 2013). Además, realizar recuperaciones intermitentes de butanol mediante gas-stripping

permite reducir hasta un 66% el consumo energético (Xue *et al.*, 2014). Asimismo, Xue *et al.* (2014) han documentado que el uso de un proceso *in situ* de recuperación mediante gas-stripping en dos fases, permite obtener un condensado con una concentración de butanol 26 veces superior a la del caldo de fermentación. En este proceso, se obtiene un condensado con una elevada concentración de butanol [51,5% (p/v) y 67,1% (p/v) de solventes ABE], a partir de un caldo de fermentación con una concentración de butanol del 1% (p/v). Por lo tanto, el proceso de gas-stripping en dos fases permite reducir al menos en un 50% el consumo energético (7 – 15 MJ/kg butanol) del producto recuperado (Xue *et al.*, 2014). Por lo tanto, los procesos de fermentación integrados con recuperación *in situ* de butanol son una alternativa viable desde un punto de vista energético y económico para la producción de butanol (Xue *et al.*, 2013).

1.8.3. Extracción Líquido-Líquido (L-L)

La extracción L-L es un proceso de separación de solventes basado en el contacto continuo de la solución acuosa enriquecida en los solventes de interés con uno o más líquidos extractantes. Estos líquidos extractantes son fluidos inmiscibles en la solución acuosa que extraen selectivamente los solventes del caldo de fermentado, sin afectar al resto de componentes, fundamentalmente nutrientes y células (Vane, 2008; Huang *et al.*, 2014). Un esquema típico del proceso de se muestra en la Figura 1.8.

El contacto entre el caldo de fermentación y el extractante líquido puede ser “directo” a través de una columna de contacto o “indirecto” a través de una membrana porosa no permeable (en este caso, la tecnología se denomina “perstracción”). Para reducir el consumo de reactivos químicos es posible reutilizar el extractante, utilizando una unidad de regeneración como el gas stripping, la destilación o la pervaporación utilizando membranas (Vane, 2008). Esta técnica ha sido utilizada para recuperar etanol y butanol tanto en procesos discontinuos como en procesos en línea integrados con la fermentación (Huang *et al.*, 2014).

El factor más importante de la extracción L-L es la adecuada selección del agente de extracción, ya que debe ser un compuesto no tóxico para los microorganismos, tener una alta selectividad a los solventes de interés, presentar un coeficiente de distribución alto, ser insolubles en agua y no formar parte de los nutrientes, sustratos o productos

intermedios de fermentación. Por otra parte, el extractante debe presentar una elevada tensión interfacial con el agua para facilitar la separación, una baja viscosidad, una mínima solubilidad en agua, una alta estabilidad térmica, ser fácilmente regenerado, biodegradable y presentar una diferencia de densidad elevada, para facilitar la operación en contracorriente (Huang *et al.*, 2014). Entre los potenciales extractantes para la recuperación de etanol y butanol destacan el alcohol oleico, los ácidos grasos, los aceites vegetales, el biodiésel, los surfactantes o los líquidos iónicos (Vane, 2008).

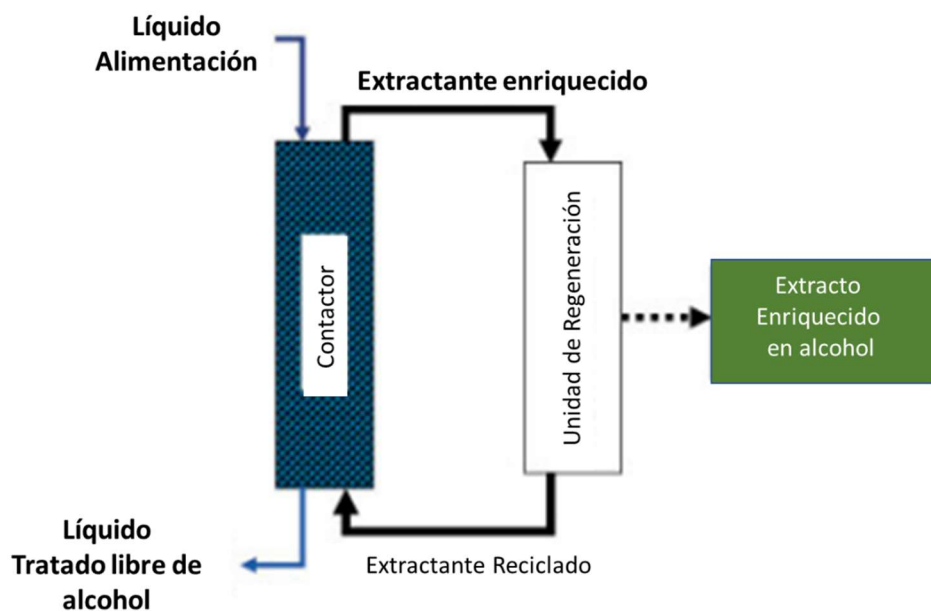


Figura 1.8. Esquema de la recuperación de solventes por extracción Líquido-Líquido (Adaptado de Vane, 2008).

La extracción L-L es una tecnología energéticamente eficiente para recuperar alcoholes, siendo más eficiente la separación en el caso del butanol que en el del etanol (Huang *et al.*, 2014). El desarrollo de nuevos extractantes mejorados como los líquidos iónicos favorecerá la eficiencia de esta tecnología. Sin embargo, el alto coste de los extractantes específicos es un factor limitante adicional a esta técnica (Ezeji *et al.*, 2005).

1.8.4. Pervaporación

La pervaporación es un proceso de separación basado en interacciones moleculares entre los componentes de la alimentación y una membrana, porosa de tipo orgánico o inorgánico por un lado y no porosa por el otro lado. Como se muestra en la Figura 1.9,

se aplica vacío al caldo de fermentación de un lado de la membrana, los compuestos volátiles difunden y son transportados a través de la membrana y desorbidos al lado del permeado en forma de vapor. La separación se produce como resultado de un gradiente de potencial químico, debido a las diferencias de presión parcial de vapor de los componentes entre los dos lados de la membrana. La presión parcial de vapor de los componentes en la alimentación está en saturación y viene fijada por la temperatura y la composición de la mezcla líquida y por la naturaleza de los componentes. El otro lado de la membrana se mantiene a baja presión mediante la aplicación de vacío mediante un gas portador inerte o condensación a bajas temperaturas (Garcia *et al.*, 2011).

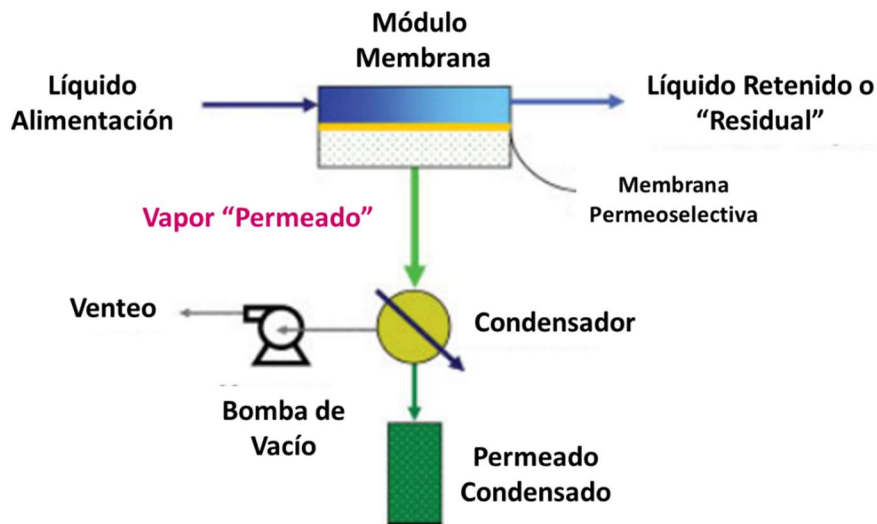


Figura 1.9. Esquema de la recuperación de solventes por pervaporación (Adaptado de Vane, 2008)

Esta técnica es especialmente eficaz cuando la concentración del compuesto a recuperar de la alimentación es baja (intervalos de concentración de 200 a 50.000 ppm). Esta característica hace que la pervaporación sea especialmente conveniente para la recuperación de butanol, dada su baja concentración en el caldo de fermentado. Además, la pervaporación se puede acoplar fácilmente a la fermentación de modo que los solventes se retiran continuamente, tan pronto como se forman. Además, el proceso es energéticamente eficiente e inofensivo para el caldo de fermentación (Garcia *et al.*, 2011; Selvaraj y Banat, 2019).

El material de la membrana influye en la separación alcanzada en el proceso. Si el material de la membrana es hidrófobo, la membrana permeará preferentemente compuestos orgánicos en relación con el agua y el permeado se verá enriquecido en los compuestos orgánicos. Por el contrario, si la membrana presenta propiedades hidrófilas, se enriquecerá en agua en el permeado y los compuestos orgánicos permanecerán en el retenido (Ranjan y Moholkar, 2012). Los dos parámetros principales son la selectividad de la membrana, denominada factor de enriquecimiento y el flujo (Garcia *et al.*, 2011). Los valores de estos parámetros dependen de las condiciones experimentales (temperatura, composiciones de alimentación, material y espesor de la membrana y las presiones a ambos lados de la membrana) (Qureshi y Blaschek, 1999).

Se han realizado una gran cantidad de trabajos para recuperar tanto etanol como butanol de caldos de fermentación utilizando membranas permeables (Vane, 2008; Garcia *et al.*, 2011; Castro-Muñoz *et al.*, 2018). La mayoría de los estudios publicados utilizan membranas de polidimetilsiloxano (PDMS). Se selecciona este polímero debido a su alta permeabilidad, su elevada selectividad y su buena adaptabilidad a diversas formas de membrana, tanto con formatos planos como tubulares (Thongsukmak y Sirkar, 2007). El rendimiento de la membrana de PDMS ha mejorado mucho incorporando silicalita en caucho de silicona (Huang y Meagher, 2001; Fouad y Feng, 2008). Otros materiales utilizados son bloques de amida de poliéter (PEBA) (Fouad y Feng, 2008) y poli-1-trimetilsilil-1-propino (PTMSP) (Thongsukmak y Sirkar, 2007). La principal desventaja que presenta este material es que componentes impermeables presentes en el caldo, tales como ácidos, bases, sales y azúcares, puedan influir en el rendimiento de la pervaporación, al penetrar la membrana y causar su ensuciamiento y deterioro (Garcia *et al.*, 2009).

1.8.5. Perstracción

Una variante de la pervaporación es la perstracción, que en esencia combina los principios de la pervaporación y la extracción L-L (Ranjan y Koholmar, 2012). Este proceso supera ciertas deficiencias del proceso de extracción L-L, como son la toxicidad del disolvente, la agregación de microorganismos en la interfase L-L, la formación de emulsiones y los problemas de separación entre las fases acuosa-orgánica (Qureshi y

Maddox, 2005). Otra ventaja de esta técnica es el control independiente de la velocidad del flujo del caldo y del extractante. Asimismo, una disposición en serie de los módulos de las membranas de fibra hueca facilita el funcionamiento en modo de contracorriente, favoreciendo una eliminación eficaz de butanol. Con la perstracción, se consigue la difusión de los productos de fermentación de modo controlado, basándose en la diferencia de presiones de vapor de los componentes de difusión en los dos lados de la membrana. Una vez que los componentes atraviesan la membrana, los productos se disuelven inmediatamente en el extractante.

1.8.6. Adsorción

La adsorción, fundamentalmente los tamices moleculares, han sido ampliamente utilizados para deshidratar el bioetanol para la obtención de etanol anhidro para uso carburante. La adsorción también tiene un gran potencial para la separación de butanol de caldos de fermentación ABE (Stagg y Nielsen, 2015).

En los procesos de adsorción, las moléculas, tanto de líquidos como gaseosas, se unen preferentemente a una superficie sólida. La fase sólida se llama “adsorbente”, el componente adsorbido se denomina “adsorbato”. La adsorción se debe a las fuerzas de atracción existentes entre la superficie del adsorbente y las moléculas de adsorbato. Las fuerzas atractivas son de tipo van der Waals (dispersión y repulsión), fuerzas electrostáticas y enlaces químicos (Venkatesen, 2013). La relación de equilibrio entre la cantidad de material adsorbido por un sólido y la presión del gas, a temperatura constante, se denomina isoterma de adsorción y se obtienen experimentalmente. En la Figura 1.10, se esquematiza del proceso de adsorción cíclica. Los adsorbentes son generalmente más biocompatibles que los solventes, totalmente inmiscibles y no emulsionan, lo que facilita su separación de los microorganismos y favorece su regeneración y reutilización repetitiva (Huang *et al.*, 2014). El proceso de adsorción se desarrolla en dos etapas: una primera etapa de adsorción seguida de una etapa de desorción para obtener una solución concentrada del solvente a recuperar con regeneración de los adsorbentes.

La selectividad del adsorbente influye significativamente sobre el rendimiento del proceso de recuperación ya que los caldos de fermentación contienen numerosos

metabolitos generados, sustratos y nutrientes no agotados (Dürre, 2007). La capacidad de adsorción, la selectividad y la facilidad de desorción dependen del material adsorbente sólido utilizado (Abdehagh *et al.*, 2014). Destacan tres tipos de materiales adsorbentes para la recuperación de butanol y etanol de caldos de fermentación: el carbón activado, las zeolitas y las resinas poliméricas.

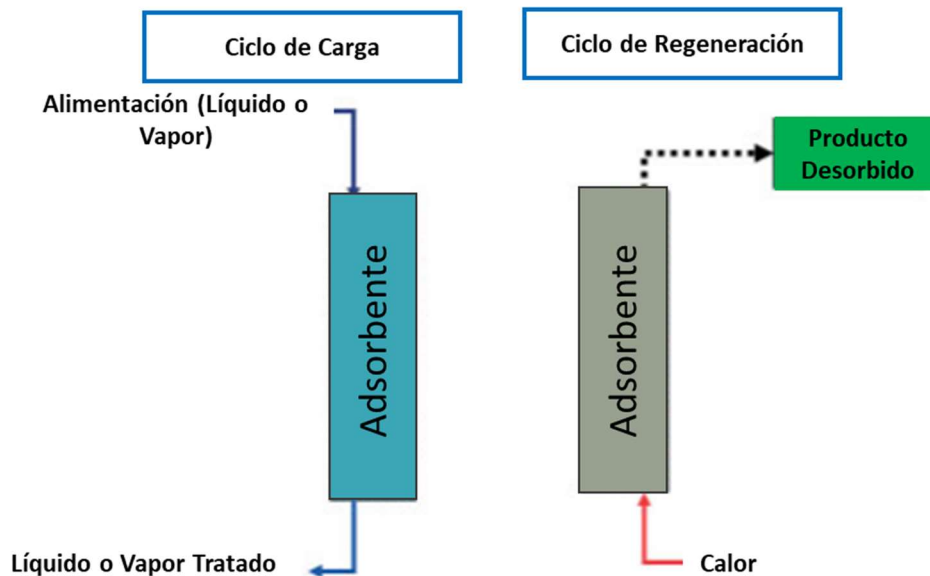


Figura 1.10. Esquema de la recuperación de solventes por adsorción, incluyendo tanto el ciclo de carga como el de regeneración (Adaptado de Vane, 2008).

La desorción de especies adsorbidas de un adsorbente se puede realizar mediante (1) oscilación de presión, (2) purga de arrastre de vapor, (3) desorción por desplazamiento y (4) oscilación térmica (Oudshoorn *et al.*, 2012). La regeneración del adsorbente mediante oscilación térmica es la técnica de regeneración más utilizada (Oudshoorn *et al.*, 2012). Las operaciones de oscilación térmica utilizan el cambio en el comportamiento de adsorción en función de la temperatura.

Referencias

- Abdehagh, N., Tezel, F. H., & Thibault, J. (2014). Separation techniques in butanol production: challenges and developments. *Biomass and Bioenergy*, *60*, 222-246.
- Adam, A. C., Rubio-Teixeira, M., & Polaina, J. (2005). Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. *BFSN*, *44*(7-8), 553-557.
- Ahlgren, E. O., Börjesson Hagberg, M., & Grahn, M. (2017). Transport biofuels in global energy–economy modelling—a review of comprehensive energy systems assessment approaches. *Gcb Bioenergy*, *9*(7), 1168-1180.
- Ahmad, T., Aadil, R. M., Ahmed, H., ur Rahman, U., Soares, B. C., Souza, S. L., ... & Freitas, M. Q. (2019). Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends in Food Science & Technology*.
- Alternative Fuel Data Center. (Disponible online: <https://www.afdc.energy.gov/data/?q=ethanol>).
- Al-Wasify, R. S., Ali, M. N., & Hamed, S. R. (2017). Biodegradation of dairy wastewater using bacterial and fungal local isolates. *Water Science and Technology*, *76*(11), 3094-3100.
- Amarasekara, A. S. (2013). *Handbook of cellulosic ethanol*. John Wiley & Sons.
- Annachhatre, A. P., & Bhamidimarri, S. M. R. (1992). Microbial attachment and growth in fixed-film reactors: process startup considerations. *Biotechnology advances*, *10*(1), 69-91.
- Arshad, M., Hussain, T., Iqbal, M., & Abbas, M. (2017). Enhanced ethanol production at commercial scale from molasses using high gravity technology by mutant *S. cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*(3), 403-409.
- Bahl, H., & Dürre, P. (2000). Biotechnology and medical applications. *Biotechnology*, *2*(1).
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, *26*(1), 89-105.
- Baker, J. A., Li, J., Zhou, D., Yang, M., Cook, M. N., Jones, B. C., ... & Lu, L. (2017). Analyses of differentially expressed genes after exposure to acute stress, acute ethanol, or a combination of both in mice. *Alcohol*, *58*, 139-151.
- Becerra, M., Cerdán, M. E., & González-Siso, M. I. (2015). Biobutanol from cheese whey. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 27.

- Bertoldi P., Diluiso F., Castellazzi L., Labanca N. and Ribeiro Serrenho T., Energy Consumption and Energy Efficiency Trends in the EU-28 2000-2015, EUR 29104 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018, ISBN 978-92-79-79372-1, doi:10.2760/6684, JRC110326.
- Bîldea, C. S., Patraşcu, I., Hernandez, J. S., & Kiss, A. A. (2016). Enhanced down-stream processing of biobutanol in the ABE fermentation process. In *Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 38, pp. 979-984). Elsevier.
- Cao, Y., Wang, K., Wang, X., Gu, Z., Gibbons, W., & Vu, H. (2015). Adsorption of butanol vapor on active carbons with nitric acid hydrothermal modification. *Bioresource Technology*, 196, 525-532.
- Castro-Muñoz, R., Galiano, F., Fíla, V., Drioli, E., & Figoli, A. (2019). Mixed matrix membranes (MMMs) for ethanol purification through pervaporation: Current state of the art. *Reviews in Chemical Engineering*.
- CE (2018a). Commission staff working document: "Evaluation of the EU Strategy on adaptation to climate change" accompanying the document "Report from the Commission to the European Parliament and the Council on the implementation of the EU Strategy on adaptation to climate change" of 12 November 2018. (Document number: 32018L2001).
- CE (2018b). DIRECTIVA (UE) 2018/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de diciembre de 2018 relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables (versión refundida).
- CE (1996). DIRECTIVA 96/61/CE DEL CONSEJO de 24 de septiembre de 1996 relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación
- Chen, G. Q., Talebi, S., Gras, S. L., Weeks, M., & Kentish, S. E. (2018). A review of salty waste stream management in the Australian dairy industry. *Journal of Environmental Management*, 224, 406-413.
- Cheryan, M. & Alvarez, J. R. (1995). Food and beverage industry applications. In: *Membrane Science and Technology* (Vol. 2, pp. 415-465). Elsevier.
- Corrales, L., Romero, D., Macías, J. & Vargas, A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*. 13. 55.
- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3-4), 217-221.

- Cowan, M. M., Warren, T. M., & Fletcher, M. (1991). Mixed-species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. *Biofouling*, 3(1), 23-34.
- Das, M., Raychaudhuri, A., & Ghosh, S. K. (2016). Supply chain of bioethanol production from whey: a review. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 833-846.
- Deesuth, O., Laopaiboon, P., Klanrit, P., & Laopaiboon, L. (2015). Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: Effects of nutrient supplementation and aeration. *Industrial Crops and Products*, 74, 95-102.
- Díaz-Montaño, D. M. (2013). Continuous agave juice fermentation for producing bioethanol. In *Biomass Now-Sustainable Growth and Use*. IntechOpen.
- Diniz, R. H., Rodrigues, M. Q., Fietto, L. G., Passos, F. M., & Silveira, W. B. (2014). Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 111-117.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Douglas, F., Hambleton, R., & Rigby, G. J. (1973). An Investigation of the Oxidation-reduction Potential and of the Effect of Oxygen on the Germination and Outgrowth of *Clostridium butyricum* Spores, using Platinum Electrodes. *Journal of Applied Bacteriology*, 36(4), 625-633.
- Dragone, G., Mussatto, S. I., e Silva, J. B. A., & Teixeira, J. A. (2011). Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1977-1982.
- Duarte, J. C., Rodrigues, J. A. R., Moran, P. J., Valença, G. P., & Nunhez, J. R. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3(1), 31.
- Dunn, I. J., Ingham, J., Heinzle, E., & Prenosil, J. E. (1992). *Biological Reaction Engineering* (p. 438). Weinheim: VCH.
- Dürre, P. (2007). Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(12), 1525-1534.

- Dürre, P. (1998). New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(6), 639-648.
- EEA, 2018, Renewable energy in Europe 2018: recent growth and knock-on effects, EEA Report No 20/2018, European Environment Agency Disponible online en: <https://www.eea.europa.eu/publications/renewable-energy-in-europe-2018>.
- European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2018. *EFSA Journal*. 2018; 16(7).
- Ennis, B. M., & Maddox, I. S. (1989). Production of solvents (ABE fermentation) from whey permeate by continuous fermentation in a membrane bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 4(1), 27-34.
- Ennis, B. M., Gutierrez, N. A., & Maddox, I. S. (1986). The acetone-butanol-ethanol fermentation: A current assessment. *Process Biochemistry*, 21(5), 131-147.
- Ennis, B. M., & Maddox, I. S. (1985). Use of *Clostridium acetobutylicum* P262 for production of solvents from whey permeate. *Biotechnology Letters*, 7(8), 601-606.
- Elnashar, M. M. M. (2011). *U.S. Patent Application No. 12/866,748*.
- EPure. European renewable ethanol – key figures 2018. *European Renewable Ethanol Association*. Disponible online en: <https://epure.org/media/1920/190828-def-data-statistics-2018-infographic.pdf>.
- Eş, I., Vieira, J. D. G., & Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), 2065-2082.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2013). Microbial production of a biofuel (acetone–butanol–ethanol) in a continuous bioreactor: impact of bleed and simultaneous product removal. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(1), 109-116.
- Ezeji, T., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2007). Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii*. *Process Biochemistry*, 42(1), 34-39.

- Ezeji, T. C., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. M. (2005). Industrially relevant fermentations. In *Handbook on Clostridia* (pp. 797-812). CRC Press.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2003). Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and *in situ* recovery by gas stripping. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(6), 595-603.
- U.S. Food & Drug Administration (FDA). 2018 Apr 1 [cited 9 Nov 2018]. Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food 2018. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm>
- Foda, M. I., Dong, H., & Li, Y. (2010). Study the suitability of cheese whey for bio-butanol production by Clostridia. *Journal of American Science*, 6(8), 39-46.
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3), 339-354.
- Fouad, E. A., & Feng, X. (2008). Use of pervaporation to separate butanol from dilute aqueous solutions: Effects of operating conditions and concentration polarization. *Journal of Membrane Science*, 323(2), 428-435.
- Frey, P. A. (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *The FASEB Journal*, 10(4), 461-470.
- Friedl, A., 2016. Downstream process options for the ABE fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 363, 1–5. doi:10.1093/femsle/fnw073
- Friedl, A., Qureshi, N., & Maddox, I. S. (1991). Continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* in a packed bed reactor and integration with product removal by pervaporation. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(5), 518-527.
- Gabardo, S., Pereira, G. F., Rech, R., & Ayub, M. A. Z. (2015). The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(9), 1243-1253.
- Gabardo, S., Rech, R., Rosa, C. A., & Ayub, M. A. Z. (2014). Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renewable Energy*, 69, 89-96.

- Gabardo, S., Rech, R., & Ayub, M. A. Z. (2012). Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *87*(8), 1194-1201.
- Gabriel, C. L., & Crawford, F. M. (1930). Development of the butyl-acetonic fermentation industry. *Industrial & Engineering Chemistry*, *22*(11), 1163-1165.
- Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, *18*(7), 685-694.
- García, V., Pääkkilä, J., Ojamo, H., Muurinen, E., & Keiski, R. L. (2011). Challenges in biobutanol production: how to improve the efficiency?. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*(2), 964-980.
- García, V., Pongrácz, E., Muurinen, E., & Keiski, R. L. (2009). Pervaporation of dichloromethane from multicomponent aqueous systems containing n-butanol and sodium chloride. *Journal of Membrane Science*, *326*(1), 92-102.
- Genisheva, Z., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. (2011). Evaluating the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, *34*(1), 979-985.
- George, H. A., & Chen, J. S. (1983). Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerinckii* (synonym, *C. butylicum*). *Applied Environmental Microbiology*, *46*(2), 321-327.
- Ghaly, A. E., & El-Taweel, A. A. (1995). Effect of micro-aeration on the growth of *Candida pseudotropicalis* and production of ethanol during batch fermentation of cheese whey. *Bioresource Technology*, *52*(3), 203-217.
- Godoy, A., Amorim, H.V., Lopes, M.L., Oliveira, A.J. (2008) Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *International Sugar Journal*, *110*, 175–181.
- Goncalves, L. M. D., Barreto, M. T. O., Xavier, A. M. B. R., Carrondo, M. J. T., & Klein, J. (1992). Inert supports for lactic acid fermentation—a technological assessment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *38*(3), 305-311.
- Gonzalez-Siso, M. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, *57*(1), 1-11.

- Green, E. M. (2011). Fermentative production of butanol—the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 337-343.
- Gu, Y., Jiang, Y., Wu, H., Liu, X., Li, Z., Li, J., ... & Li, Y. (2011). Economical challenges to microbial producers of butanol: feedstock, butanol ratio and titer. *Biotechnology Journal*, 6(11), 1348-1357.
- Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28, 375-384.
- Guimarães, P.M., Teixeira, J.A., Domingues, L. (2008). Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 30(11), 1953.
- Gunasekaran, P., & Kamini, N. R. (1991). High ethanol productivity from lactose by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(5), 551-556.
- Guimarães, P. M., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), 375-384.
- Guimaraes, P. M., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2008). Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 30(11), 1953.
- Guo, X., Zhou, J., & Xiao, D. (2010). Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), 532-538.
- Hägström, L. (1985). Acetone-butanol fermentation and its variants. *Biotechnology Advances*, 3(1), 13-28.
- 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.
- 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*, 1-12.

- 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.
- Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambroner, J., Paniagua-García, A. I., & Díez-Antolínez, R. (2018). Biobutanol production from coffee silverskin. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 154.
- 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 wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(21), 8041-8052.
- Hirani, A. H., Javed, N., Asif, M., Basu, S. K., & Kumar, A. (2018). A review on first-and second-generation biofuel productions. In *Biofuels: Greenhouse Gas Mitigation and Global Warming* (pp. 141-154). Springer, New Delhi.
- Ho, D. P., Ngo, H. H., & Guo, W. (2014). A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresource Technology*, 169, 742-749.
- Huang, H. J., Ramaswamy, S., & Liu, Y. (2014). Separation and purification of biobutanol during bioconversion of biomass. *Separation and Purification Technology*, 132, 513-540.
- Huang, J., & Meagher, M. M. (2001). Pervaporative recovery of n-butanol from aqueous solutions and ABE fermentation broth using thin-film silicalite-filled silicone composite membranes. *Journal of Membrane Science*, 192(1-2), 231-242.
- Idris, A., & Suzana, W. (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41(5), 1117-1123.
- Inglede, W. M. (2003). Continuous fermentation in the fuel alcohol industry: how does the technology affect yeast. *The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*. Nottingham University Press, Nottingham, 135-144.
- Jelen, P. (2009). Dried whey, whey proteins, lactose and lactose derivative products. *Dairy Powders and Concentrated Products*, 255-266.
- De Jesus, C. S. A., Ruth, V. G. E., Daniel, S. F. R., & Sharma, A. (2015). Biotechnological alternatives for the utilization of dairy industry waste products. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(03), 223.
- Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50(4), 484.

- Karakashev, D., Thomsen, A. B., & Angelidaki, I. (2007). Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass. *Biotechnology Letters*, *29*(7), 1005-1012.
- Karaguler, T., Kahraman, H., & Tuter, M. (2017). Analyzing effects of ELF electromagnetic fields on removing bacterial biofilm. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, *37*(2), 336-340.
- Karel, S. F., Libicki, S. B., & Robertson, C. R. (1985). The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science*, *40*(8), 1321-1354.
- Kargi, F., & Ozmihci, S. (2006). Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*(5), 711-718.
- Kilonzo, P., & Bergougou, M. (2012). Surface modifications for controlled and optimized cell immobilization by adsorption: applications in fibrous bed bioreactors containing recombinant cells. *Journal of Microbiology Biochemical Technology*, *8*, 18-21.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, *21*(4), 377-397.
- Kumar, M., & Gayen, K. (2011). Developments in biobutanol production: new insights. *Applied Energy*, *88*(6), 1999-2012.
- Kujawska, A., Kujawski, J., Bryjak, M., & Kujawski, W. (2015). ABE fermentation products recovery methods—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *48*, 648-661.
- Kwiatkowski, J. R., McAloon, A. J., Taylor, F., & Johnston, D. B. (2006). Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products*, *23*(3), 288-296.
- Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K. H., O'Byrne, C. P., & Morrissey, J. P. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *100*(4), 507-519.
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, *24*(1-2), 17-26.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, *101*(2), 209-228.

- Li, T., Chen, X. B., Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2014). Open and continuous fermentation: products, conditions and bioprocess economy. *Biotechnology Journal*, 9(12), 1503-1511.
- Linden, J. C., Moreira, A. R., & Lenz, T. G. (1986). Acetone and butanol. *Comprehensive biotechnology: The principles of biotechnology: engineering consideration*. Pergamon press, Oxford, 915-931.
- Ling KC. Whey to ethanol: a biofuel role for dairy cooperatives? Washington DC: *USDA Rural Development*; 2008 (Disponibile online: <http://www.rurdev.usda.gov/RBS/pub/RR214.pdf>).
- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S. C., & Aparnathi, K. D. (2016). Whey and its utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(8), 134-155.
- Maddox, I. S., Steiner, E., Hirsch, S., Wessner, S., Gutierrez, N. A., Gapes, J. R., & Schuster, K. C. (2000). The Cause of " Acid Crash" and " Acidogenic Fermentations" During the Batch Acetone-Butanol-Ethanol (ABE-) Fermentation Process. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(1), 95-100.
- Maddox, I. S., Qureshi, N., & Roberts-Thomson, K. (1995). Production of acetone-butanol-ethanol from concentrated substrate using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. *Process Biochemistry*, 30(3), 209-215.
- Maddox, I. S., & Murray, A. E. (1983). Production of n-butanol by fermentation of wood hydrolysate. *Biotechnology Letters*, 5(3), 175-178.
- Madiah M.S., Ariff A.B., Sahaid K.M., Suraini A.A., Karim M.I.A., 2001, Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 567-576.
- Maniatis, Kyriakos & Landälv, Ingvar & Waldheim, Lars & van den Heuvel, Eric & Kalligeros, Stamatis. (2017). Sub Group on Advanced Biofuels (SGAB) - Building Up the Future. Terminology and Glossary With common abbreviations & conversion factors.
- Margaritis, A., & Kilonzo, P. M. (2005). Production of ethanol using immobilised cell bioreactor systems. In *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology* (pp. 375-405). Springer, Dordrecht.
- Mariano, A. P., Qureshi, N., Filho, R. M., & Ezeji, T. C. (2011). Bioproduction of butanol in bioreactors: new insights from simultaneous *in situ* butanol recovery to eliminate product toxicity. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), 1757-1765.

- Marwaha, S. S., & Kennedy, J. F. (1984). Ethanol production from whey permeate by immobilized yeast cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 6(1), 18-22.
- Matsumura, M., Kataoka, H., Sueki, M., & Araki, K. (1988). Energy saving effect of pervaporation using oleyl alcohol liquid membrane in butanol purification. *Bioprocess Engineering*, 3(2), 93-100.
- Milne, C. B., Eddy, J. A., Raju, R., Ardekani, S., Kim, P. J., Senger, R. S., ... & Price, N. D. (2011). Metabolic network reconstruction and genome-scale model of butanol-producing strain *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *BMC Systems Biology*, 5(1), 130.
- Mitchell, W. J. (1997). Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 39, pp. 31-130). Academic Press.
- Mollea C., Marmo L., Bosco F., 2013, Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry: Food Industry Eds. I. Muzzalupo, *INTECH*, 549-588. ISBN 9789535109112
- Mussatto, S. I., & Teixeira, J. A. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 897-907).
- Nanda, S., Azargohar, R., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2015). An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 925-941.
- Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2014). Butanol and ethanol production from lignocellulosic feedstock: biomass pretreatment and bioconversion. *Energy Science & Engineering*, 2(3), 138-148.
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M. E., Marzocchella, A., & Salatino, P. (2011). Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*—assessment of acidogenesis kinetics. *Bioresource Technology*, 102(2), 1608-1614.
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M. E., Marzocchella, A., & Salatino, P. (2010). Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a continuous packed bed reactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(6), 603-608.
- Napoli F. Development of an integrated process for butanol production. Dottorato in Scienze Biotecnologiche- XXII ciclo Indirizzo Biotechnologie Industriali. 2009. University of Napoli Federico II.

- Nedović, V., Willaert, R., Leskošek-Čukalović, I., Obradović, B., & Bugarski, B. (2005). Beer production using immobilised cells. In *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology* (pp. 259-273). Springer, Dordrecht.
- Nimcevic, D., Schuster, M., & Gapes, J. R. (1998). Solvent production by *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 growing on different potato media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(4), 426-428.
- Nooshkam, M., Babazadeh, A., & Jooyandeh, H. (2018). Lactulose: Properties, techno-functional food applications, and food grade delivery system. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 23-34.
- Nuñez, M. J., & Lema, J. M. (1987). Cell immobilization: Application to alcohol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(11), 642-651.
- OECD (2018), "Cheese projections: Production and trade", in OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2018), "Biofuels", In OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026, OECD Publishing, Paris.
- Oh, Y. K., Hwang, K. R., Kim, C., Kim, J. R., & Lee, J. S. (2018). Recent developments and key barriers to advanced biofuels: a short review. *Bioresource Technology*, 257, 320-333.
- Organización de Naciones Unidad (ONU) (2015). Acuerdo de París dentro de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) Disponible online en: <https://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/spa/l09s.pdf>.
- Organización de Naciones Unidad (ONU) (2019). Acuerdo de Chile – Madrid: Tiempo de actuar dentro de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) Disponible online en: https://unfccc.int/sites/default/files/resource/cp2019_L10S.pdf
- Oudshoorn, A., Van Der Wielen, L. A., & Straathof, A. J. (2009). Assessment of options for selective 1-butanol recovery from aqueous solution. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(15), 7325-7336.
- Oudshoorn, A., Van der Wielen, L. A. M., & Straathof, A. J. J. (2012). Desorption of butanol from zeolite material. *Biochemical Engineering Journal*, 67, 167-172.
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2009). Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration. *Journal of Chemical*

- Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(1), 106-111.
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2008). Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. *Biochemical Engineering Journal*, 42(2), 180-185.
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2007). Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), 876-880.
- Panghal, A., Kumar, V., Dhull, S. B., Gat, Y., & Chhikara, N. (2017). Utilization of dairy industry waste-whey in formulation of papaya RTS beverage. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 5(2), 168-174.
- Pal, P., Kumar, R., & Ghosh, A. K. (2018). Analysis of process intensification and performance assessment for fermentative continuous production of bioethanol in a multi-staged membrane-integrated bioreactor system. *Energy Conversion and Management*, 171, 371-383.
- Paniagua-García, A. I., Hijosa-Valsero, M., Díez-Antolínez, R., Sánchez, M. E., & Coca, M. (2018). Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: The case of *Panicum virgatum*. *Biomass and Bioenergy*, 116, 131-139.
- Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M., & Bressler, D. C. (2016). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1859-1867.
- Parrondo, J., García, L. A., & Díaz, M. (2009). Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26(3), 445-456.
- Pasotti, L., Zucca, S., Casanova, M., Micoli, G., De Angelis, M. G. C., & Magni, P. (2017). Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 17(1), 48.
- Patakova, P., Lipovsky, J., Paulova, L., Linhova, M., Friber, P., Rychtera, M., & Melzoch, K. (2011). Continuous production of butanol by bacteria of genus *Clostridium*. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 5(2).

- Patraşcu, I., Bîldea, C. S., & Kiss, A. A. (2017). Eco-efficient butanol separation in the ABE fermentation process. *Separation and Purification Technology*, *177*, 49-61.
- Pentjuss, A., Stalidzans, E., Liepins, J., Kokina, A., Martynova, J., Zikmanis, P., ... & Fell, D. A. (2017). Model-based biotechnological potential analysis of *Kluyveromyces marxianus* central metabolism. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *44*(8), 1177-1190.
- Pescuma, M., de Valdez, G. F., & Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(15), 6183-6196.
- Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P., & Laopaiboon, L. (2017). Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes. *Electronic Journal of Biotechnology*, *26*, 84-92.
- Puligundla, P., Smogrovicova, D., Mok, C., & Obulam, V. S. R. (2019). A review of recent advances in high gravity ethanol fermentation. *Renewable Rnergy*, *133*, 1366-1379.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, *110*, 48-68.
- Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M. E., Salatino, P., & Marzocchella, A. (2015). Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*—Assessment of solventogenic kinetics. *Bioresource Technology*, *180*, 330-337.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Dien, B., Hector, R. E., & Cotta, M. A. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I—Use of barley straw hydrolysate. *Biomass and Bioenergy*, *34*(4), 559-565.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Dien, B., Hughes, S., Liu, S., ... & 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*(4), 566-571.
- Qureshi, N., & Ezeji, T. C. (2008). Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, *2*(4), 319-330.
- Qureshi, N., & Maddox, I. S. (2005). Reduction in butanol inhibition by perstraction: utilization of concentrated lactose/whey permeate by *Clostridium acetobutylicum* to enhance butanol fermentation economics. *Food and Bioproducts Processing*, *83*(1), 43-52.

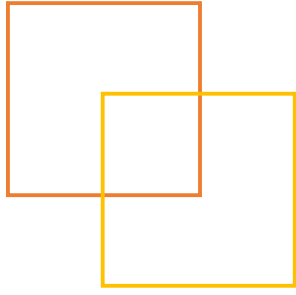
- Qureshi, N., & Blaschek, H. (2001). Evaluation of recent advances in butanol fermentation, upstream, and downstream processing. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(4), 219-226.
- Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (1999). Economics of butanol fermentation using hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Food and Bioproducts Processing*, 78(3), 139-144.
- Qureshi, N., & Maddox, I. S. (1995). Continuous production of acetone-butanol-ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(2), 185-189.
- Qureshi, N., & Maddox, I. S. (1987). Continuous solvent production from whey permeate using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(11), 668-671.
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2015). Looking beyond Saccharomyces: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 15(6).
- Ranjan, A., & Moholkar, V. S. (2012). Biobutanol: science, engineering, and economics. *International Journal of Energy Research*, 36(3), 277-323.
- Raganati, F., Procentese, A., Olivieri, G., Russo, M. E., Gotz, P., Salatino, P., & Marzocchella, A. (2016). Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a series of packed bed biofilm reactors. *Chemical Engineering Science*, 152, 678-688.
- Raganati, F., Olivieri, G., Procentese, A., Russo, M. E., Salatino, P., & Marzocchella, A. (2013). Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. *Bioresource Technology*, 138, 259-265.
- Ramaswamy, S., Huang, H. J., & Ramarao, B. V. (2013). Separation and purification technologies in biorefineries (p. 1). John Wiley & Sons Incorporated.
- Risner, D., Shayevitz, A., Haapala, K., Meunier-Goddik, L., & Hughes, P. (2018). Fermentation and distillation of cheese whey: Carbon dioxide-equivalent emissions and water use in the production of whey spirits and white whiskey. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2963-2973.
- Rom, A., Miltner, A., Wukovits, W., & Friedl, A. (2016). Energy saving potential of hybrid membrane and distillation process in butanol purification: Experiments, modelling and simulation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 104, 201-211.

- Ross D. (1961). The acetone-butanol-ethanol fermentation. *Progress in Industrial Microbiology*, 3, 3-85.
- Rubio-Teixeira, M. (2006). Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnology Advances*, 24(2), 212-225.
- Saini, P., Beniwal, A., Kokkiligadda, A., & Vij, S. (2017). Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol. *Process Biochemistry*, 62, 69-79.
- Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., & Iorio, G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and Bioenergy*, 33(12), 1687-1692.
- Sarangi, P. K., & Nanda, S. (2018). Recent Developments and Challenges of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation. In: *Recent Advancements in Biofuels and Bioenergy Utilization* (pp. 111-123). Springer, Singapore.
- Saratale, G. D., & Oh, S. E. (2012). Lignocellulosics to ethanol: The future of the chemical and energy industry. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1002-1013.
- Schoutens, G. H., Nieuwenhuizen, M. C. H., & Kossen, N. W. F. (1985). Continuous butanol production from whey permeate with immobilized *Clostridium beyerinckii* LMD 27.6. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 282-286.
- Seader, J. D., Henley, E. J., & Roper, D. K. (1998). *Separation process principles* (Vol. 25). New York: Wiley.
- Shaheen, R., Shirley, M., & Jones, D. T. (2000). Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(1), 115-124.
- Selvaraj, M. & Banat, F. (2019). Ethanol-water separation using membrane technology. In: *Biorefinery: Integrated Sustainable Processes for Biomass Conversion to Biomaterials, Biofuels, and Fertilizers*. Springer.
- Silva, A. C., Guimaraes, P. M., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(9), 973-982.

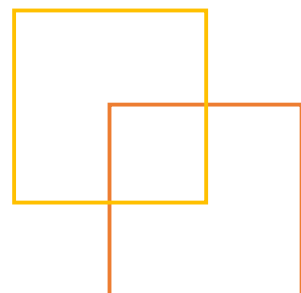
- Silveira, W. B., Passos, F. J. V., Mantovani, H. C., & Passos, F. M. L. (2005). Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxidoreductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 930-936.
- Singh, Ram. (2014). Biotechnological Approaches for Valorization of Whey. In book: Advances in Industrial Biotechnology, Chapter: Biotechnological Approaches for Valorization of Whey, Publisher: I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, Bangalore, India, Editors: Ram Sarup Singh, Ashok Pandey, Christian Larroche, pp.443-478
- Spencer, J., de Spencer, A. R., & Lalue, C. (2002). Non-conventional yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(2), 147-156.
- Staggs, K. W., & Nielsen, D. R. (2015). Improving n-butanol production in batch and semi-continuous processes through integrated product recovery. *Process Biochemistry*, 50(10), 1487-1498.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2013). *Principles of fermentation technology*. Elsevier
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209.
- Thang, V. H., Kanda, K., & Kobayashi, G. (2010). Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1-8), 157-170.
- Thongsukmak, A., & Sirkar, K. K. (2007). Pervaporation membranes highly selective for solvents present in fermentation broths. *Journal of Membrane Science*, 302(1-2), 45-58.
- Tomaszewska, M., Białończyk, L. (2016). Ethanol production from whey in a bioreactor coupled with direct contact membrane distillation. *Catalysis Today*, 268, 156-163.
- UNE-EN 15692:2009. Etanol como componente en la formulación de gasolinas. Determinación del contenido en agua. Método de valoración potenciométrica de Karl Fischer.
- UNE-EN 15489:2008. Etanol como componente en la formulación de gasolinas. Determinación del contenido en agua. Método de valoración coulombimétrica de Karl Fischer.
- Van der Wende, E., & Characklis, W. G. (1990). Biofilms in potable water distribution systems. In *Drinking water microbiology* (pp. 249-268). Springer, New York, NY.
- Vane, L. M. (2008). Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(6), 553-588.

- Venkatesen, V. Adsorption. In: Ramaswamy, S., Huang, H. J., & Ramarao, B. V. (2013). *Separation and purification technologies in biorefineries* (p. 1). John Wiley & Sons Incorporated.
- Visioli, L. J., Enzweiler, H., Kuhn, R. C., Schwaab, M., & Mazutti, M. A. (2014). Recent advances on biobutanol production. *Sustainable chemical processes*, 2(1), 15.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573-584.
- de Vrije, T., Budde, M., van der Wal, H., Claassen, P. A., & López-Contreras, A. M. (2013). "In situ" removal of isopropanol, butanol and ethanol from fermentation broth by gas stripping. *Bioresource Technology*, 137, 153-159.
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 30.
- Weast, R. C., Astle, M. J., & Beyer, W. H. (1988). *CRC handbook of chemistry and physics* (Vol. 69). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Wechgama, K., Laopaiboon, L., & Laopaiboon, P. (2017). Enhancement of batch butanol production from sugarcane molasses using nitrogen supplementation integrated with gas stripping for product recovery. *Industrial Crops and Products*, 95, 216-226.
- Westman, J. O., & Franzen, C. J. (2015). Current progress in high cell density yeast bioprocesses for bioethanol production. *Biotechnology Journal*, 10(8), 1185-1195.
- Willem, K., & Van Der, L. P. J. (1939). *U.S. Patent No. 2,183,141*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- De Wit J.N., 2001, Lecturer's handbook on whey and whey products. European Whey Products Association. Brussels, Belgium. Available at: [<http://ewpa.euromilk.org/publications.html>].
- Wong, S. S., Mi, L., & Liao, J. C. (2017). Microbial production of butanols. *Industrial Biotechnology: Products and Processes*, 573-595.
- Xue, C., Zhao, J. B., Chen, L. J., Bai, F. W., Yang, S. T., & Sun, J. X. (2014). Integrated butanol recovery for an advanced biofuel: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3463-3474.

- Xue, C., Zhao, J., Liu, F., Lu, C., Yang, S. T., & Bai, F. W. (2013). Two-stage *in situ* gas stripping for enhanced butanol fermentation and energy-saving product recovery. *Bioresource Technology*, *135*, 396-402.
- Xue, C., Zhao, J., Lu, C., Yang, S. T., Bai, F., & Tang, I. C. (2012). High-titer n-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in fed-batch fermentation with intermittent gas stripping. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(11), 2746-2756.
- Yabe, K., Shinoda, Y., Seki, T., Tanaka, H., & Akisawa, A. (2012). Market penetration speed and effects on CO₂ reduction of electric vehicles and plug-in hybrid electric vehicles in Japan. *Energy Policy*, *45*, 529-540.
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, *33*(6), 756-774.
- Zafar, S., & Owais, M. (2006). Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, *27*(3), 295-298.
- Zhang, J., Amartey, S., Lin, C., Shen, Z., Fan, L., & Qin, W. (2018). A Brief Review of Some Current Improvements in ABE Production: New Development of Raw Materials, Strain Improvement, Fermentation Systems, and End Product Extraction. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, *12*(5), 405-414.
- Zhang, Q., Wu, D., Lin, Y., Wang, X., Kong, H., & Tanaka, S. (2015). Substrate and product inhibition on yeast performance in ethanol fermentation. *Energy & Fuels*, *29*(2), 1019-1027.



2. Objetivos y Estructura



2.1. Objetivos

Esta tesis doctoral tiene como objetivo global la evaluación de tecnologías de fermentación eficientes que faciliten la valorización del lactosuero y el permeado de suero para la producción de alcoholes (etanol y butanol) para uso biocarburante. Para ello, se evaluará la influencia de los principales parámetros operacionales sobre la eficiencia de la fermentación en condiciones discontinuas. Además, se evaluarán otras tecnologías como son las fermentaciones a alta densidad, conocida por sus siglas en inglés VHG (Very High Gravity), combinadas con procesos continuos basados en inmovilización celular tanto por atrapamiento en esferas de alginato como por adsorción sobre soportes inertes, así como la integración de la recuperación *in situ* de solventes, para aumentar el rendimiento y la productividad de la fermentación ABE.

2.1.1. Objetivos específicos

Las actividades desarrolladas en este trabajo tratan de alcanzar los siguientes objetivos específicos (OE):

OE1.- Plantear estrategias ecosostenibles, simples y económicas de valorización del suero y el permeado de suero lácteo industrial para obtener etanol y butanol mediante procesos fermentativos.

OE2.- Mejorar la fermentación alcohólica para producir etanol a partir de permeado de suero industrial crudo en fermentaciones de alta densidad, evitando la suplementación de costosos nutrientes esenciales, mediante la selección de levaduras comerciales osmotolerantes en procesos discontinuos y continuos con inmovilización celular, tanto por atrapamiento en esferas de alginato como por adsorción sobre soportes inertes de bajo coste.

OE3.- Optimizar las condiciones de operación de la fermentación alcohólica de permeado de suero industrial crudo sin suplementar con nutrientes esenciales en procesos continuos con inmovilización celular mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), validados experimentalmente durante prolongados periodos de tiempo de fermentación.

OE4.- Optimizar los parámetros de la fermentación ABE para maximizar la producción de butanol a partir de lactosuero mediante diseños experimentales con Plackett-Burmann y MSR para reducir el consumo de nutrientes esenciales y maximizar el aprovechamiento de la lactosa para tratar de minimizar sus efectos medioambientales, a la vez que se reducen los costes de operación.

OE5.- Proponer tecnologías *in situ* de recuperación de butanol del caldo de fermentación integradas con la fermentación ABE, que permitan producir mayor concentración de butanol con un mejor aprovechamiento de la lactosa, al reducirse las inhibiciones microbianas.

2.2. Estructura de la tesis

Para alcanzar los objetivos globales y específicos de la tesis, se ha llevado a cabo el siguiente plan experimental, recogido en los diferentes capítulos técnicos de la tesis y que se resumen a continuación.

El bloque inicial de la tesis corresponde a la Introducción y Antecedentes (Capítulo 1), el presente capítulo (Capítulo 2), donde se definen los objetivos y la estructura seguida en los capítulos experimentales, y el Capítulo 3, en el que se describen los materiales y métodos utilizados.

En los Capítulos 4 y 5 de este trabajo, se recogen los ensayos de fermentación alcohólica para obtener etanol a partir de permeado de suero industrial altamente concentrado no enriquecido con nutrientes esenciales, en procesos continuos con inmovilización microbiana tanto por atrapamiento como por adsorción.

Concretamente, en el Capítulo 4, se evaluó el efecto de la temperatura y el pH en el desarrollo de la fermentación utilizando levaduras de la especie *Kluyveromyces marxianus*, tanto libres como inmovilizadas por atrapamiento en esferas de alginato. Además, se determinó la concentración límite de lactosa en el permeado de suero que permite evitar problemas de inhibición. Finalmente, se optimizaron con un diseño experimental mediante Metodología de Superficie de Respuestas (MSR), los parámetros más influyentes en la formación de los geles de alginato (concentración de alginato, carga celular y tamaño de la esfera).

En el Capítulo 5, se comparó la capacidad para producir etanol a partir de permeado de suero industrial altamente concentrado en lactosa de cuatro cepas de levadura de la especie *K. marxianus* y cuatro cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello, se seleccionó una cepa de cada uno de las especies de levadura y se optimizaron las condiciones de operación [temperatura (T), pH y tiempo (t)] a través de diseño experimental por MSR. Posteriormente, la cepa seleccionada fue inmovilizada por adsorción en cuatro soportes inertes de bajo coste (anillos Raschig de vidrio, plástico y silicona Tygon®, y esferas de alúmina) para evaluar su comportamiento a lo largo del tiempo.

En los Capítulos 6 y 7, siguiendo una metodología similar a la empleada para la obtención de etanol, se recogen los trabajos realizados para mejorar la fermentación ABE, a partir de suero lácteo con la cepa *Clostridium beijerinckii* CECT 508 en procesos discontinuos. En el Capítulo 6, mediante diseño experimental de Plackett-Burman y MSR, se determinaron los nutrientes esenciales para la fermentación ABE y se optimizaron sus concentraciones. El objetivo es maximizar la producción de butanol, minimizando el aporte de nutrientes para mejorar la rentabilidad económica del proceso.

Finalmente, en el Capítulo 7 se evaluó la combinación de la fermentación ABE con recuperación *in situ* de butanol mediante arrastre de vapor o gas-stripping, en una y dos etapas consecutivas, optimizándose las condiciones de operación mediante MSR

El Capítulo 8 recoge las conclusiones de los estudios desarrollados en la tesis doctoral, de modo que éstas puedan ser tenidas en consideración para futuros diseños de fermentaciones a mayor escala.

En la Figura 2.1 puede verse un resumen gráfico de la estructura descrita.

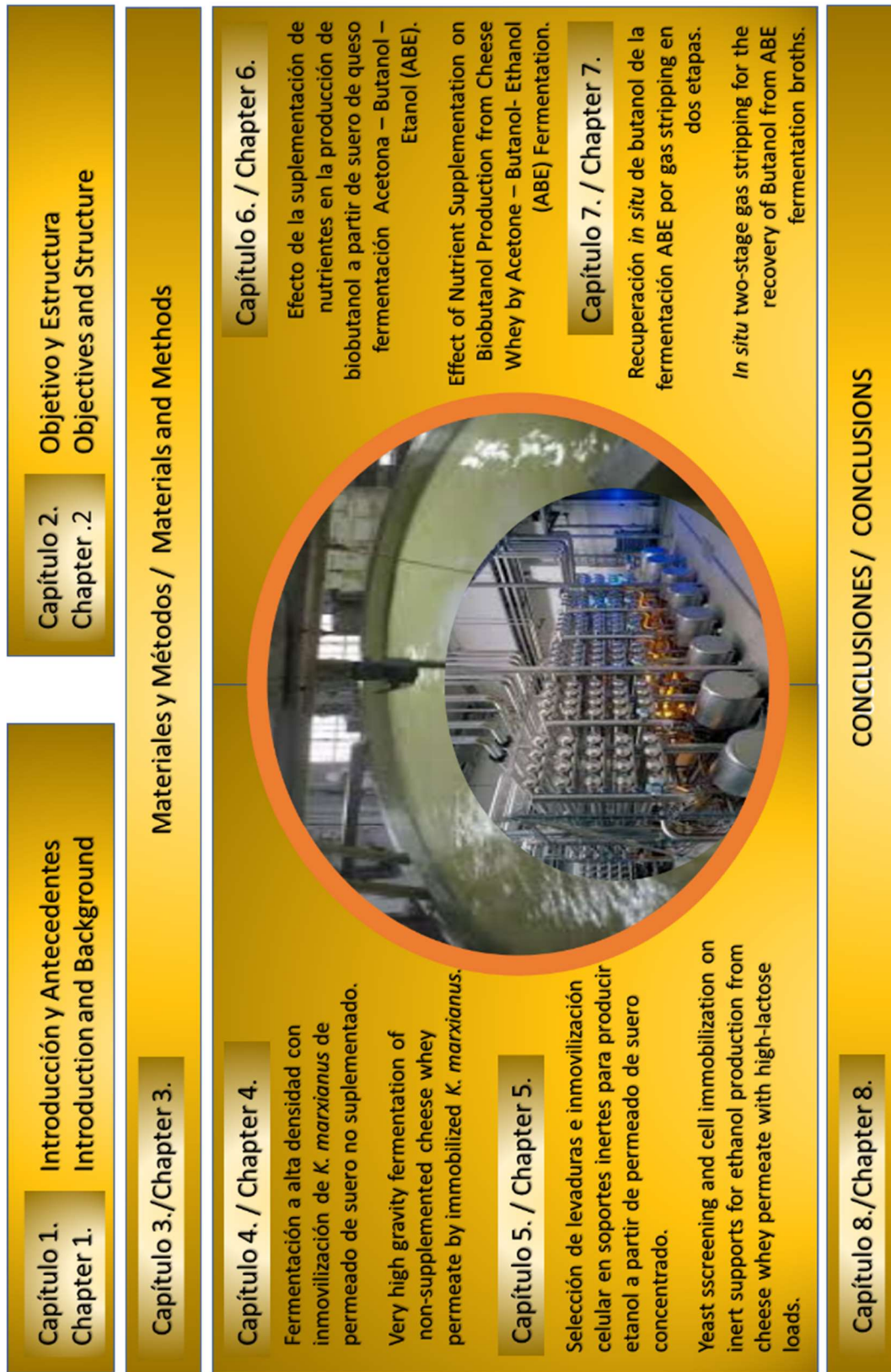
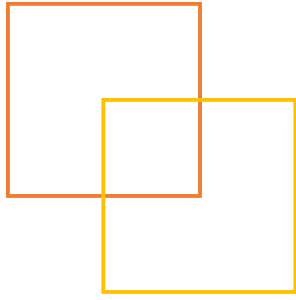
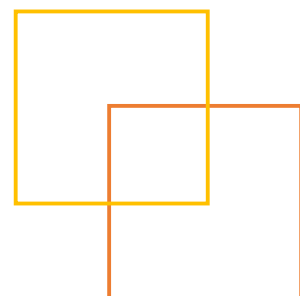


Figura 2.1. Esquema de la estructura desarrollada



3. Materiales y Métodos



3.1. Suero lácteo

Como sustrato para el desarrollo de este trabajo se empleó lactosuero con dos orígenes y composiciones claramente diferenciadas: a) suero lácteo ultrafiltrado procedente de la producción industrial de quesos de leche de vaca, oveja o mezclas de leches, facilitado por la empresa Quesería Entrepinares SAU (Valladolid, España) (suero 1) y b) suero lácteo crudo sin procesar obtenido de la producción artesanal de queso crudo de oveja, procedente de la Quesería Artesanal del Río Carrión S.L. (La Serna, Palencia, España) (suero 2) (Figura 3.1). En la Tabla 3.1., se recogen los resultados de la caracterización físico-química de los dos tipos de suero empleados.

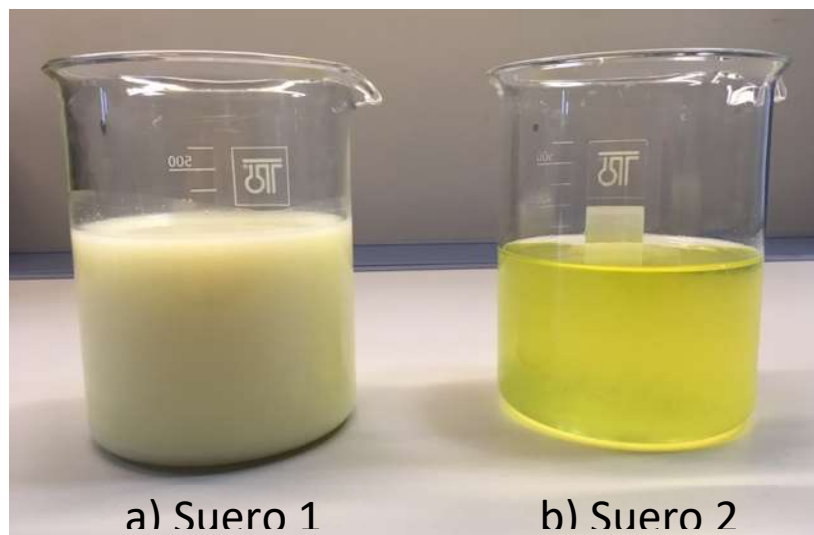


Figura 3.1. Muestras de suero lácteo utilizados durante el proceso experimental: a) Suero 1 (suero ultrafiltrado) y b) Suero 2 (suero nanofiltrado).

Las muestras de Suero 1 y Suero 2 fueron pasteurizadas mediante calentamiento a 80°C durante 30 minutos. El suero lácteo de leche de oveja fue nanofiltrado (suero 2 NF), en una unidad de filtración de placas LabStak® M20 (Alfa Laval, Lund, Suiza) para concentrar el producto (Figura 3.2.) y realizar las diferentes diluciones requeridas para obtener las distintas concentraciones de lactosa utilizadas durante la fase experimental.

Tabla 3.1. Características químicas de los sueros utilizados como sustrato

Parámetros (*)	Suero 1 (UF)	Suero 2	Suero 2 NF
Lactosa (g/L)	120 – 170	55	137
Proteína (g/L)	2,60	1,5	5,5
pH	5,8		
K (mg/L)	5730,51	1400	2500
Na (mg/L)	1629	456	751
Ca (mg/L)	927,45	200	200
Mg (mg/L)	309,09	<100	200
Cu (mg/L)	<0,1	<8	<1
Fe (mg/L)	<0,5	<5	<5
Mn (mg/L)	<0,8	<8	<8
Zn (mg/L)	<0,1	<1	<1
F (mg/L)	187	212,87	138,63
Cl ⁻ (mg/L)	5120	880,74	1181,34
Br ⁻ (mg/L)	258	31,35	33,03
NO ₂ ⁻ (mg/L)	1,02	<1	<1
NO ₃ ⁻ (mg/L)	9,4	<1	<1
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	418	65,59	221,96
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	2620	896,99	1906,95

(*) Valores expresados en base seca. UF = suero ultra filtrado; NF= suero nanofiltrado; el Suero 2, corresponde a suero crudo no tratado.



Figura 3.2. Unidad experimental de filtración de placas LabStak® M20 (Alfa Laval, Suiza)

Tal y como se ha indicado en el Capítulo 1, la concentración de lactosa requerida para el eficiente desarrollo de la fermentación ABE, evitando problemas de inhibición, entre 50

– 60 g/L. Por este motivo, el Suero 2 nanofiltrado se diluyó en agua destilada hasta obtener sustratos con la concentración inicial de lactosa deseada.

3.2. Microorganismos y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado levaduras de las especies *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol y la bacteria anaerobia *Clostridium beijerinckii* para la producción de butanol. Con el objeto de garantizar la esterilidad, todos los componentes de los medios de cultivo fueron autoclavados a 121 °C durante 15 – 20 minutos. Durante este trabajo se han utilizado estos procedimientos de cultivo de microorganismos:

- a) Para la producción de etanol, se ha trabajado con las siguientes cepas de *K. marxianus*: DSM 5418, DSM 5422, DSM 7239 y DSM 70799. Estas cepas fueron suministradas por Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Braunschweig, Alemania) en forma de liófilo. El cultivo se activó en medio líquido YPG (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 20 g/L) y se incubó a 35 °C, con una agitación de 120 rpm, durante 24 h. Los cultivos reactivados se criopreservaron en glicerol al 16% a -80 °C. De manera rutinaria, las cepas fueron inoculadas en placas de medio YPG sólido (20 g/L de agar) hasta el crecimiento de colonias y se conservaron a 4 °C.

El inóculo se preparó a partir de una colonia en un medio de cultivo estéril (50 g/L de lactosa, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona, 2 g/L de NH₄Cl, 1 g/L de KH₂PO₄ y 0,3 g/L de MgSO₄·7H₂O, pH 5 ajustado con HCl 2M) y se incubó en un agitador orbital termocontrolado (Infors HT Minitron; Infors AG, Bottmingen, Suiza) a 35 °C con una agitación constante de 120 rpm durante 7 h hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial y una densidad celular en torno a 10⁸ células/mL.

- b) Aunque las cepas de la especie *S. cerevisiae* no tienen capacidad natural para metabolizar lactosa, se ha trabajado con cuatro cepas seleccionadas en base a su aplicación a nivel industrial. Para ello, el suero lácteo fue sometido a un proceso previo de hidrólisis enzimática. Se seleccionaron las cepas: Ethanol Red®

(Leaf de Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, Francia), cepa utilizada de modo estandarizado en destilerías de etanol que ofrece una elevada tolerancia a altas temperaturas y a concentraciones de etanol superiores al 18% (v/v); la cepa híbrida osmotolerante CECT 13152 obtenida de la fusión protoplasmática de las cepas de *S. cerevisiae* NCY73 y una cepa no identificada de *S. cerevisiae* (suministrada por la empresa Tomsa Destil S.L., Madrid, España); la levadura aislada en destilerías CECT 1383, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Valencia, España) en forma de liófilo y la levadura de panadería fresca prensada de nombre comercial “Hércules” (Lesaffre Ibérica, Valladolid, España).

Las cepas Ethanol Red®, CECT 13152 y “Hércules” fueron directamente añadidas en forma sólida (0,1%, p/v) al fermentador sin realizar una propagación preliminar. En el caso de la cepa CECT 1383, una vez reactivada la cepa, fue cultivada en agar nutritivo (5 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de carne, 20 g/L de agar, pH 6,8) y almacenada a 4 °C. Las cepas fueron inoculadas en placas de medio YPG estéril hasta el crecimiento de colonias y se conservaron a 4°C.

El inóculo de CECT 1383 se preparó transfiriendo una colonia en 50 mL de medio YPG en condiciones estériles y se incubó a 32°C en un agitador orbital termocontrolado (Infors HT Minitron; Infors AG, Bottmingen, Suiza) con una agitación constante a 120 rpm durante 7 h hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial y una densidad celular de aproximadamente 10^8 células/mL.

- c) Para la producción de butanol, se utilizó la especie *Clostridium beijerinckii* CECT 508 suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Valencia, España) en forma de liófilo. El liófilo fue resuspendido en medio RCM (38 g/L) (Oxoid CM0149, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido). Las condiciones de anaerobiosis se garantizaron trabajando en una cabina de anaerobiosis Whitley DG250 Workstation (Don Withley Scientific, Reino Unido) con una atmósfera compuesta por 80% N₂, 10% H₂ y 10% CO₂ (Contse S.A., Madrid, España).

Posteriormente, se obtuvieron esporas de la cepa. Para ello, se inoculó una colonia bacteriana en 50 mL de medio RCM y se incubó durante 10 días a 37 °C.

Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 5 °C durante 21 minutos y se eliminó el sobrenadante. Seguidamente, el pellet bacteriano se resuspendió en 2 mL de agua estéril, se centrifugó de la misma manera y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió en 2 mL de tampón fosfato (PBS) (Sigma Aldrich, St. Louise, USA) y 100 g de lisozima (Sigma Aldrich, St. Louise, USA), se sonicó durante 5 minutos y se incubó a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron 7 lavados del pellet bacteriano mediante centrifugación con 2 mL de agua estéril. Por último, se cubren las esporas con agua estéril y se conservan a 4 °C.

El inóculo bacteriano para la fermentación se obtuvo a partir de 250 µL de esporas inoculadas en 100 mL de medio de cultivo RCM contenidos en botellas de cristal de 125 mL y se sometió a un choque térmico (80 °C durante 2 minutos seguido de 5 minutos en un baño de hielo). Las condiciones de anaerobiosis se generaron mediante burbujeo de N₂ (99,9 % de pureza; Contse S.A., España) en la zona de cabezas de las botellas durante 5 minutos. Finalmente, las botellas se incubaron durante 20 h a 35 °C hasta alcanzar una densidad bacteriana de aproximadamente 6·10⁸ células/mL.

En la Figura 3.3., se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía de fases (Microscopio DM 750, Leica Microsystems, Alemania) de las especies microbianas empleadas en este estudio.

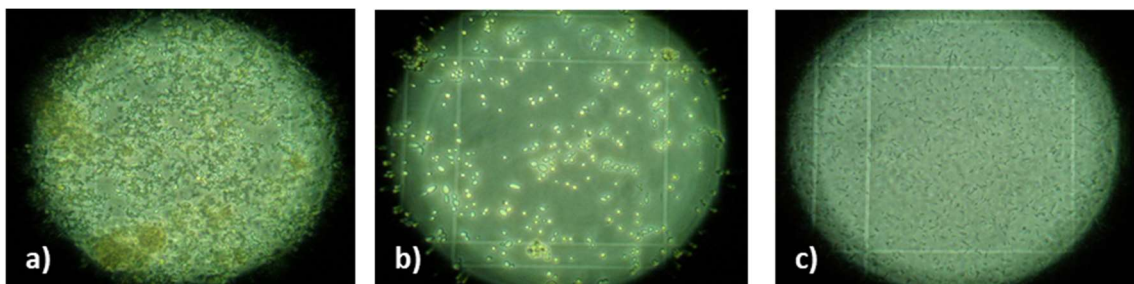


Figura 3.3. Imágenes de los microorganismos en microscopía de contraste de fases a 400X a) *Kluveromyces marxianus* DSMZ 7239; b) *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red®; c) *Clostridium beijerinckii* CECT 508, en sustrato de lactosuero.

3.3. Pretratamiento del lactosuero

Dada la incapacidad natural de la especie *S. cerevisiae* para metabolizar lactosa, el Suero 1 se sometió a una hidrólisis enzimática, utilizando β -galactosidasa comercial (HA-Lactase 2100, Chr. Hansen Holding A/S, Hoersholm, Dinamarca), con una actividad enzimática de 2.100 NLU/g.

Las condiciones de hidrólisis de la lactosa (Capítulo 5) se optimizaron mediante metodologías de superficie de respuesta (MSR) de tipo central compuesto (CC). Se trabajó con el Suero 1, con una concentración inicial de lactosa de 120 g/L. Los factores evaluados fueron: dosis de enzima, pH y tiempo de hidrólisis. Las variables de respuesta fueron la concentración final de glucosa (G_f) y la concentración final de galactosa (Gal_f), ambas expresadas en g/L, y el rendimiento de hidrólisis.

La optimización se realizó utilizando 50 mL de Suero 1 en matraces Erlenmeyer de 100 mL cubiertos con tapones de espuma. Las hidrólisis se realizaron en un agitador orbital termocontrolado (Infors HT Minitron; Infors AG, Suiza) con una agitación constante de 120 rpm durante 7 h, en las condiciones de operación (T, pH y tiempo de reacción) establecidas en el diseño experimental. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.4. Descripción de los sistemas de fermentación

Los sistemas de fermentación se mantuvieron en condiciones de esterilidad, mediante su autoclavado durante 15 minutos a 121 °C, incluyendo los fermentadores, los instrumentos de control y cualquier material en contacto con los microorganismos. Asimismo, cuando fue necesario, las condiciones de anaerobiosis se obtuvieron inyectando N_2 (pureza de 99,9%) en el interior de los fermentadores.

3.4.1. Fermentación discontinua o por lotes

3.4.1.1. Etanol

Para la producción de etanol (Capítulos 4 y 5), se utilizaron como fermentadores para los ensayos discontinuos, matraces Erlenmeyer de 100 mL de volumen, que contenían 50 mL de Suero 1 o hidrolizado de Suero 1. La concentración de lactosa requerida se

ajustó diluyendo con agua destilada. En todos los casos se añadió un 2,5% (v/v) de inóculo en el medio de fermentación (pH 6). Posteriormente, se incubó a 35 °C y una agitación constante a 150 rpm en un incubador orbital termocontrolado (Infors HT Minitron; Infors AG, Suiza) a diferentes tiempos, dependiendo de los experimentos realizados (Figura 3.4). Los experimentos fueron realizados por duplicado durante los ensayos preliminares y por triplicado durante la optimización de las condiciones de operación. En el caso de diseños experimentales mediante MSR, el punto central se repitió por quintuplicado, tal y como se detalla en el Anexo II.



Figura 3.4. Proceso de producción de etanol mediante fermentación de suero lácteo utilizando la levadura *Kluyveromyces marxianus*. a) Placa de cultivo puro de *klumveromyces marxianus*; b) Proceso de inoculación del microorganismo en el medio de fermentación; c) Fermentación de las muestras en el incubador con agitación orbital; d) Aspecto de la muestra tras finalizar la fermentación alcohólica.

Además, se evaluó el efecto de diversos factores que pueden afectar el rendimiento de la fermentación como la temperatura, el pH y la concentración inicial del sustrato (Capítulo 4). Asimismo, se determinó el efecto de la suplementación de lactosuero con soluciones nutritivas ricas en nitrógeno; sales de fosfato responsables del crecimiento celular (Parrando et al., 2009); sales de magnesio que promueven el crecimiento de la

masa celular (Dombek and Ingram, 1986) o tioglicolato de sodio, agente reductor que neutraliza los efectos tóxicos (MacFaddin, 1985). El objeto de esta experiencia fue minimizar o eliminar el uso de nutrientes, dado su elevado coste, y así, mejorar la viabilidad económica del proceso (Capítulo 5).

3.4.1.2. Butanol

Para la fermentación ABE, los experimentos preliminares se realizaron con control del pH automático, dosificando una solución de NaOH (1 M) empleando buretas automáticas (Crison, España) con el fin de mantener el pH del medio por encima de 5, y así evitar un posible “crash-ácido”. El control de temperatura y agitación se realizó sobre una placa calefactora con agitación integrada en el carrusel de reacciones de 6 x 250 mL (Radleys, Reino Unido). Las condiciones de anaerobiosis se garantizaron inyectando N₂ industrial (99,9% de pureza). Se inocularon 200 mL del medio de fermentación con 3 mL de inóculo (Figura 3.5). Sin embargo, a lo largo de la investigación se observó que era posible evitar un posible “crash ácido” adicionando CaCO₃ como medio tamponador.

En procesos discontinuos, se evaluó el efecto de la adición de nutrientes sobre la producción de butanol y el rendimiento de la fermentación ABE (Capítulo 6). El proceso de fermentación se llevó a cabo utilizando como reactores botellas de vidrio para plasma de rosca de 40 mm con tapones de caucho de 100 mL que contenían 50 mL de suero 2, previamente nanofiltrado y diluido con agua destilada hasta la concentración de lactosa necesaria. El pH del medio de fermentación se ajustó a 6.0 utilizando una solución alcalina y se inóculo con un 3% (v/v) de cultivo bacteriano. Posteriormente, se burbujeó N₂ de calidad industrial en la zona de cabezas durante 5 minutos. Los fermentadores se incubaron a 35 °C y 100 rpm durante 96 horas en un incubador orbital termocontrolado (Infors HT Minitron; Infors AG, Suiza) (Figura 3.5). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Como medio control del proceso de fermentación se utilizó un medio estándar adaptado a partir de medio P2 (Qureshi y Blaschek, 1999), consistente en 5 g/L de extracto de levadura; 1 g/L de KH₂PO₄; 2,1 g/L de NH₄Cl; 5 g/L de CaCO₃; 0,2 g/L de MgSO₄·7H₂O; 0,01 g/L de FeSO₄·7H₂O y 0,5 g/L de cisteína, además del sustrato, en este caso lactosa. Tanto el lactosuero empleado como todos los compuestos constituyentes del medio de cultivo fueron autoclavados durante 15 minutos a 121 °C, a excepción de las sales MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O y la cisteína que fueron esterilizadas

mediante filtración a través de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0,2 μm y 25 mm de diámetro (Auxilab S.L, España).

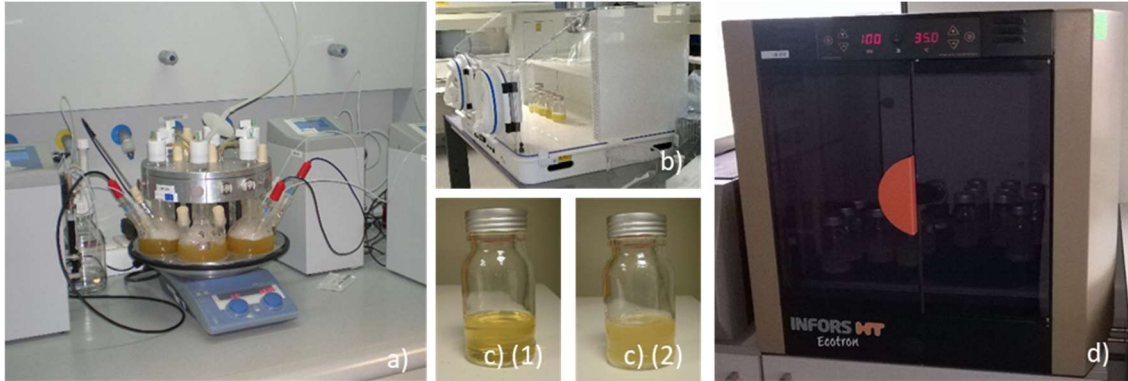


Figura 3.5.Proceso de producción de butanol a partir de suero lácteo por fermentación ABE con *C. beijerinckii* CECT 508. a) Carrusel de fermentación con control de pH automático; b) Cabina de anaerobiosis; c) Reactor de fermentación pre (1) y post (2) fermentación y d) Cabina de incubación con agitación controlada.

El escalado de las fermentaciones discontinuas para las fermentaciones ABE se realizó utilizando un fermentador de cristal de 2 L autoclavable Biostat B[®] (Sartorius, Alemania), con agitación superior y control automático de pH y temperatura, empleando una micro-DCU (Braun, Alemania) (Figura 3.6).



Figura 3.6. Biorreactor Biostat B[®] de 2 L (Sartorius, Alemania) con Micro-DCU (Braun, Alemania).

3.4.2. Fermentación continua. Inmovilización celular

Las fermentaciones en continuo se realizaron con microorganismos inmovilizados con el fin de aumentar la densidad celular. Las tecnologías de inmovilización empleadas para la obtención de etanol fueron el atrapamiento en geles de alginato (Capítulo 4) y adsorción sobre soportes inorgánicos (Capítulo 5).

3.4.2.1. Inmovilización por atrapamiento en geles de alginato cálcico

En el Capítulo 4, se trabajó en mejorar la inmovilización de la cepa *K. marxianus* DSM 5422 por atrapamiento. Para ello, se realizó un diseño experimental mediante Metodología de Superficie de Respuesta para optimizar los parámetros de formación de las esferas de alginato cálcico [concentración de alginato (% p/v), diámetro de la esfera (mm) y carga celular (% v/v)], para maximizar la producción de etanol en fermentaciones de alta densidad trabajando con concentraciones elevadas de lactosa ($L_0 = 170 - 190$ g/L). El modelo de inmovilización optimizado se validó experimentalmente mediante el reciclado del medio de fermentación durante seis ciclos trabajando con suero lácteo concentrado, con el fin de demostrar la viabilidad de combinar la fermentación de alta concentración con la inmovilización celular.

Los geles de alginato cálcico se realizaron disolviendo distintas concentraciones de alginato de sodio (de acuerdo al diseño experimental) en una disolución acuosa de 0.9% (p/v) de NaCl y esterilizándolo mediante autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Las diferentes suspensiones celulares (% p/v) de la cepa *K. marxianus* DSM 5422 establecidas en el diseño experimental fueron mezcladas en la solución de alginato. La mezcla se homogeneizó con ayuda de una bomba peristáltica (323 U/RL Watson Marlow, Watson Marlow Bredel Pumps, Cornwall, England). Se dejó gotear a través de agujas de distinto calibre para obtener esferas de diferentes diámetros, sobre una solución estéril de cloruro de calcio al 2% (p/v). Las esferas inmovilizadas se mantuvieron en la solución durante 1 h a 35 °C y una agitación de 150 rpm para el endurecimiento de la superficie del gel. Finalmente, las esferas de alginato inmovilizadas se lavaron con agua estéril para eliminar el exceso de iones Ca^{2+} y de células libres (Figura 3.7).

En cada uno de los fermentadores, se adicionaron 10 g de esferas de gel de alginato cálcico con células de *K. marxianus* DSM 5422 inmovilizadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL, incorporando como sustrato Suero 1 no suplementado con nutrientes adicionales. Las condiciones de fermentación T, pH inicial del caldo de fermentación y concentración inicial de lactosa en el suero lácteo fueron establecidas para cada uno de los microorganismos utilizados.

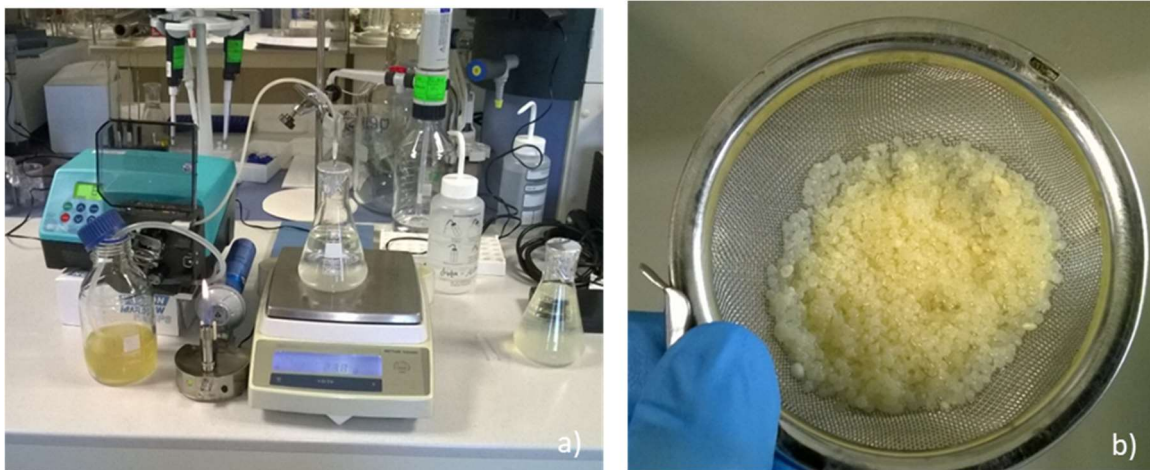


Figura 3.7. Imágenes de la inmovilización de células de *K. marxianus* DSM 5422 por atrapamiento en geles de alginato: a) Instalación utilizada para la fabricación de los geles de alginato; b) Detalle de las esferas de alginato.

3.4.2.2. Inmovilización por adsorción

Otra tecnología de inmovilización evaluada en este estudio ha sido la adsorción sobre soportes inorgánicos (Capítulo 5). Para ello, se seleccionaron cuatro soportes inorgánicos porosos, dada su amplia disponibilidad, su bajo coste económico, su fácil acondicionamiento y la posibilidad de esterilizar con vapor, lo que facilita su reutilización. Los materiales seleccionados fueron: plástico, vidrio sinterizado y silicona Tygon® en forma de anillos Raschig (longitud de 5 – 5,5 mm) y esferas de alúmina (5 mm de diámetro) (Figura 3.8).

Los cuatro soportes inorgánicos seleccionados fueron lavados con agua desionizada y esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se pesaron en torno a 10 g de cada uno de los materiales de soporte y se introdujeron en matraces Erlenmeyer de 250

mL. Posteriormente, se adicionaron 50 mL de Suero 1 no suplementado a una concentración inicial de lactosa de 130 g/L y 3,7% (v/v) de inóculo. La cepa de levadura y las condiciones de fermentación fueron determinadas a través de un diseño experimental de optimización. Cada 48 o 72 horas se reemplazó el suero agotado por suero fresco durante 7 ciclos de fermentación. Los caldos de fermentación agotados fueron analizados para determinar el desarrollo de la fermentación evaluando el rendimiento producto-sustrato, la tasa de consumo de la lactosa y la productividad.

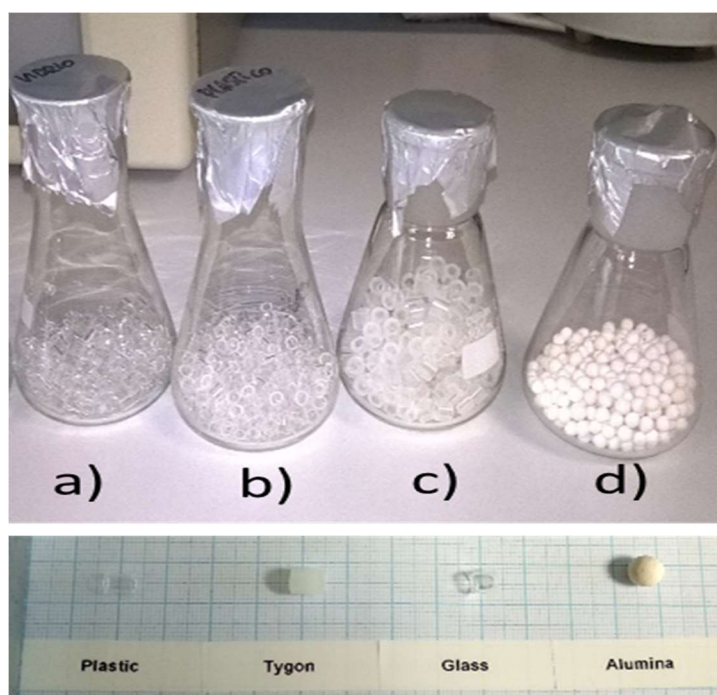


Figura 3.8. Soportes inertes utilizados en la inmovilización celular. De izquierda a derecha: a) Anillos Raschig de plástico; b) Anillos Raschig de Tygon; c) Anillos Raschig de vidrio y d) Esferas de alúmina.

Posteriormente, los soportes de inmovilización con mejor comportamiento durante la fermentación fueron sometidos a un test de estabilidad durante un periodo de tiempo prolongado. Para ello, los dos soportes en los que se obtuvieron mayores rendimientos de fermentación fueron seleccionados y sometidos al reciclado del caldo de fermentación durante 14 ciclos (1.000 horas). Para comparar el efecto de la concentración de lactosa sobre el biofilm y la fermentación, se trabajó con Suero 1 a dos

diluciones de lactosa (130 g/L y 170 g/L). Toda la experimentación fue realizada por triplicado.

3.5. Recuperación de solventes

Para mejorar la productividad de la fermentación ABE y garantizar una concentración de solventes elevada, se han evaluado el arrastre de vapor o gas stripping como tecnología de recuperación *in situ* de producto, con el fin de conseguir un mejor aprovechamiento de los sustratos y minimizar la inhibición microbiana por producto. A la vez se reducen los costes de recuperación, se mejora el rendimiento y la productividad global del proceso fermentativo (de Vrije *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2014).

En este trabajo se evaluó la recuperación de solventes ABE por arrastre de gas. En la experimentación se trabajó con dos tipos de soluciones:

- a) Una solución acuosa sintética con 5 g/L de acetona, 10 g/L de butanol y 1,67 g/L de etanol con una relación A:B:E (3:6:1), de acuerdo a modelos ideales de producción de solventes en la fermentación ABE.
- b) Caldos de fermentación que contenían bacterias agotadas. Estos caldos se obtuvieron fermentando el suero de queso de oveja (Suero 2), con una concentración inicial de 40 g/L de lactosa suplementado con nutrientes, e inoculado con *C. beijerinckii* CECT 508, de acuerdo a la optimización de la suplementación de nutrientes obtenida en el Capítulo 6.

3.5.1. Optimización del gas-stripping

El sistema de gas-stripping utilizado en el Capítulo 7 (Figura 3.9), consistió en un condensador Dimroth de doble serpentín con una longitud de 400 mm y una superficie de 1.135 cm². Los condensados generados se recogen en un evaporador refrigerado de 1 L (Pobel, España). El sistema se conecta al fermentador mediante un conjunto de tuberías y bombas. El fermentador consistía en una botella de vidrio de 1 L que contenía un agitador magnético. La botella se cerró con una tapa roscada que tenía en la parte superior una placa metálica de acero inoxidable en la que se realizaron cinco entradas/salidas: una entrada para la sonda de temperatura; una segunda entrada para la entrada del gas de arrastre mediante un difusor de piedra metálica; una salida para

los vapores de condensación con o sin gases de arrastre; y dos entradas para la adición de nutrientes y/o antiespumantes durante la fermentación.

Se utilizó una placa de calentamiento y agitación con sonda de temperatura (Yellow MAG HS 10, IKA, Staufen, Alemania) para controlar la temperatura de la solución de alimentación. La temperatura de refrigeración del sistema de condensación se mantuvo mediante un termostato LAUDA Integral T 2200 utilizando una mezcla de monoetilenglicol/agua (LAUDA, Lauda-Königshofer, Alemania). El gas de arrastre fue recirculado con una bomba de vacío Modelo DOA-P504-BN (GAST Manufacturing, Michigan, EE. UU.). El flujo de gas se controló mediante un rotámetro ajustable manualmente (Key Instruments, Brooks Instruments, Hatfield, PA, EE. UU.).

El sistema de recuperación se iniciaba con el purgado de todo el circuito de gas durante 2 minutos con N₂ industrial para reemplazar el aire atmosférico. Posteriormente, se cerraba el circuito, se fijaba el flujo de gas deseado con el rotámetro y se recirculaba el gas de arrastre continuamente mediante la bomba. Después de 15 minutos de estabilización, se iniciaba el experimento.

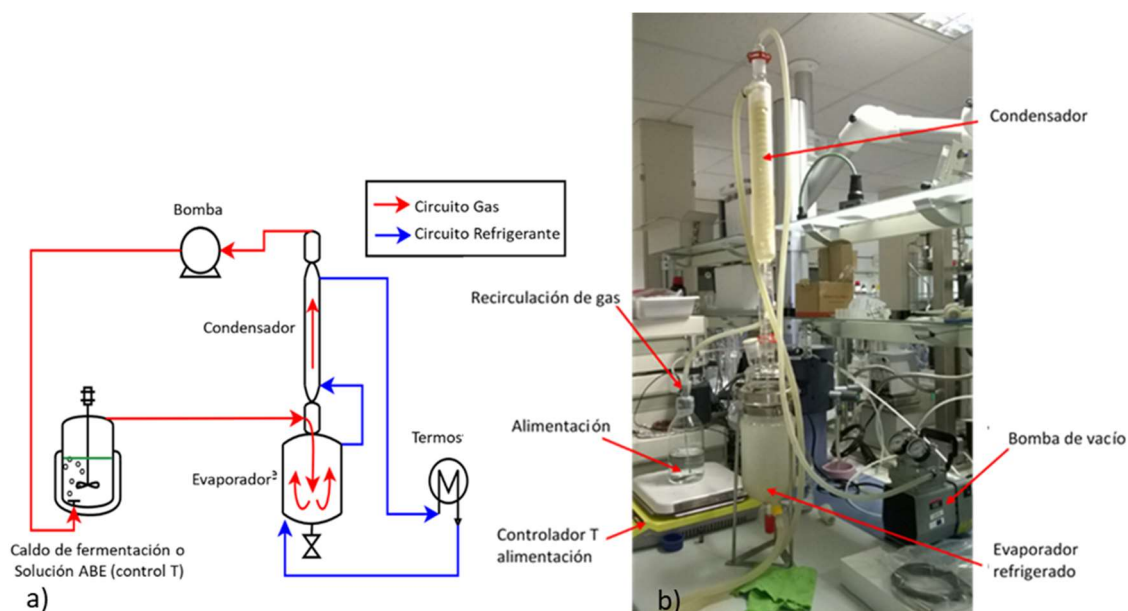


Figura 3.9. Configuración del sistema de extracción de gas utilizado en los experimentos: a) Diagrama del sistema; b) Fotografía del montaje de gas stripping.

Las condiciones de proceso se optimizaron mediante MSR con un diseño central compuesto de tres variables (temperatura de alimentación, flujo de gas y temperatura de refrigeración) para maximizar la recuperación de butanol y la selectividad de butanol, en el medio acuoso sintético. Cada experimento de la MSR tuvo una duración de 18 horas. Las condiciones de trabajo optimizadas con el medio acuoso sintético, fueron validadas experimentalmente con el caldo de fermentación. a varios tiempos de operación (4 – 18 h).

3.5.2. Gas-stripping en dos etapas

Para aumentar la concentración final de butanol, la fase acuosa recogida en el condensado de la primera etapa de gas-stripping, con una concentración de butanol $\sim 8\%$ (p/p) se sometió a una segunda etapa de gas-stripping, de acuerdo con las condiciones previamente optimizadas en la sección 3.5.1. La fase orgánica, con una concentración de butanol de $\sim 60\%$ (p/p), recogida de la primera etapa de stripping, se almacenó junto a la corriente orgánica recogida en la segunda etapa de stripping. Todas las corrientes recogidas fueron caracterizadas.

3.5.3. Fermentación semicontinua con recuperación de solventes *in situ* mediante gas-stripping

Las condiciones óptimas obtenidas con disoluciones acuosas sintéticas, según las ecuaciones de la MSR, fueron validadas experimentalmente con caldos de fermentación a varios tiempos de fermentación entre 4 y 18 horas. Para ello, se partió de un caldo de fermentación de 500 mL obtenido a partir del Suero 1, utilizando *C. beijerinckii* CECT 508 como microorganismo. La composición del caldo de fermentación fue de 3,02 g/L de acetona, 12,04 g/L de butanol, 0,23 g/L de etanol, 0,99 g/L de ácido acético y 1,15 g/L de ácido butírico, con una densidad bacteriana de $7 \cdot 10^8$ células/mL. Este caldo se acopló a una etapa de recuperación por gas-stripping, tal y como se indica en la Sección 3.5.1.

Asimismo, se evaluó el efecto del gas-stripping sobre las células de *C. beijerinckii*. Para ello, después de un primer ciclo de gas-stripping en las condiciones optimizadas según el modelo MSR, se añadió agua destilada y lactosa al caldo de fermentación para conseguir un volumen final de 500 mL con una concentración final de lactosa de ~ 40 g/L.

Se adicionaron 0,5 g de extracto de levadura con el objeto de evitar déficits de nitrógeno que perjudicasen el metabolismo microbiano. Cuando las bacterias alcanzaron nuevamente su fase estacionaria y produjeron ~ 10 g/L de butanol, se inició un segundo ciclo de gas-stripping, utilizando las mismas condiciones empleadas en el primer ciclo.

3.6. Métodos de Análisis

El seguimiento de los procesos de fermentación y recuperación de productos se realizó recogiendo muestras periódicas durante las etapas de pretratamiento y/o fermentación con el fin de evaluar la evolución temporal de los procesos. Las muestras recogidas de modo aséptico se centrifugaron a 12.000 x g en una microcentrífuga (MiniSpin, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 3 minutos.

3.6.1. Determinación de metabolitos principales y secundarios

La determinación de lactosa, glucosa, galactosa, ácido láctico y etanol se realizó utilizando un equipo HPLC Agilent 1200 con un detector de índice de refracción G1362A (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) y la columna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) (Biorad, Hercules, California, USA) con una fase móvil acuosa de 5 mM de H₂SO₄, una velocidad de flujo de 0,6 mL/min y una temperatura de columna de 60 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL.

La determinación de acetona, etanol, butanol, ácido acético y ácido butírico se realizó mediante cromatografía de gases utilizando el equipo Agilent 7890 A GC con detector de ionización de llama (FID), utilizando una columna HP Innowax 30 m x 0,530 mm, 1,00 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). La llama del FID se mantuvo con una mezcla de 30 mL/min de H₂ y 400 mL/min de aire, usando N₂ como gas auxiliar. Se inyectó un volumen de la muestra acuosa de 1 µL en modo split (ratio 25:1) y la temperatura del inyector fue de 250 °C. La temperatura del horno se mantuvo en 40 °C durante 2 min, luego se elevó a 45 °C con una rampa de calentamiento de 5 °C/min, aumentando a una velocidad de 20 °C/min hasta 225 °C y se mantuvo durante 8 min a esa temperatura. La temperatura del detector se ajustó a 250 °C. El gas portador fue helio a 2 mL/min.

En la etapa de recuperación de solventes mediante gas-stripping, se tomaron muestras acuosas del depósito de alimentación antes y después de la etapa de gas-stripping y del condensado obtenido del proceso. Todos los volúmenes fueron medidos utilizando una probeta graduada. Las soluciones acuosas y el condensado fueron directamente analizados para determinar la concentración de solventes ABE por cromatografía de gases, tal y como se ha indicado en el párrafo anterior. El caldo de fermentación fue inicialmente centrifugado a 12.000 rpm durante 3 minutos en una microcentrífuga (MiniSpin, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de nylon de 0,20 μm antes de determinar la concentración de solventes ABE por cromatografía de gases.

3.6.2. Determinación del crecimiento celular

En general, la densidad celular se determinó utilizando una cámara de recuento Bürker (Paul Marienfeld GmbH Co. KG, Lauda-Königshofen, Alemania). En el caso de las cepas de la levadura *K. marxianus*, la concentración de células libres se midió usando métodos de densidad óptica y peso seco. Para cada cepa se determinó una correlación entre el peso de la célula seca (N) y la densidad óptica (DO). El peso seco se determinó centrifugando las muestras a 10.000 rpm en una microcentrífuga (Minispin, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 3 minutos. Las células se lavaron con agua desionizada dos veces, se secaron durante la noche a 90 – 100 °C y se pesaron. La densidad óptica se midió a una longitud de onda de 600 nm utilizando un espectrofotómetro VARIAN Cary 50 Conc UV-visible (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). La correlación obtenida para la cepa *K. marxianus* DSM 5422 fue:

$$N \text{ (g/L)} = (0,2754 \times \text{DO} + 1,1486) \quad R^2 = 0,996$$

3.6.3. Determinación de aniones y cationes

Los aniones (F^- , Cl^- , Br^- , NO_2^- , NO_3^{2-} , SO_4^{2-} y PO_4^{3-}) se determinaron mediante cromatografía iónica, con el equipo Dionex Model ICS 2000 (ThermoFisher, Sunnyvale, CA, USA) dotado con un detector conductimétrico Dionex DS6. Para el procesado de los datos se utilizó el software Dionex Chromeleon versión 6.7. La separación fue realizada utilizando la columna de intercambio aniónico Dionex IonPac AS19 (250 x 4 mm de d.i.) combinada con la precolumna Dionex IonPAC AG19 (50 x 4 mm de d.i.) y un supresor de

conductividad Dionex ASRS Ultra II 4 mm ubicado entre la columna analítica y la celda de conductividad. El eluyente utilizado fue una disolución de hidróxido potásico que se generó en línea, utilizando el cartucho Dionex EG50 KOH y permitió trabajar en gradiente. Un volumen de muestra de 75 µL fue inyectado con el muestrador automático Dionex AS40. La columna se mantuvo a 30 °C con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La concentración del eluyente se mantuvo en 10 mmol/L desde 0 a 20 minutos, se incrementó a 45 mmol/L durante los siguientes 5 minutos, después se bajó a 10 mmol/L y se mantuvo a esa concentración durante 5 minutos. Después la columna se equilibró a 10 mmol/L durante 15 min. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro de nylon de 0,45 µm antes de analizar. El rango de calibración para los aniones fue de 10-500 mg/L.

La concentración de cationes (Na, K, Ca y Zn) fue determinada en un espectrofotómetro Varian 240FS AA (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) mediante absorción atómica de llama (aire-acetileno). Los cationes Na y K fueron determinados midiendo la emisión atómica de radiación, mientras que los cationes Ca, Mg y Zn se determinaron midiendo la absorción atómica de radiación. Los cationes Fe, Cu y Mn fueron determinados mediante absorción atómica en un horno de grafito con corrección de fondo por efecto Zeeman (en atmósfera inerte de argón) utilizando el espectrofotómetro Varian 240Z AA. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro de nylon de 0,45 µm antes de analizar. El rango de calibración para todos los metales fue de 1 – 5 mg/L.

3.6.4. Determinación de proteína

El contenido de proteína se calculó como el resultado de multiplicar el contenido en nitrógeno por un factor de transformación del nitrógeno en proteína. El nitrógeno total se determinó por el método Kjeldahl (MAPA, 1994). En este método, la muestra se digiere con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador, transformándose en sulfato de amonio. El equipo de digestión utilizado fue un Tecator Digester Auto20 (Foss, Barcelona, España). Posteriormente, se alcaliniza el medio con una solución de hidróxido sódico. El amoniaco liberado es arrastrado por destilación y recogido sobre ácido bórico utilizando la unidad Tecator Scrubber y el destilador Kjeltect™ 2200 (Foss, Barcelona, España). Finalmente, los aniones del borato formado se titulan con HCl 0,1 N en un

valorador automático 927 Titrino de Metrohm (Herisau, Suiza) para determinar el nitrógeno inicial y por tanto el porcentaje de proteínas.

3.6.5. Caracterización morfológica

Para evaluar los cambios morfológicos en los soportes de inmovilización después de varios ciclos de fermentación se utilizó microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM, las siglas en inglés de Scanning Electron Microscope), empleando el equipo Jeol JSM 6610LV (Tokio, Japón). Para ello, las muestras biológicas requieren un proceso de desecado y un recubrimiento con una película de un metal conductor. Con este propósito, al inicio de la experimentación y al finalizar los siete ciclos de fermentación continuos, se tomó una pieza de cada uno de los materiales inertes de inmovilización y unas esferas de alginato de calcio inoculadas con *K. marxianus* (Anexos de los Capítulos 4 y 5; Figuras A.4.1 y A.5.1). Los soportes inorgánicos se lavaron con agua desionizada y se secaron durante 24 horas a 60 °C de acuerdo a Genisheva *et al.* (2011). En el caso de las esferas de alginato, las muestras fueron estabilizadas químicamente mediante inmersión en una solución salina tamponada con fosfatos al 2,5% de glutaraldehído, pH 7,4 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a 4 °C durante 4 horas. Posteriormente, se sometieron a una deshidratación química, sumergiéndolas en soluciones de etanol acuoso a concentraciones crecientes (30%, 50%, 70%, 90%, 3 x 96% y 3 x 100%) durante 30 minutos en cada solución. Las esferas de alginato se secaron en un desecador de punto crítico CPD 030 (BAL-TEC, Principado de Liechtenstein). Las muestras se fijaron sobre soportes cilíndricos metálicos de aluminio y se recubrieron con un revestimiento de oro para crear una superficie conductora utilizando el pulverizador SCD 004 (Balzers UL, Principado de Liechtenstein).

En los Anexos A.4.1 y A.5.1, se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) con la distribución y colonización de *K. marxianus* DSM 5422 inmovilizada por adsorción sobre diversos soportes inertes y atrapados en esferas de gel de alginato.



Figura 3.10. Microscopio Electrónico de Barrido Jeol LV 6100okio, Japón)

3.7. Parámetros de seguimiento y control de las fermentaciones

Los parámetros de seguimiento evaluados fueron:

- a) La tasa de lactosa consumida (ΔL) definida como la lactosa consumida respecto a la lactosa inicial, de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta L = \left(\frac{L_i - L_f}{L_i} \right) \quad (\text{ec. 3.1})$$

siendo L_i y L_f , las concentraciones inicial y final de lactosa, expresadas en g/L.

- b) El rendimiento producto-sustrato ($Y_{P/L}$, g/g), que se define como la relación entre la concentración final de producto (etanol o butanol) y el sustrato consumido (diferencia entre el contenido inicial y final de azúcares, en este caso lactosa, de acuerdo a la ecuación:

$$Y_{\frac{P}{L}} = \frac{P_f}{L_i - L_f} \quad (\text{ec. 3.2})$$

siendo P_f la concentración final del producto, expresada en g/L.

- c) El rendimiento de producto por porcentaje de sustrato consumido (π_p , g/L), definido como la concentración de producto (g/L) multiplicada por la tasa de lactosa consumida (ΔL), de acuerdo a la ecuación:

$$\pi_p = P_f \times \Delta L \quad (\text{ec. 3.3})$$

- d) La productividad [W_p , g/L·h], se expresó como la relación de los gramos de producto (etanol o butanol) generados por litro de suero en relación al tiempo de fermentación (h).

$$W_p = \frac{P_f}{t} \quad (\text{ec. 3.4})$$

- e) Adicionalmente, se determinó el rendimiento porcentual de fermentación, η_P (%) como la relación entre el rendimiento real y el teórico para cada uno de los dos procesos de fermentación evaluados.

$$\eta_E = \frac{Y_E}{0,538} \times 100 \quad (\text{ec. 3.5})$$

$$\eta_B = \frac{Y_B}{0,41} \times 100 \quad (\text{ec. 3.6}),$$

donde η_E es el rendimiento porcentual para el etanol y η_B es el rendimiento porcentual para el butanol.

- f) La eficiencia de la hidrólisis enzimática de lactosa a glucosa y galactosa ($\eta_{(G+Gal)/L}$, %), se calcula de acuerdo a la ecuación:

$$\eta_{(G+Gal)/L} = \frac{G_f + Gal_f}{L_i} \times 100 \quad (\text{ec. 3.7}),$$

siendo L_i , la concentración inicial de lactosa, G_f la concentración final de glucosa libre y Gal_f la concentración final de galactosa libre, expresadas en g/L.

- g) Finalmente, para los procesos de recuperación de solventes por gas-stripping, los parámetros de seguimiento son la selectividad o factor de separación (α_i) y el rendimiento del factor de recuperación de butanol (η_i), calculados a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\alpha_{i/j} = \frac{x_i y_j}{x_j y_i} \quad (\text{ec. 3.8})$$

$$\eta_i = \frac{m_{iC}}{m_{iF}} \times 100 \quad (\text{ec. 3.9})$$

donde α_i es la selectividad para el metabolito i (en el caso del butanol; α_B), x_i es la relación de masa del metabolito i en la solución de alimentación, y_i es la relación de masa del metabolito i en el condensado, η_i es el porcentaje de eficiencia de recuperación para metabolito i (en el caso del butanol; η_B), m_{iC} es la masa del metabolito i en el condensado (expresado en g) y m_{iF} es la masa del metabolito i en la solución de alimentación.

3.8. Análisis estadístico

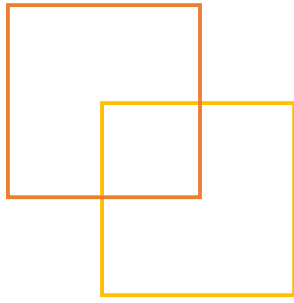
La comparación entre muestras se realizó con pruebas ANOVA de una vía, la prueba HSD de Tukey o la prueba U de Mann-Whitney, utilizando el software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EE. UU.), considerando diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Para los

procesos de optimización, el diseño experimental utilizando Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) y los diseños de Plackett-Burman, fueron generados utilizando el software Minitab 16 (Minitab Inc., State Collage, Pa, USA).

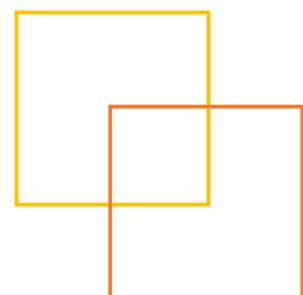
En el Anexo II, se detalla el diseño experimental por Metodología de Superficie de Respuesta y los diseños de Plackett-Burman.

Referencias

- Genisheva, Z., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. (2011). Evaluating the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 979-985.
- MacFaddin, J.F. (1985). *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenace of Medical Bacteria*, Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore.
- MAPA, (1994). *Métodos Oficiales de Análisis*. Dirección General de Política Alimentaria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación., Madrid.
- Napoli F. (2009). Development of an integrated process for butanol production. Dottorato in Scienze Biotecnologiche- XXII ciclo Indirizzo Biotechnologie Industriali. University of Napoli Federico II.
- Parrondo, J., García, L. A., & Díaz, M. (2009). Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26(3), 445-456.
- Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (1999). Production of acetone butanol ethanol (ABE) by a hyper-producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and recovery by pervaporation. *Biotechnology Progress*, 15(4), 594-602.
- de Vrije, T., Budde, M., van der Wal, H., Claassen, P. A., & López-Contreras, A. M. (2013). "In situ" removal of isopropanol, butanol and ethanol from fermentation broth by gas stripping. *Bioresource Technology*, 137, 153-159.
- Xue, C., Du, G. Q., Sun, J. X., Chen, L. J., Gao, S. S., Yu, M. L., ... & Bai, F. W. (2014). Characterization of gas stripping and its integration with acetone–butanol–ethanol fermentation for high-efficient butanol production and recovery. *Biochemical engineering Journal*, 83, 55-61.



4. Very high gravity fermentation of non-supplemented cheese whey permeate (CWP) by immobilized *Kluyveromyces marxianus*



Very high gravity fermentation of non-supplemented cheese whey permeate (CWP) by immobilized *Kluyveromyces marxianus*

Abstract

*The aim of this research was to improve the ethanol production process with very high gravity fermentation combined with entrapment cell immobilization employing non-supplemented high lactose-load cheese whey permeate (CWP) as substrate. The effect of temperature and initial pH was tested on free and immobilized cells and the maximal allowable doses of substrate without inhibition effects were assessed. An experimental design by Response Surface Methodology (RSM) was applied to figure out the influence of gel formation parameters (alginate concentration, cell loading and bead size) on the entrapment immobilization process. Bead stability and continuous yield production was evaluated by repeated-batch recycling. The experimental data have demonstrated that non-supplemented high lactose-load CWP is an excellent low cost substrate. Lactose dosages between 170-190 g/L provided free-cell yield efficiencies reaching 95.5% with productivities higher than 1.80 g/L·h at 30 °C. The optimal immobilized model was validated recycling the gel beads for 288 h, with a mean ethanol production of 83.2 g/L, a productivity of 1.6 g/L·h and a yield efficiency of 83.2%. Therefore, results demonstrate the feasibility of combining very high fermentation processes with *Kluyveromyces marxianus* immobilization at lab scale, which encourages its validation in continuous pilot plant configurations.*

Keywords: Very high gravity fermentation (VHGF), ethanol, *Kluyveromyces marxianus*, entrapment immobilization.

Díez-Antolínez R, Hijosa-Valsero M, Paniagua-García AI, 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.

The edition of the manuscript was in accordance with the scientific journal requirements.

4.1. Introduction

Bioethanol is a renewable and environmentally friendly alternative to petrol. High ethanol productivity from low cost feedstock, in addition to lower investment and operation costs and reduced energy demand, are important aspects in these bioprocesses (Gabardo *et al.*, 2014). To reduce costs and improve the economics of ethanol production, several techniques have been developed including very high gravity (VHG) fermentation or continuous fermentation configurations (Zhang *et al.*, 2015; Gabardo *et al.*, 2014; Puligundla *et al.*, 2011).

VHG fermentation is associated with important water and energy savings, although the high concentrations of substrates and end products severely inhibit the performance of yeasts, limiting the production of ethanol. Therefore, the maximum allowable dose of substrate is a relevant parameter to avoid inhibitions (Zhang *et al.*, 2015). On the other hand, cell immobilization techniques overcome most of the bioprocess restrictions, offer long-term stability of cells, increased molecular selectivity, higher resistance against inhibition, better cell protection against environmental factors, more active biocatalyst per unit of reactor volume, low loss of activity, reduced lag phase and reaction time (Eş *et al.*, 2015). However, cell immobilization techniques also present disadvantages, such as the decrease of substrate accessibility, alterations in biocatalyst conformation and activity, biocatalyst stress problems and costly specific reactor systems (Eş *et al.*, 2015).

Cell entrapment is a usual and effective immobilization technique and alginate hydrogel beads are commonly used due to their biocompatibility, low cost, high porosity and simplicity of preparation. However, there are challenges to overcome, such as uncontrollable gel degradation by the loss of covalent ions, mass transfer limitations, low mechanical strength or large pore size (Duarte *et al.*, 2013). Determinant factors are: alginate concentration, cell loading and bead diameter (Duarte *et al.*, 2013; Idris and Suzana, 2006).

The utilization of agro-industrial wastes is of great relevance to reduce operating cost. Interesting substrates for alcoholic fermentation are cheese whey and cheese whey permeate (CWP) (Sansone *et al.*, 2010; Pisano *et al.*, 2015), even without nutrient supplementation (Gabardo *et al.*, 2014). The use of high lactose-load CWPs is not

common due to inhibitory problems, long fermentation times and low substrate consumption. Lactose contents about 100 g/L were reported as optimal to reduce substrate imbalance or inhibitions (Gabardo *et al.*, 2014; Dragone *et al.*, 2011; Ozmihci and Kargi, 2007, 2009). However, dairy industry concentrates whey up to values of 170 - 180 g/L to reduce transport costs. Therefore, developing VHG fermentations employing high load CWPs would be an important improvement. To achieve this, it is necessary to optimize non-inhibitory dosages and operating conditions.

Few microorganisms ferment lactose directly to ethanol with the exception of the genus *Kluyveromyces*. The species *K. marxianus* presents interesting attributes for industrial uses, such as thermotolerance, high growth rate, capacity to metabolize different substrates and its GRAS status. However, not many researches evaluating ethanol production using *Kluyveromyces* sp. from substrates rich in lactose in immobilized systems have been reported (Gabardo *et al.*, 2014, 2012; Ozmihci and Kargi, 2009; Brady *et al.*, 1997).

The aim of this work was to improve the ethanol production process employing VHG fermentation of non-supplemented high loaded CWPs combined with cell immobilization by entrapment in alginate. In the first stage, the effect of the fermentation factors temperature (T) and initial pH (pH₀) was tested. Secondly, the maximal allowable doses of substrate without inhibition effects were assessed. Thirdly, the entrapment immobilization process was improved by optimizing three gel formation parameters [alginate concentration (Alg, % w/v), cell loading (Cell, % v/v) and bead size (D_p, mm)] by response surface methodology (RSM). Finally, bead stability and continuous yield production was evaluated by repeated-batch recycling.

4.2. Material and methods

4.2.1. Microorganisms and culture conditions

A lyophilized *K. marxianus* DSM 5422 strain provided by Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany) was used. The reactivated culture was maintained on nutrient agar and stored at 4 °C. A loop-full of a slant culture was transferred to sterilized growth medium [50 g/L lactose, 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), 5 g/L yeast extract, 2 g/l NH₄Cl

(Fluka-Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), 10 g/L peptone (Fluka, Buchs, Switzerland) and 1 g/L KH_2PO_4 (Panreac, Castellar del Vallès, Spain)]. The medium was incubated in an orbital shaker Infors HT Minitron (Bottmingen, Switzerland) at 35 °C with a constant shaking at 120 rpm during 7 h in order to obtain exponential-phase cells.

4.2.2. Cell immobilization

Sodium alginate (Sigma Aldrich) was dissolved at different concentrations in 0.9% w/v NaCl (Fluka-Sigma Aldrich) and sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min. The different tested cell suspensions (% v/v) were mixed to the sterile alginate solution. The mixture was immediately dripped through different gauge needles to get beads of different diameters using a peristaltic pump into a flask containing a 2% (w/v) CaCl_2 solution (Sigma Aldrich). Immobilized beads were left to harden for 1 h at 35 °C with an agitation of 150 rpm. These beads were rinsed twice with sterile distilled water to remove residual calcium ions and free cells.

4.2.3. Cheese whey and fermentation media

Cheese whey permeates obtained from a mixture of cow and sheep milk after a concentration process by ultrafiltration provided by Quesería Entrepinares SAU (Valladolid, Spain) was the substrate. The CWP was pasteurized by heating at 80 °C for 30 min to avoid the effects of endogenous microorganisms. Lactose and protein content were respectively 170 g/L and 34 g/L. The CWP presented an initial pH of 5.8.

4.2.4. Analytical methods

Lactose and ethanol were measured using Agilent LC1200 HPLC equipment with a refractive index detector and an Aminex HPX-87-H column (Bio-Rad, Hercules, California, USA) with a 5 mM H_2SO_4 mobile phase.

At the end of each run, fermentation kinetic parameters were determined: lactose consumption rate (ΔL , %) (defined as the percentage of lactose consumed), ethanol conversion yield ($Y_{E/L}$, g/g) (defined as the ratio between ethanol produced and lactose consumed), ethanol production efficiency (η , %) (defined as the ratio between the actual yield and the theoretical yield expressed as a percentage (considering a theoretical value

of 0.538 g/g)) and ethanol production rate (W_E , g/(L·h)) (defined as the ratio between ethanol concentration (g/L) and fermentation time (h)).

4.2.5. Statistical analysis

The RSM for experimental design was generated and interpreted with the software Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA). Comparisons among treatments were assessed with Mann-Whitney U tests with the software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA); differences were considered significant when $p < 0.05$.

4.2.6. Experimental design

This study had a twofold aim. On one hand, to evaluate the effect of key factors such as initial lactose concentration (L_0), T , initial pH (pH_0) and fermentation time on the efficiency of bioethanol production from CWP during VHG fermentation, employing free and immobilized cells. On the other hand, to improve immobilized fermentation yield optimizing alginate bead formation parameters to maximize ethanol production. The optimized model was validated by repeated-batch fermentations, prolonged for 288 h (6 cycles of 48 h). The whole experimentation was carried out in 100 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of CWP at different lactose concentrations without any nutrient supplementation. Flasks were plugged with foam stoppers to guarantee aeration and maintained with a constant shaking at 150 rpm in an orbital shaker.

4.3. Results and discussion

4.3.1. Effect of temperature and initial pH

The effect of T and pH_0 on free and immobilized cell fermentation is shown in Table 4.1. Significant differences ($p < 0.05$) were observed for temperature and type of fermentation (free or immobilized cells) but not for pH_0 . The highest ethanol production ($\eta > 85\%$; $W_E = 1.23$ g/L·h) was obtained employing free cells at 30 °C. With immobilized cells, the performance was lower ($\eta = 75\%$; $W_E = 1.08$ g/L·h), working also at 30 °C. Lactose consumption was total in all cases. The worst performance was obtained by immobilized cells due to diffusion problems, because entrapped cells have a poorer effective contact with essential nutrients in the broth (Nikolic *et al.*, 2010). These data are in accordance with previous works, which fixed 30 °C as optimal fermentation

temperature for *K. marxianus* strains employing CWP as a substrate in ranges between 30 and 45 °C (Gabardo *et al.*, 2012), with a productivity of 0.96 g/(L·h) and an efficiency of 83.3%, respectively.

Tabla 4.1. Fermentation results for T and pH₀ evaluation (L₀ = 120 g/L, time = 44 h).

T (°C)	pH	Type	E _f (g/L)	ΔL (%)	Y _{E/L} (g/g)	H (%)	W _E (g/L·h)
30.0	5.5	Free	54.19±0.33	100.00±0.00	0.460±0.003	85.50±0.52	1.35±0.008
37.0	5.5	Free	48.65±2.04	99.10±1.55	0.413±0.002	76.76±3.21	1.22±0.051
30.0	6.3	Free	53.86±0.84	100.00±0.00	0.461±0.000	85.73±0.02	1.34±0.021
37.0	6.3	Free	50.79±0.62	100.00±0.00	0.432±0.005	80.21±0.98	1.27±0.015
30.0	5.5	Immobilized	48.11±0.34	100.00±0.00	0.408±0.003	75.90±0.54	1.09±0.008
37.0	5.5	Immobilized	45.33±0.92	100.00±0.00	0.385±0.008	71.51±1.45	1.03±0.021
30.0	6.3	Immobilized	47.12±0.72	99.27±1.26	0.403±0.001	74.95±0.25	1.07±0.016
37.0	6.3	Immobilized	44.68±0.41	100.00±0.00	0.380±0.003	70.55±0.64	1.01±0.009

4.3.2. Effect of substrate concentration

The hypertonic environment caused by excessive levels of substrate could weaken the viability and fermentation ability of yeasts (Zhang *et al.*, 2015). Significant differences were observed on all kinetic fermentation parameters at the tested lactose dosages. As shown in Figure 4.1, it could be inferred that 170 g/L is the optimal substrate concentration, because at this dosage, yield efficiency (η) reached 95.5% in 48 h, with an ethanol production of 86.6 g/L and the highest productivity ($W_E = 1.80$ g/L·h). Ethanol concentration increased up to 91.3 g/L with an initial lactose concentration of 190 g/L, but productivity decreased to 1.40 g/L·h with a yield efficiency of 90%. From this point on, either ethanol production is blocked and lactose consumption is interrupted or substrate is used for other purposes, independently of the duration (fermentations were prolonged more than 96 h), resulting in a drastic decrease of productivity. This fact might be due to the severe decrease in cell membrane fluidity for long-exposure to hypertonic solutions, mass transfer becoming difficult (Thomas and Ingledew, 1992). Therefore, additional carbon sources are consumed by the yeast to maintain the activity of the

transport system of essential materials instead of being fermented to produce ethanol (Zhang *et al.*, 2015). Therefore, employing a CWP with 170 g/L lactose, commonly produced by dairy industry, is very convenient for the economy of ethanol industry, taking the advantages of VHG fermentation (Puligundla *et al.*, 2011) without wasting resources.

To the best of our knowledge, this is the first time that *K. marxianus* is described to work with such a high lactose concentration. Many authors have reported inhibitory problems working with substrate concentrations higher than 100 g/L (Gabardo *et al.*, 2014; Dragone *et al.*, 2011; Ozmicchi and Kargi, 2009, 2007). This study concludes that *K. marxianus* DSM 5422 did not suffer important substrate inhibition below 230 g/L lactose. However, at lactose concentrations higher than 190 g/L, worse sugar exploitation was obtained with a drastic reduction of ethanol productivity, so its use would not be feasible.

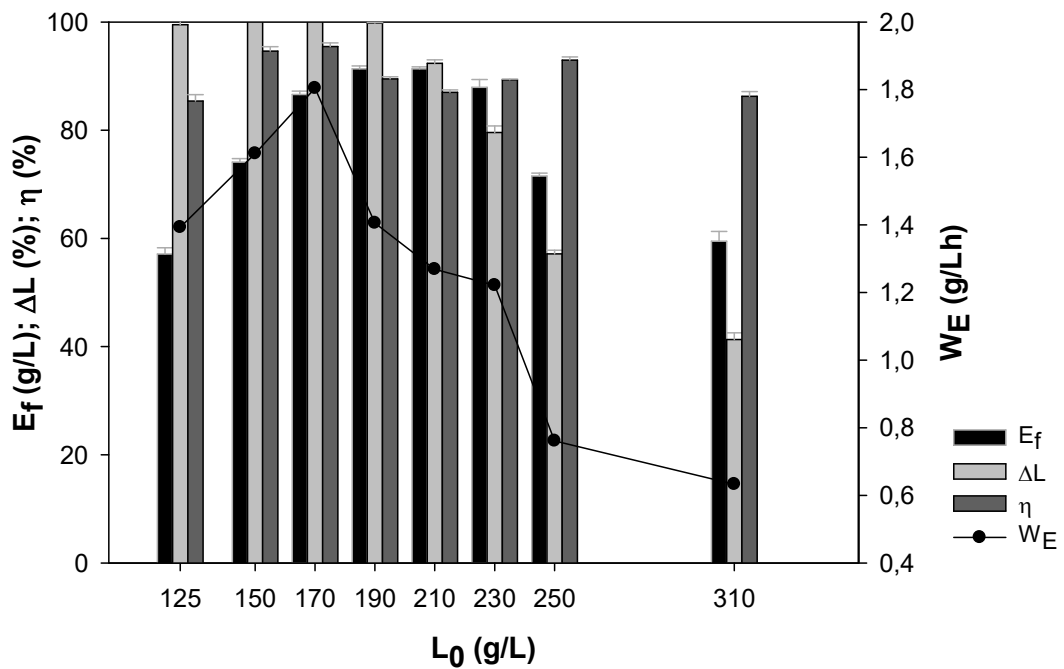


Figure 4.1. Effect of CWP lactose content on E_f , ΔL , η and W_E variables.

4.3.3. Response surface (RSM) analysis for the optimization of immobilization parameters

A central composite design (CCD) of three factors was used (X_1 : Alg, %; X_2 : Cell, %; X_3 : D_p , mm). The design had 20 experiments and included 8 cube points, 6 axial points and 6 central point replications ($\alpha = 1.68$). Final ethanol concentration (E_f , g/L) and lactose consumption rate (ΔL ; %) were selected as response variables. Fermentation conditions were established at $L_0 = 170$ g/L; $T = 30$ °C; $pH_0 = 6.3$. In all cases, 10 g of cell-immobilized beads were employed per 50 mL of fermentation medium. Table 4.2 shows randomized experimental conditions and observed responses (E_f and ΔL). The RSM showed that the studied parameters affected significantly both responses. The empirical models in terms of uncoded factors for E_f and ΔL are given in Eq (4.1) and (4.2), respectively (Note: Significant coefficients are marked with an asterisk).

$$E_f = 82.01 - 1.51x_1^* + 1.26x_2^* - 5.15x_3^* + 0.41x_1^{2*} + 0.06x_2^{2*} + 0.24x_3^{2*} + 0.06x_{12}^* - 0.05x_{23} - 0.21x_{13} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

$$\Delta L = 107.17 - 1.18x_1^* + 2.77x_2^* - 4.37x_3^* + 0.20x_1^{2*} - 0.04x_2^{2*} + 0.58x_3^{2*} - 0.02x_{12}^* - 0.17x_{23} - 0.57x_{13} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Tabla 4.2. Experimental central composite design (CCD) runs and responses.

Run	Independent factors			Responses		Run	Independent factors			Responses	
	X_1	X_2	X_3	E_f (g/L)	ΔL (%)		X_1	X_2	X_3	E_f (g/L)	ΔL (%)
1	3.50	2.00	3.75	68.10	97.11	11	3.50	2.00	4.84	66.43	95.25
2	5.00	1.00	3.10	68.16	96.48	12	5.00	1.00	4.40	67.28	95.00
3	3.50	2.00	3.75	68.01	96.60	13	5.00	3.00	3.10	70.16	98.82
4	5.00	3.00	4.40	67.18	95.46	14	2.00	3.00	4.40	68.22	97.09
5	3.50	3.68	3.75	68.97	97.93	15	3.50	2.00	3.75	68.32	97.04
6	2.00	3.00	3.10	69.71	99.41	16	6.02	2.00	3.75	67.46	96.25
7	3.50	0.32	3.75	67.16	95.45	17	2.00	1.00	4.40	67.29	96.14
8	0.98	2.00	3.75	70.66	99.40	18	3.50	2.00	3.75	67.93	95.55
9	3.50	2.00	3.75	67.5	96.69	19	2.00	1.00	3.10	69.23	97.37
10	3.50	2.00	2.66	70.73	99.31	20	3.50	2.00	3.75	66.70	95.23

From an ANOVA analysis (Table 4.3), it was inferred that predicted models were adequate for both responses. However, the E_f model predictability could be questioned (pred- $R^2= 5.99 \%$). Therefore, reduced models were proposed to try to improve model predictability and obtain quadratic model significance. The reduced quadratic models for E_f and ΔL responses are shown in equations (4.3) and (4.4), respectively.

$$E_f = 82.01 - 1.61x_1^* + 0.46x_2^* - 5.87x_3^* + 0.18x_1^{2*} + 0.56x_3^2 \quad (\text{Ec. 4.3})$$

$$\Delta L = 113.49 - 1.83x_1^* + 0.73x_2^* - 6.03x_3^* + 0.19x_1^{2*} + 0.58x_3^2 \quad (\text{Ec. 4.4})$$

In the reduced models, regression, linear and quadratic significance were obtained (Table 4.3). For both responses, the F-value increased after eliminating not significant terms, p-value for lack of fit was also greater, improving accuracy. R^2 and R^2_{adj} were slightly affected; however, model predictability was heavily improved.

Tabla 4.3. Analysis of variance- ANOVA- of the predicted models for E_f and (ΔL) responses

Source	E_f Model		ΔL Model		E_f reduced Model		ΔL reduced Model	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value
Regression	5.67	0.006	9.41	0.001	12.89	0.000	17.28	0.000
Linear	14.71	0.001	24.48	0.000	18.89	0.000	25.94	0.000
Square	2.06	0.170	2.71	0.101	3.89	0.045	4.28	0.035
Interaction	0.26	0.851	1.05	0.412				
Lack of fit	1.92	0.426	0.35	0.864	1.21	0.438	0.43	0.869
R^2 (%)	83.6		89.4		82.1		86.0	
R^2_{adj} (%)	68.9		79.9		75.8		81.1	
pred- R^2	6.0		67.9		51.3		73.1	

Optimum conditions were mathematically determined through the maximization of both responses. At the optimal point ($X_1 = 0.98\%$; $X_2 = 3.68\%$; $X_3 = 2.66 \text{ mm}$), E_f achieved 71.22 g/L with a yield efficiency of 80% and total lactose consumption. Smaller beads yielded a better performance, due to an increase in the surface-volume ratio. The obtained values of alginate about 1% are in accordance with reported studies

immobilizing *S. cerevisiae* (Idris and Suzana, 2006). However, these authors pointed out that bead alginate concentrations lower than 2% are highly susceptible to compaction and disintegration during the process in bioreactor systems due to the internal mechanical loading on the beads. As it was confirmed experimentally, the use of alginate concentration above 2% generates an ethanol decrease probably due to the lower diffusion efficiency of the beads. Therefore, a concentration of 2% of sodium alginate will be considered as optimal. An improvement of 5% in efficiency was obtained with the optimization versus the results obtained in Section 4.3.1 (Table 4.2. Run 5).

4.3.4. Repeated batch fermentation

The optimal immobilized model (% Alg: 2; % Cell: 3.68; Dp: 2.66 mm) was validated by recycling the gel beads for 6 cycles of 48 h, employing non-supplemented CWP ($L_0=170$ g/L) as a substrate to assess continuous fed-batch fermentation performance. The evolution of fermentation kinetic parameters is shown in Figure 4.2.

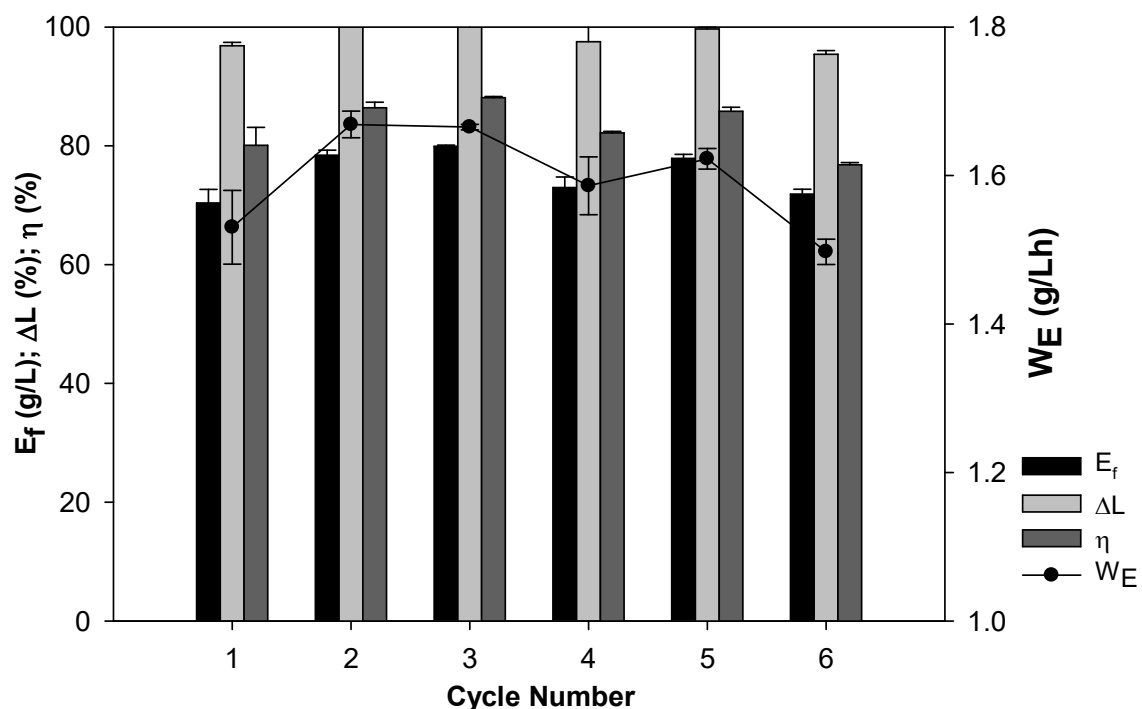


Figure 4.2. Kinetic fermentation parameters (E_f , ΔL , η and W_E) at the end of each cycle.

In the first cycle, final ethanol concentration, efficiency and productivity were lower than in the next cycles. This could be due to the need of cells to adapt to the immobilization stress (Duarte *et al.*, 2013). During the 288 h of experimentation, there was a mean ethanol production of 83.2 g/L, with a productivity of 1.6 g/L·h and a yield efficiency of 83.2%. A stable ethanol production can be observed throughout the cycles with a very good performance without contamination; therefore, this immobilization technique could be employed in continuous fermentation configurations with tubular bioreactors. A minimum degree of compaction was observed, but beads did not experience disaggregation during operation. When the beads were created (t=0) they had a spherical shape ($r=1.30$ mm, $V= 9.20$ mm³) and contained $1.99 \cdot 10^3$ cell/mm³. After six batch cycles the amount of yeast cells inside the beads was only slightly lower ($1.16 \cdot 10^3$ cell/mm³). In addition, at the end of every cycle cells were also detected in the CWP outside the bead. For instance, after the sixth cycle, the yeast concentration in CWP was $9.48 \cdot 10^4$ cell/mm³. The average final volume of each bead was 6.39 mm³ and they had an ellipsoidal shape ($a=b=1.25$ mm, $c=0.98$ mm).

4.3.5. Conclusions

High lactose-loaded cheese whey permeate is an excellent low-cost medium for alcoholic fermentation employing *Kluyveromyces marxianus*. The CWP did not need nutrient supplementation to maximize ethanol production, which improves significantly the economic feasibility of the process. The combination of VHG fermentation with cell entrapment immobilization turned out to be a very promising approach to ethanol production: very low substrate cost, high ethanol efficiency, high productivity, total substrate consumption, and great stability throughout time without contamination. Experiments were performed under a fed-batch configuration at lab scale, which should be scaled up in continuous bioreactors in pilot plants.

Acknowledgments

Authors thank ITACyL for financial support. M.H-V is supported by a postdoctoral contract (DOC-INIA, grant N° 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 during experimentation.

References

- Brady D., Nigam P., Marchant R., McHale A.P., 1997, Ethanol production at 45 °C by alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media, *Bioprocess Engineering*, 16, 101–104.
- Dragone G., Mussatto S.I., Almeida e Silva J.B., Teixeira J.A., 2011, Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy*, 35, 1977-1982.
- Duarte J.C., Rodrigues J.A.R., Moran P.J.S., Valença G.P., Nunhez J.R., 2013, Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3(1), 31.
- Eş I., Vieira J. D. G., Amaral A. C., 2015, Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), 2065-2082.
- Gabardo S., Rech R., Rosa C.A., Ayub M.A.Z., 2014, Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renawable Energy*. 69, 89-96.
- Gabardo S., Rech R., Ayub M.A.Z., 2012, Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(8), 1194-1201.
- Idris A., Suzana W., 2006, Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41, 1117-1123.
- Nikolić S., Mojović L., Pejin D., Rakin M., Vukašinić M., 2010, Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biomass and Bioenergy*, 34(10),1449-1456.
- Ozmihci S., Kargi F., 2009, Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in packed-column bioreactor: effects on feed sugar concentration, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 106-111.

- Ozmihci S., Kargi F., 2007, Effect of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 876-880.
- Pisano I., Agrimi G., Grosso G., Mena M.C., Ricci M.A., Palmieri L., 2015, Improved *Saccharomyces cerevisiae* growth on cheese whey by controlling enzymatic lactose hydrolysis. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 637-642
- Puligundla P., Poludasu R.M., Rai J.K., Obulam V.S.R., 2011, Repeated batch ethanolic fermentation of very high gravity medium by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*; 61: 863-869.
- Sansonetti S., Curcio S., Calabrò V., Iorio G., 2010a, Evaluation of the parameters effects on the bioethanol production process from Ricotta cheese whey, *Chemical Engineering Transactions* 20, 13-18.
- Thomas, K.C., Ingledew, W. M., 1992, Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *Journal of Industrial Microbiology*, 10(1), 61-68.
- Zhang Q., Wu D., Lin Y., Wang X., Kong H., Tanaka S, 2015, Substrate and product inhibition on yeast performance in ethanol fermentation. *Energy Fuels*, 29, 1019-1027.

Anexo 4.1.

En la Figura A.4.1., se muestran las imágenes de la distribución y colonización de la cepa *K. marxianus* DSM 5422 inmobilizada sobre esferas de alginato cálcico por atrapamiento.

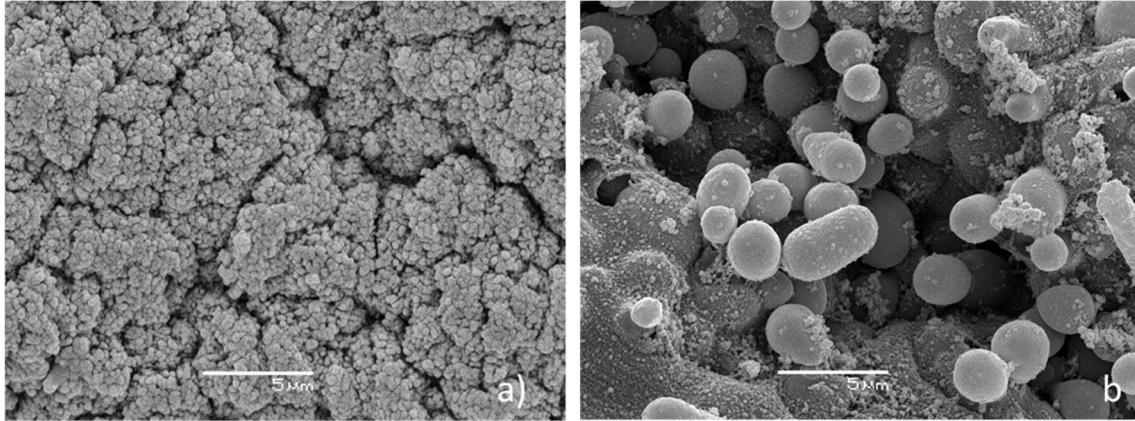
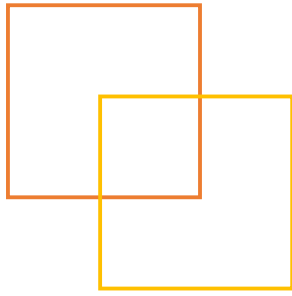
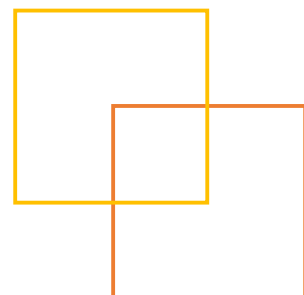


Figura A.4.1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SME) representando la distribución y colonización de *K. marxianus* DSM 5422 inmobilizada por atrapamiento a) gel de inmovilización: alginato cálcico; b) microorganismo inmobilizado por atrapamiento en esferas de alginato cálcico



5. Yeast screening and cell immobilization on inert supports for ethanol production from cheese whey permeate with high lactose loads



Yeast screening and cell immobilization on inert supports for ethanol production from cheese whey permeate with high lactose loads

Abstract

*The development of efficient processes for the treatment of cheese whey complying with environmental aspects and economic feasibility are a pressing need in dairy industries. High lactose content cheese whey permeate (CWP) could be a perfect feedstock for ethanol production. However, appropriate yeast strains must be found to overcome technical difficulties, as it is the need of metabolizing lactose, to survive under high osmotic pressure with high sugar concentrations and to produce high levels of ethanol concentration. In the present study, eight yeast strains of the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* were screened to ferment high lactose-load CWP (>130 g/L lactose) without nutrient supplementation. The fermentation conditions (temperature, pH and time) were optimized to maximize the fermentation performance (ethanol titer, ethanol yield and lactose consumption) for the two preselected strains, *K. marxianus* DSM 5422 and *S. cerevisiae* Ethanol Red[®], using a response surface methodology (RSM). Under optimized conditions, *K. marxianus* DSM5422 attained ethanol titers of 6% (v/v) in only 44 h. Moreover, the feasibility of immobilizing this strain on four different inorganic supports (plastic, glass and Tygon[®] silicone Raschig rings and alumina beads) was assessed. Glass Raschig rings and alumina beads showed a more stable performance over time, yielding ethanol titers of 60 g/L during more than 1.000 hours, which remarkably reduces yeast cultivation costs. Results demonstrate the feasibility of using CWP for successful ethanol production in a simple and economical process.*

Keywords: High-loaded cheese whey permeate (CWP), bioethanol, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, inert support immobilization

Díez-Antolínez R, Hijosa-Valsero M, Paniagua-García AI, 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): e0210002 (18 páginas). DOI: 10.1371/journal.pone.0210002

The edition of this manuscript was in accordance with the scientific journal requirements.

5.1. Introduction

Cheese whey, the liquid by-product of milk coagulation during cheese production, is the most important source of organic contamination in the dairy industry due to the large volumes produced. About 10 L of cheese whey are generated for each kilogram of cheese manufactured (Prazeres *et al.*, 2012). It contains about 50% of the total solid content of the original milk, with lactose (48 – 60 g/L), proteins (6 – 8 g/L) and mineral salts (4 – 10 g/L) as major components (Gonzalez-Siso, 1996). The European Union (EU-27) and USA are the largest producers of cheese, generating more than 150 Mton each year (OECD-FAO, 2013). Cheese whey is characterized by a high organic pollutant load with high biological and chemical oxygen demand values (BOD and COD) ranging between 40 – 60 g/L and 50 – 80 g/L, respectively (Ergüder *et al.*, 2001). Lactose is responsible for 90% of the COD and BOD contents in whey (Gonzalez-Siso, 1996). About 50% of the cheese whey production is treated or valorized as source of proteins and lactose into feed and food products (Baldasso *et al.*, 2011). However, the surplus of lactose is not further resourceful; consequently, whey disposal means a serious environmental and economic problem (Mollea *et al.*, 2013).

The improper disposal of whey may cause major environmental problems like eutrophication or toxicity in the receiving environments (Prazeres *et al.*, 2012). Therefore, environmental restrictive rules have been established, forcing the dairy industry to find solutions to the large whey volumes generated and to seek for alternatives rather than the direct discharge. Nowadays, whey is evolving into a sought-after product because of the nutrients it contains and the functional properties it imparts to food (Koushki *et al.*, 2012). Moreover, its use as substrate for the biological production of several value-added products such as single cell protein, solvents (e.g. ethanol, butanol or acetone), organic acids (e.g. acetic, butyric, lactic, malic, propionic, malic or succinic), hydrogen, biopolymers and biodegradable plastics (Mollea *et al.*, 2013; Prazeres *et al.*, 2012) has been proposed.

Cheese whey has been employed as low cost and abundant raw material substrate for ethanol production. However, the alcoholic fermentation of whey is hardly economically competitive in comparison to traditional feedstocks such as sugar cane or corn

(Guimarães *et al.*, 2010). Despite this fact, the biotechnological reuse of this abundant and widely spread waste as a source for fuel production offering no competition with the food market and land uses is strongly desirable (Zoppellari and Bardi, 2013).

Not many yeast strains are capable of naturally fermenting lactose to ethanol. Traditional yeasts used for industrial fermentation processes, such as *Saccharomyces cerevisiae*, cannot metabolize lactose, due to the lack of both lactose permease and β -galactosidase enzyme systems (Kargi and Ozmichi, 2006). Therefore, an enzymatic or chemical hydrolysis of lactose is required to use whey for ethanol production using *S. cerevisiae*. Typical ethanol yields from lactose are reported as 80 – 85 % of theoretical (Mawson, 1994) when using cheese whey with lactose concentrations of 40 – 50 g/L. Another alternative strategy is the engineering of *S. cerevisiae*, but most of the obtained strains have shown undesirable characteristics such as low growth, genetic instability and low ethanol production (Guimarães *et al.*, 2008; Gabardo *et al.*, 2015).

Nevertheless, most of the *Kluyveromyces* species are capable of metabolizing the lactose to ethanol. In spite of the interesting attributes of *Kluyveromyces* species, such as thermotolerance, high growth rate, capacity to metabolize a wide variety of carbohydrates such as hexoses, pentoses and disaccharides (Lane and Morrissey, 2010) as well as its generally recognized as safe (GRAS) (Hensing *et al.*, 1994, 1995), it is far away to compete in industrial processes using *Saccharomyces*.

Different strategies have been tested for developing ethanol production processes using these species. For *K. marxianus*, Gabardo *et al.* (2014) concluded that it is unnecessary to supplement either whey or whey permeate because this organic stream is already rich in nutrients and the addition of nitrogen could affect ethanol production by cell metabolism impairment. Nevertheless, inhibitory problems or process imbalances have been frequently reported when working with substrate concentrations higher than 100 g/L (Ozmihci and Kargi, 2007, 2009; Dragone *et al.*, 2011; Gabardo *et al.*, 2014). Therefore, direct fermentation of whey is not economically feasible due to low ethanol concentrations and high distillation costs (Ozmihci and Kargi, 2009; Dragone *et al.*, 2011). Nevertheless, Diez-Antolinez *et al.* (2016) reported the viability of directly fermenting non-supplemented cheese whey permeate (CWP) with a lactose load of

about 170 g/L without substrate inhibitions, reaching ethanol yield efficiencies of 95.5% in 48 h with ethanol titers of 86.6 g/L.

In the case of *S. cerevisiae*, the conversion of galactose into glycolytic intermediates needs energy and additional catabolic steps, because glycolytic enzymes are not galactose specific. Hence, the Leloir pathway is switched on to convert galactose into glucose 6-phosphate, metabolized in the glycolysis pathway and reduced to ethanol (Gabardo *et al.*, 2015; Rubio-Teixeira, 2005; Timson, 2007). Therefore, *S. cerevisiae* strains require richer nutrient media, especially in nitrogen, to efficiently convert galactose into ethanol, reporting ethanol concentrations of only 18 g/L and 15 g/L using as substrates non-supplemented cheese whey and cheese whey permeates, respectively (Gabardo *et al.*, 2015).

Due to the low productivity of batch ethanol fermentation, continuous processes based on the immobilization of *S. cerevisiae* and *K. marxianus* to increase cell concentration in organic and inorganic supports by adsorption or entrapment (Diez-Antolinez *et al.*, 2016; Soupioni *et al.*, 2013; Gabardo *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2009) have been studied. Gel supports have great problems of stability over time (Gonçalves *et al.*, 1992) and organic supports require complex derivatization pretreatments (Lee *et al.*, 2012). Thus, it is interesting to explore the viability of inorganic supports in alcoholic fermentations

In the present study, the ability of eight yeast strains of the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* to ferment high lactose-load cheese whey permeate (CWP) was compared, and the most efficient strain for the production of ethanol was selected. Optimization of the operating conditions of the alcoholic fermentation (temperature, initial pH, time and cell immobilization) was optimized. As a whole, this permitted to improve prior knowledge of this fermentative process by using a *K. marxianus* strain immobilized on inert supports, which was able to ferment 90% of the lactose with yields higher than 90% during more than 1.000 hours by a repeated-batch recycling process.

5.2. Material and methods

5.2.1. Raw Material

CWP used as substrate was obtained from a mixture of cow and sheep milk after a concentration process by ultrafiltration provided by Quesería Entrepinares SAU (Valladolid, Spain). CWP was pasteurized by heating at 80 °C for 30 min to eliminate endogenous microorganisms. Lactose content ranged between 120 – 170 g/L with a protein contain of 34 g/L. The CWP presented an initial pH of 5.8.

5.2.2. Yeast strains and culture conditions

Four strains of *K. marxianus* and four strains of *S. cerevisiae* were used in this work. *K. marxianus* DSM 5418, DSM 5422, DSM 7239 and DSM 70799 were provided in lyophilized form by Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany). The reactivated culture was maintained on nutrient agar and stored at 4 °C. A loop-full of a slant culture was transferred to sterilized growth medium [50 g/L lactose (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O (Sigma Aldrich), 5 g/L yeast extract (AES Laboratories, Bruz, France), 2 g/L NH₄Cl (Fluka-Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), 10 g/L peptone (Fluka, Buchs, Switzerland) and 1 g/L KH₂PO₄ (Panreac, Castellar del Vallès, Spain)]. The medium was incubated in an orbital shaker Infors HT Minitron (Bottmingen, Switzerland) at 35 °C with a constant shaking at 120 rpm during 7 h in order to obtain exponential-phase cells.

The four *S. cerevisiae* strains were chosen because of their good ethanol and sugar tolerance or their worldwide commercial availability. The freeze-dried distillery yeast *S. cerevisiae* Ethanol Red[®] (Lesaffre Company, Marcq-en-Baroeul, France), the osmotolerant hybrid *S. cerevisiae* CECT 13152 (Tomsa Destil S.L., Madrid, Spain) obtained from the protoplast fusion of *S. cerevisiae* NCYC73 and a non-identified strain of *S. cerevisiae*, the compressed baker's yeast branded *S. cerevisiae* Hércules (Lessafre Iberica S.A., Valladolid, Spain) and the distillery yeast *S. cerevisiae* CECT 1383 provided by Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain) were used in this study. In the case of strains Ethanol Red[®], CECT 13152 and Hércules, 0.1% (w/v) yeast was directly added to the fermenter without a previous propagation step. Strain CECT 1383 was reactivated, maintained on nutrient agar and stored at 4 °C. A loop-full of a slant culture

was transferred to sterilized growth medium [20 g/L glucose (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), 10 g/L of yeast extract (AES Laboratories, Bruz, France) and 10 g/L peptone (Fluka, Buchs, Switzerland)]. The medium was incubated in an orbital shaker Infors HT Minitron (Bottmingen, Switzerland) at 32 °C with a constant shaking at 120 rpm during 7 h in order to obtain exponential-phase cells. A viable cell concentration of about 10⁸ cells/mL was obtained.

5.2.3. Kluyveromyces strains and fermentation media comparison

In order to find the most suitable yeast strain for directly fermenting high-loaded CWP to ethanol, the four *K. marxianus* strains listed in section 5.2.2 were assessed employing a synthetic medium with an initial lactose concentration of 130 g/L, supplemented with 3 g/L yeast extract, 2 g/L peptone, 2 g/L NH₄Cl, 2 g/L KH₂PO₄, 2 g/L K₂HPO₄, 1 g/L MgSO₄·7H₂O and 0.1 g/L MnSO₄·H₂O.

After selecting the most efficient strain, the effect of nutrient supplementation was assessed on that single strain by testing the addition of three nutrient solutions to the CWP. Nutrient solution “A” contained 3 g/L yeast extract, 2 g/L NH₄Cl, 2 g/L KH₂PO₄ and 2 g/L K₂HPO₄, which is rich in nitrogen sources (ammonium chloride and yeast extract) and phosphorous (phosphate salts) to promote cell growth and ethanol production (Parrando *et al.*, 2009). Nutrient solution “B” was composed of 1 g/L MgSO₄·7H₂O. Magnesium has been identified as an active component, which prolongs exponential growth, resulting in increased yeast cell mass (Dombek and Ingram, 1986). The addition of magnesium also reduces the decline in fermentative activity. Nutrient solution “C” contained 200 mg/L of sodium thioglycolate. Sodium thioglycolate acts as a reducing agent and neutralizes possible toxic effects (MacFaddin, 1985). Nutrients were autoclaved within the CWP medium, except magnesium and manganese salts, which were added as a microfiltered concentrate after autoclaving. CWP samples supplemented with eight different combinations of the three solutions (ABC, AB, AC, BC, A, B, C or none) were fermented.

All fermentations were carried out in 100-mL Erlenmeyer flasks containing 1.25 mL of inoculum and 48.75 mL of fermentation medium. Flasks plugged with foam stoppers

were incubated at 35 °C and 150 rpm in an Infors HT Minitron orbital shaker during 48 h after adjusting the pH to 6 units. Experiments were performed in duplicate.

5.2.4. *Saccharomyces* strains and lactose whey permeate hydrolysis optimization

After testing the incapacity of the four selected *S. cerevisiae* strains listed in section 5.2.2. to naturally metabolize the lactose present in the CWP (data no included), lactose hydrolysis was performed using a commercial β -galactosidase (Ha-Lactase 2100, enzymatic activity of 2.100 NLU/g, Chr. Hansen Holding A/S, Hoersholm, Denmark). In order to optimize the hydrolysis, a complete central design (CCD) and response surface methodology (RSM) experiments were developed using CWP with an initial lactose concentration of $L_i = 120$ g/L lactose. Three variables were assessed: enzyme dosage, pH and time. The response variables considered were the final concentrations of glucose (G_f) and galactose (Gal_f) released expressed in g/L, as well as the hydrolysis efficiency ($\eta_{(G+Gal)/L}$), which was calculated as follows:

$$\eta_{(G+Gal)/L} = \frac{G_f + Gal_f}{L_i} \times 100 \quad (\text{Ec. 5.1})$$

Some characteristics of these RSM experiments are provided in the Supplementary Material (SM) in Table SM.5.1. The estimated regression coefficients for hydrolysis efficiency (%) and the analysis of variance results are reported in the Supplementary Material (SM) in Tables SM.5.2 and SM.5.3, respectively. A surface model was fitted and the resulting polynomial equation was used to estimate the optimal enzyme dosage, time and pH values to obtain the highest amount of glucose and galactose released in the broth before the subsequent fermentation. Contour plots can be seen in Figure SM.5.1 for each pair of variables. A maximum lactose hydrolysis efficiency of 85% was obtained adding 0.28 mL/L of enzyme to the substrate and keeping the mixture at a pH of 5.9 and temperature of 30 °C during 7 hours. The hydrolyzed contained 65 g/L glucose, 65 g/L galactose and 7 g/L residual lactose.

In order to select the most efficient *S. cerevisiae* strain in the same conditions of *K. marxianus*, the four strains were compared for the fermentation of a hydrolyzed CWP without any nutrient supplementation. Fermentations were carried out in 100-mL

Erlenmeyer flasks containing 50 mL of hydrolyzed medium and 0.1% (w/v) of inoculum. Flasks plugged with foam stoppers were incubated at 35 °C and 150 rpm in an Infors HT Minitron orbital shaker (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) during 65 h after adjusting the pH to 5.4 units. Experiments were performed in triplicate.

5.2.5. Optimization of fermentation conditions

The optimization of operating conditions was made by employing each of the selected *K. marxianus* and *S. cerevisiae* strains, which had the best alcoholic performance in Sections 5.2.3 and 5.2.4.

Fermentations were carried out in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 95 mL of CWP with an initial lactose concentration of 132.5 g/L (with previous lactose hydrolysis in the case of *S. cerevisiae*). The batch runs started after the aseptic addition of a ratio of 0.1% (w/v) of inoculum to the fermentation medium. Three variables were optimized: temperature (T, °C), pH (pH, –) and fermentation time (t, h). A complete central composite design (CCD) experiment was run and response surface methodology (RSM) was applied for evaluating the empirical model. Second order polynomial were fitted for each response and the resulting equations used to estimate the optimal temperature, pH and time values that maximize the ethanol production (concentration and yield expressed per unit of lactose consumed). All the estimated optimal points were validated experimentally.

Twenty experiments were performed and included 8 cube points, 6 central points and 6 axial points ($\alpha=1.68179$). Fermentation conditions were simultaneously optimized for maximizing the responses of ethanol final concentration (E_f), ethanol yield factor ($Y_{E/L}$), ethanol profit factor (π_E) and ethanol volumetric productivity (W_E).

5.2.6. Comparison of immobilization supports

Four inorganic porous materials were selected because of their wide availability, easy preparation and reutilization, their steam sterilizability and their inexpensive or low-cost. Raschig rings of similar dimensions (length of 5 – 5.5 mm) of three different porous materials (plastic, glass and Tygon® silicone) and alumina beads with 5 mm of diameter

were selected. The inorganic porous supports were washed with deionized water and sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 minutes.

Approximately, 10 g of every support were introduced in 250-mL Erlenmeyer flasks, 50 mL of non-supplemented CWP with an initial lactose concentration of 130 g/L and 3.7% (v/v) of the selected yeast cells. The yeast strain and the fermentation conditions were obtained during the optimization step. For laboratory personal logistic needs, every 48 or 72 hours, fresh CWP replaced the exhausted whey medium for 7 cycles. Samples of exhausted whey were analyzed for fermentation performance. All experiments were performed in triplicate.

After 7 cycles, two supports were selected to test their stability for a prolonged period of time. The experiments were extended refreshing CWP during 14 cycles. In order to compare the effect of lactose load in immobilization performance, experiments were carried out employing non-supplemented CWP at two initial lactose concentrations (130 g/L and 170 g/L). All experiments were performed in triplicate.

5.2.7. Chemical analyses of fermented broths

Periodic samples were collected from the fermentation flasks using aseptic techniques to measure lactose, glucose, galactose and ethanol concentrations. Samples were centrifuged at 12.000 × g in a micro-centrifuge for 3 min (MiniSpin, Eppendorf, Hamburg, Germany). The concentrations of lactose, ethanol and lactic acid production were measured from supernatant samples filtered through a 0.22 µm filter and analyzed by a high performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent LC1200 HPLC) coupled to a refractive index detector (Agilent 1200 Series), using a Bio-Rad Aminex HPX-87-H (300 mm x 7.8 mm) column (Bio-Rad, Hercules, California, USA) with 5 mM H₂SO₄ mobile phase, a flow rate of 0.6 mL/min and a column temperature of 60 °C (Díez-Antolínez *et al.*, 2016).

$$\Delta L = \left(\frac{L_i - L_f}{L_i} \right) \quad (\text{Ec. 5.2})$$

$$Y_{E/L} = \frac{E_f}{L_i - L_f} \quad (\text{Ec. 5.3})$$

$$\eta_E = \frac{Y_{E/L}}{0.538} \times 100 \quad (\text{Ec. 5.4})$$

$$W_E = \frac{E_f}{t} \quad (\text{Ec. 5.5})$$

$$\pi_E = E_f \times \Delta L \quad (\text{Ec. 5.6})$$

The fermentation kinetic parameters were calculated at the end of the runs as follows. Lactose consumption rate (ΔL , %) was defined as the rate of consumed lactose being L_i and L_f , the initial and final concentration of lactose (g/L), respectively (Equation 5.2). The ethanol yield factor ($Y_{E/L}$, g/g) was defined as the ratio between ethanol final concentration (E_f , g/L) and lactose consumed (g/L) (Equation 5.3). The yield conversion efficiency (η_E , %) was defined as the ethanol yield versus the theoretical ethanol yield, assuming a theoretical ethanol production, by means of alcoholic fermentation of 0.538 g of ethanol per g of lactose consumed by yeast (Mawson, 1994) (Equation 5.4). The ethanol productivity (W_E , g/L·h) was defined as the ratio between ethanol concentration (g/L) and fermentation time (h) (Equation 5.5). In addition, we propose the use of a new parameter called profit factor (π_E), defined as the ethanol concentration E_f (g/L) multiplied by the lactose consumption rate ΔL (Equation 5.6). The ethanol yield ($Y_{E/L}$) and yield conversion efficiency (η_E) can be misleading when low ethanol concentration (E_f) and low lactose consumption (ΔL) values are recorded. From the environmental point of view, it is important to deplete as much lactose as possible during the fermentation, in order to reduce the COD of the broth before treating it as a liquid waste. Therefore, the parameter π_E combines in a single figure ethanol production and lactose consumption. In addition, high ΔL values imply a successful fermentation process with an almost complete use of available sugars by yeasts.

5.2.8. Statistical analyses

Comparisons among treatments were assessed with a one-way ANOVA and the Tukey HSD test using the software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA); differences were considered significant when $p < 0.05$. For the optimization steps, experimental designs, such as Response Surface Methodology (RSM) were generated and interpreted with the software Minitab 16 (Minitab Inc., State Collage, PA, USA).

5.3. Results and Discussion

5.3.1. *Kluyveromyces marxianus* strains and fermentation media comparison

This set of experiments was performed to determine the capacity of four different strains of *K. marxianus* to convert lactose into ethanol without inhibition problems working at lactose concentrations higher than 100 g/L. The four strains metabolized and biotransformed naturally lactose to ethanol. The ethanol produced, the lactose consumed and the ethanol yield varied substantially among the strains when a synthetic medium with an initial lactose concentration of 130 g/L was used. As can be observed in Figure 5.1, the highest ethanol production with a total lactose consumption corresponded to *K. marxianus* DSM 5422 and *K. marxianus* DSM 7239, with an ethanol yield of 0.41 g/g and 0.36 g/g, ethanol titers of 52.9 g/L and 48.8 g/L and productivities of 1.10 and 1.01 g/L·h, respectively. Due to the better fermentation performance obtained with *K. marxianus* DSM 5422, this strain was selected for the subsequent optimization process to increase its ethanol production capacity.

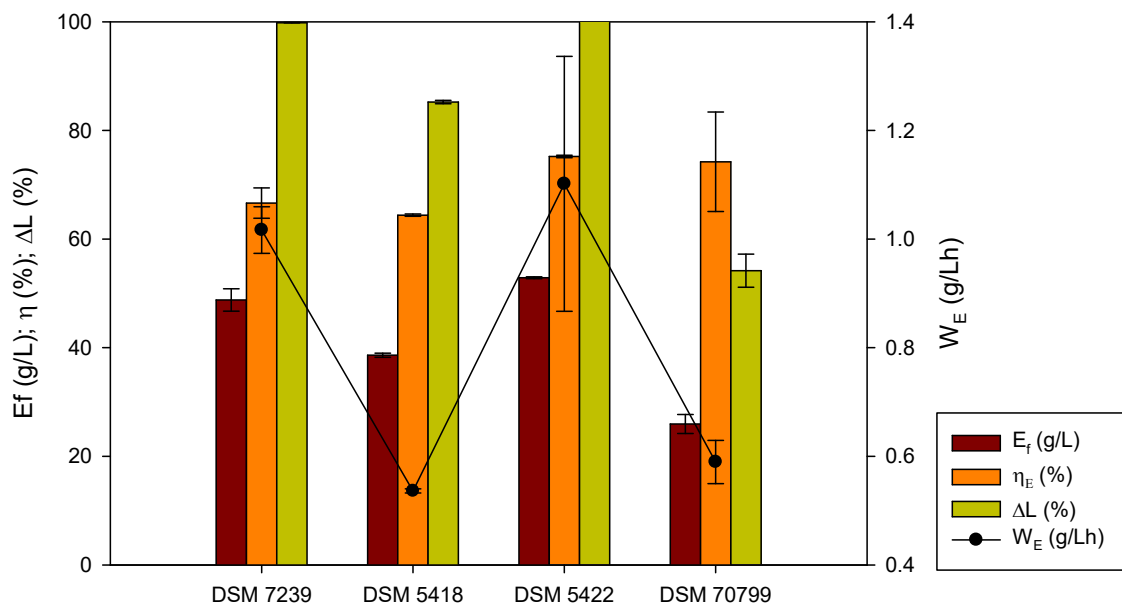


Figure 5.1. Fermentation performance of *K. marxianus* DSM 7239, DSM 5418, DSM 5422 and DSM 70799 in concentrated synthetic medium ($L_i = 130$ g/L). Parameters: final ethanol concentration, ethanol yield conversion efficiency (η_E), lactose consumption (ΔL) and productivity (W_E).

The effect of nutrient supplementation of CWP was tested with *K. marxianus* DSM 5422, due to its better performance employing synthetic media under the same fermentation conditions. Figure 5.2 shows the results of the fermentation of CWP without any supplementation and the eight combinations of nutrients tested. As it can be observed, the exclusive use of CWP without any supplementation provided a similar fermentation performance to that of CWP supplemented with solutions A, B, A+B and A+B+C. Due to the significant cost-saving, non-supplemented CWP was selected for the next experimental steps. The fermentation performance was: an ethanol titer of 62.0 g/L, an ethanol yield of 0.44 g/g (81.8% of the theoretical maximum yield) and a productivity of 1.3 g/L·h. These results compare well with other works in literature using supplemented concentrated whey. Dragone *et al.* (2011) reported conversions of concentrated deproteinized whey permeate ($L_i = 150$ g/L) into 55.9 g/L of ethanol with yields of 0.37 g/g employing *K. fragilis* Kf₁. Kargi and Ozmihci (2006) reported yields of 0.54 g/g with final ethanol concentrations of 81 g/L using *K. marxianus* NRRL-1195 strain in batch cultivations with a concentrated whey (150 g/L of lactose) and values of 3.7% (v/v) of ethanol with CWP (100 g/L of lactose) supplemented with 200 mg Na-thioglycolate to adjust the oxidation-reduction potential using *K. marxianus* DSM 7239 strains (Kargi and Ozmihci, 2006).

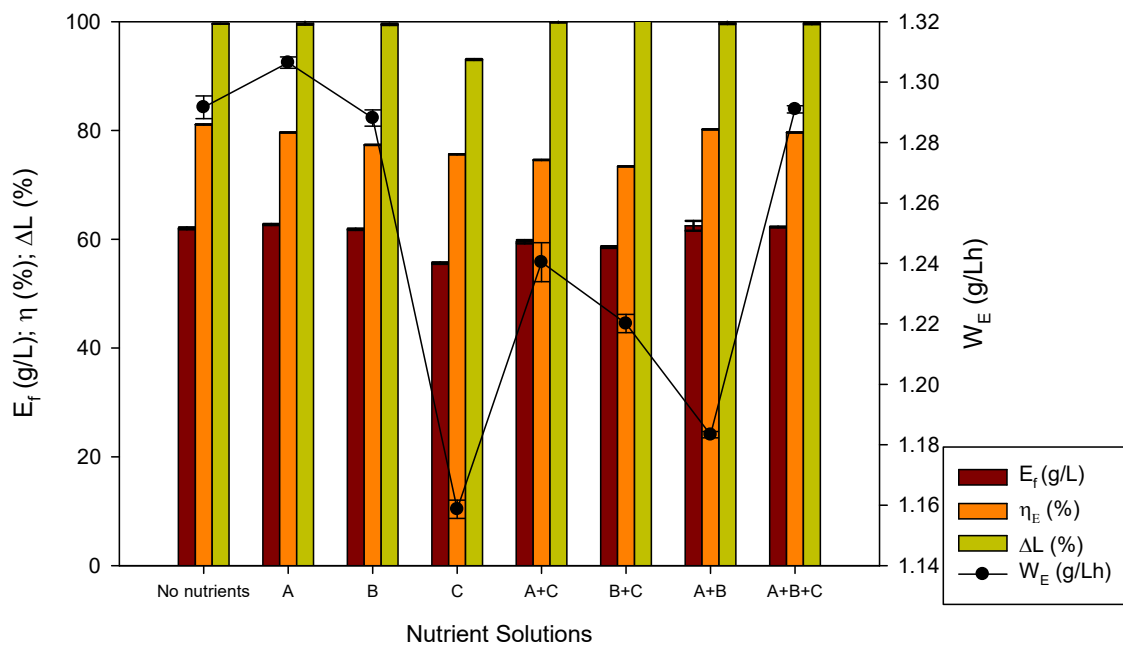


Figure 5.2. Evaluation of the effect of different combinations of nutrients on alcoholic fermentation performance. Response variables: Ethanol final concentration (E_f), ethanol yield conversion efficiency (η_E), lactose consumption (ΔL) and productivity (W_E) of *K. marxianus* 5422 employing concentrated CWP ($L_i = 130$ g/L).

5.3.2. *Saccharomyces cerevisiae* strains and fermentation media comparison

The capacity of four different strains of *S. cerevisiae* to produce ethanol from the hydrolyzate of high loaded lactose CWP ($L_i = 140$ g/L) was assessed. The ethanol produced, the sugars (glucose, galactose and residual lactose) consumed and the ethanol yield varied substantially among the strains. As can be observed in Table 5.1, the highest ethanol production and sugars consumption corresponded to Ethanol Red®, the only strain that was able to metabolize galactose into ethanol. The ethanol titer was of 43.63 g/L with an ethanol yield of 0.345 g/g and a productivity of 0.70 g/L·h.

Tabla 5.1. Fermentation performance of *S. cerevisiae* CECT 1383, Ethanol Red[®], CECT 13152 and Hércules in hydrolyzed CWP ($L_i = 140$ g/L). Parameters: final ethanol concentration (E_f), sugar consumption (ΔL), ethanol yield factor ($Y_{E/S}$), ethanol profit factor (π_E), productivity (W_E) and ethanol yield conversion efficiency (η_E).

Strain	E_f (g/L)	ΔL (%)	$\Delta(G+Gal)$ (%)	$Y_{E/L}$ (g/g)	$Y_{E/(G+Gal)}$ (g/g)	π_E (g/L)	W_E (g/L·h)	η_E (%)
CECT 1383	25.11	49.49	51.19	0.127	0.129	12.43	0.39	25.21
Ethanol Red[®]	45.63	96.69	99.52	0.345	0.350	44.11	0.70	68.67
CECT 13152	35.94	54.30	56.21	0.192	0.193	19.53	0.55	37.91
Hércules	34.24	52.75	55.29	0.179	0.180	18.06	0.53	35.35

5.3.3. Optimization of fermentation conditions

Optimal fermentation conditions (temperature; initial pH and time) were calculated via RSM experimental design for each strain employing CWP as feedstock.

5.3.3.1. *Kluyveromyces marxianus* strain

For the selected strain *K. marxianus* DSM 5422, the experimental conditions and the responses obtained are shown in Table 5.2. The full quadratic model was statistically effective for the final ethanol concentration at 95% confidence level. The estimated regression coefficients for ethanol titers (g/L) are reported in Supplementary Material in Table SM5.4. The analysis of variance results is shown in the Supplementary Material in Table SM5.5. Fermentation conditions were simultaneously optimized for maximizing the most significant responses (E_f and π_E) for the strain DSM 5422. According to the RSM mathematical estimations, maximum ethanol titer of 58.2 g/L, an ethanol yield factor of 0.44 g/g with an ethanol profit factor (π_E) of 58.2 g/L and an ethanol volumetric productivity (W_E) of 1.33 g/L·h would be theoretically obtained at 30.3 °C of temperature, 6.3 units of initial pH and 44 h of fermentation as optimal points. The theoretical conditions were tested experimentally to validate the model. An ethanol titer of 60 g/L was achieved for ethanol concentration with total lactose consumption, the ethanol yield factor $Y_{E/L}$ was of 0.45 g/g, corresponding with an 85.3% of the theoretical yield. The ethanol profit factor was of 60 g/L with an ethanol volumetric productivity was of 1.23 g/L·h. These data confirm the predictability of the fitted model for DSM 5422 strain, with a percentage error between experimental and predicted values of 3%.

Table 5.2. Experimental results of ethanol concentration (E_f), ethanol yield factor ($Y_{E/L}$), ethanol profit factor (π_E) and ethanol volumetric productivity (W_E) according to a central composite design employing *K. marxianus* DSM 5422 for the fermentation of CWP ($L_i = 132.5$ g/L).

Run	Variable Factor			Responses			
	pH	T (°C)	Time (h)	E_f (g/L)	$Y_{E/L}$ (g/g)	π_E (g/L)	W_E (g/L·h)
1	6.3	37.5	36	54.19	0.41	54.10	1.51
2	7.5	45.0	24	33.05	0.24	21.69	1.38
3	6.3	37.5	36	53.1	0.40	52.76	1.50
4	6.3	37.5	15.8	45.44	0.40	36.70	2.87
5	5.0	30.0	48	56.43	0.46	56.43	1.18
6	6.3	37.5	56	47.28	0.36	47.19	0.84
7	5.0	30.0	24	44.94	0.48	34.49	1.87
8	6.3	37.5	36	51.70	0.39	49.08	1.51
9	5.0	45.0	48	20.86	0.45	7.97	0.43
10	7.5	30.0	48	50.94	0.43	50.94	1.06
11	5.0	45.0	24	23.98	0.44	10.65	1.00
12	6.3	50.1	36	10.78	0.43	2.05	0.30
13	7.5	45.0	48	26.76	0.40	15.16	0.56
14	7.5	30.0	24	39.64	0.44	29.95	1.65
15	6.3	37.5	36	51.10	0.39	50.34	1.50
16	6.3	37.5	36	54.77	0.41	54.01	1.52
17	8.3	37.5	36	51.08	0.41	41.56	1.42
18	4.1	37.5	36	44.40	0.45	32.93	1.23
19	6.3	37.5	36	50.24	0.39	49.70	1.40
20	6.3	37.5	36	52.92	0.42	50.02	1.47

Even though some authors have reported the effects of substrate and product inhibition on fermentation performance using *Kluyveromyces* strains with substrates at concentrations higher than 100 g/L lactose (Diniz *et al.*, 2014; Sansonetti *et al.*, 2010), in this study *K. marxianus* DSM 5422 did not suffer substrate inhibition problems using CWP with an initial load of 132.5 g/L. Similar ethanol concentrations were reported using *K. marxianus* Kf₁ at 30 °C from 150 g/L of lactose under 44 h of fermentation (Dragone *et al.*, 2011). However, ethanol concentration under optimal conditions is threefold higher than those reported by Ozmihci and Kargi (2007) for *K. marxianus* DSM 7239, employing a lactose concentration of 130 g/L for an operation time of 48 h, working at 28 °C and pH 5. This data agrees with reported values of ethanol yields of 0.53 g/g and 0.52 g/g, under hypoxic and anoxic conditions, respectively. However, under aerobic

conditions as those in the present study, values fell to 0.39 g/g (Silveira *et al.*, 2005), which are similar to the values reported by Dragone *et al.* (2011).

The optimal operation time was 44 h, shorter than typically reported values ranging between 72 and 96 h when working with lactose loads lower than 100 g/L (Zoppellari and Bardi, 2013; Christensen *et al.*, 2011; Ozmihci and Kargi, 2007). This work significantly contributes to improve the economy of this fermentation process. An increase of ethanol volumetric productivity between 30 and 60% was obtained in this work *versus* commonly reported productivity values of 0.5 – 0.9 g/L·h (Gabardo *et al.*, 2014; Diniz *et al.* 2013; Ozmihci and Kargi, 2007), using a non-supplemented high lactose load CWP ($L_i = 132.5$ g/L) as a substrate. The ethanol volumetric productivity of 1.23 g/L·h obtained in this work is similar to values reported by Saini *et al.* (2017) employing the evolved adapted osmotolerant strain *K. marxianus* MTCC 1389.

On the other hand, the drawbacks of using directly *Kluyveromyces* strains to convert lactose to ethanol, including low ethanol titers of 2.5 to 4.2% (v/v), low osmotic tolerance and prolonged fermentation times (Parashar *et al.*, 2016; Guimarães *et al.*, 2010; USDA Rural Business and Cooperative Programs, 2008), are overcome in this work. The strain *K. marxianus* DSM 5422 under the optimized conditions converted directly lactose to ethanol with ethanol titers of 6% (v/v) in shorter fermentation times (44 h) employing high load lactose substrates with high osmotic tolerance. Thus, this study concludes that *K. marxianus* DSM 5422 is a promising strain for producing high yields of ethanol from non-supplemented high load lactose CWP. Although temperature, pH and operating time are factors that significantly affect the fermentation process, temperature showed the strongest effect on all responses.

5.3.3.2. *Saccharomyces cerevisiae* strain

In the same way as the fermentation with *K. marxianus* DSM 5422 was optimized in Section 5.3.2.1., optimal fermentation conditions (temperature; initial pH and time) were calculated via RSM experimental design for *S. cerevisiae* Ethanol Red[®]. In this case, the feedstock employed was the CWP hydrolyzed according to the conditions pointed out in section 5.2.4. No nutrients were supplemented in order to compare the fermentation performance of both species employing exactly the same feedstock. The

experimental conditions and the responses obtained for each condition are shown in Table 5.3.

Table 5.3. Experimental results of ethanol concentration (E_f), ethanol yield factor ($Y_{E/L}$), ethanol profit factor (π_E) and ethanol volumetric productivity (W_E) according to a central composite design employing *S. cerevisiae* Ethanol Red® for the fermentation of hydrolyzed CWP ($L_i = 132.5$ g/L).

Run	Variable Factor			Responses			
	pH	T (°C)	Time (h)	E_f (g/L)	$Y_{E/L}$ (g/g)	π_E (g/L)	W_E (g/(L·h))
1	5.5	40	72	22.52	0.27	7.563	0.31
2	5.0	35	64	45.03	0.35	44.72	0.70
3	4.5	30	72	44.70	0.35	44.46	0.62
4	5.8	35	64	47.75	0.37	47.46	0.75
5	5.5	30	56	45.65	0.38	40.10	0.82
6	5.0	43.4	64	19.25	0.30	0.70	0.30
7	5.5	40	56	35.61	0.33	23.87	0.64
8	5.0	35	64	45.36	0.35	45.04	0.71
9	5.5	30	72	47.17	0.36	46.93	0.66
10	4.5	40	72	17.67	0.25	1.83	0.25
11	5.0	35	77.5	42.50	0.33	42.24	0.54
12	5.0	35	50.6	39.24	0.36	27.96	0.78
13	4.2	40	64	28.09	0.29	14.44	0.44
14	4.5	40	56	28.31	0.30	13.64	0.51
15	5.0	35	64	44.77	0.35	42.31	0.70
16	5.0	35	64	46.49	0.36	46.13	0.73
17	5.0	35	64	45.20	0.36	43.32	0.71
18	5.0	26.6	64	43.92	0.35	41.35	0.69
19	4.5	30	56	41.79	0.36	33.49	0.75
20	5.0	35	64	45.90	0.36	43.99	0.72

The full quadratic model was statistically effective for the final ethanol concentration at 95% confidence level. The estimated regression coefficients for ethanol titers (g/L) and the analysis of variance results are reported in the Supplementary Material in Tables SM.5.6 and SM.5.7, respectively. The optimized fermentation conditions that simultaneously maximized E_f and π_E responses are 30.5 °C of temperature, 5.4 units of pH and 60 hours of fermentation. The estimated ethanol titer was 48.5 g/L with an ethanol yield factor of 0.37 g/g and an ethanol profit factor of 48.5 g/L, corresponding with a conversion efficiency of 70.1% and an ethanol volumetric productivity of 0.81 g/L·h. To validate the fitted RSM model, the fermentation was experimentally tested at

the optimized conditions. An ethanol titer of 47 g/L was achieved with a mean glucose consumption of 99.4% and a mean galactose consumption of 97.3%, the ethanol yield factor $Y_{E/L}$ was 0.37 g/g, corresponding with 68.2% of the theoretical yield. The ethanol productivity was of 0.73 g/L·h. These data confirm the predictability of the fitted model for Ethanol Red® strain, with a percentage error between experimental and predicted values of 3%. These results are in accordance with reported results of Zhang *et al.* (2015), who recorded ethanol yield factors of 80% fermenting glucose synthetic media using *S. cerevisiae* BY4747 with a sugar load of 120 g/L after 72 hours of fermentation. These authors observed a strong effect of substrate concentration on ethanol yield, establishing the critical substrate concentration in 160 g/L of sugar. The high concentration of substrate decreased membrane fluidity and caused cell atrophy and organelle dehydration (Zhang *et al.*, 2015).

Moreover, the enzymatic hydrolysis of lactose into glucose and galactose can cause catabolite repression (Gancedo, 1998), besides of being not economically convenient. Strains affected by such phenomenon show slower fermentations of sugar mixtures, such as glucose and galactose, compared to strains without catabolite repression (Pasotti *et al.*, 2017).

Therefore, the use of *K. marxianus* DSM 5422 is clearly preferable over *S. cerevisiae* Ethanol Red® for the fermentation of high lactose-loaded CWP.

5.3.4. Comparison of immobilization supports

In order to determine the effect of the immobilization on inorganic supports on the bioconversion of *K. marxianus* DSM 5422 for long-term fed-batch processes using high loaded non-supplemented CWP as a substrate to produce ethanol, four inorganic supports (glass Raschig rings, plastic Raschig rings, Tygon® silicone Raschig rings and alumina beads) were tested. The fermentation conditions were defined according to the results of the RSM model for this strain (section 3.2): 30.3 °C for temperature, 6.3 for pH and 44 h for fermentation time.

The profiles of ethanol production and the conversion efficiency for the four supports over time are shown in Figure 5.3. During the first cycles, the four inorganic supports had a similar behavior with final ethanol concentrations about 60 g/L. However, it was

observed that the production of ethanol decreased drastically after the 6th cycle with the supports of Tygon® and plastic. On the contrary, the samples with glass Raschig rings and alumina beads, even though they suffered an ethanol production drop during cycle 6th, they resumed production in the next batch. Conversion yields (η_E) were higher than 80 % per all cycles using inorganic supports, with yields higher than 90 % for glass Raschig rings and alumina beads in the 7th cycle.

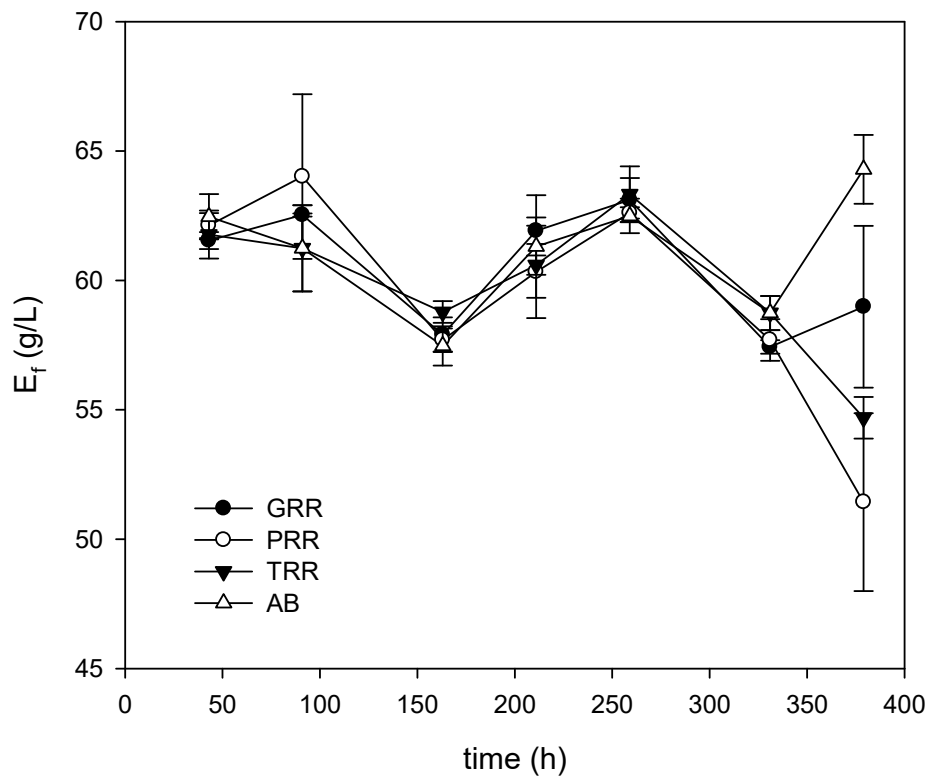


Figura 5.3. Evolution of ethanol concentration during ethanol fermentation for inorganic supports [glass Raschig rings (GRR), plastic Raschig rings (PRR), tygon Raschig rings (TRR) and alumina beads (AB)] during 7 fermentation cycles ($L_i = 130$ g/L) employing *K. marxianus* DSM 5422.

Due to their higher stability over time, glass Raschig rings and alumina beads were selected as immobilization supports to compare their behavior during a prolonged operation period of more than 1.000 hours, working in 14 cycles refreshing CWP with two different loads of lactose of 130 g/L and 170 g/L. For both inorganic supports, the profiles of ethanol production are presented in Figure 5.4 ($L_i = 130$ g/L) and Figure 5.5 ($L_i = 170$ g/L).

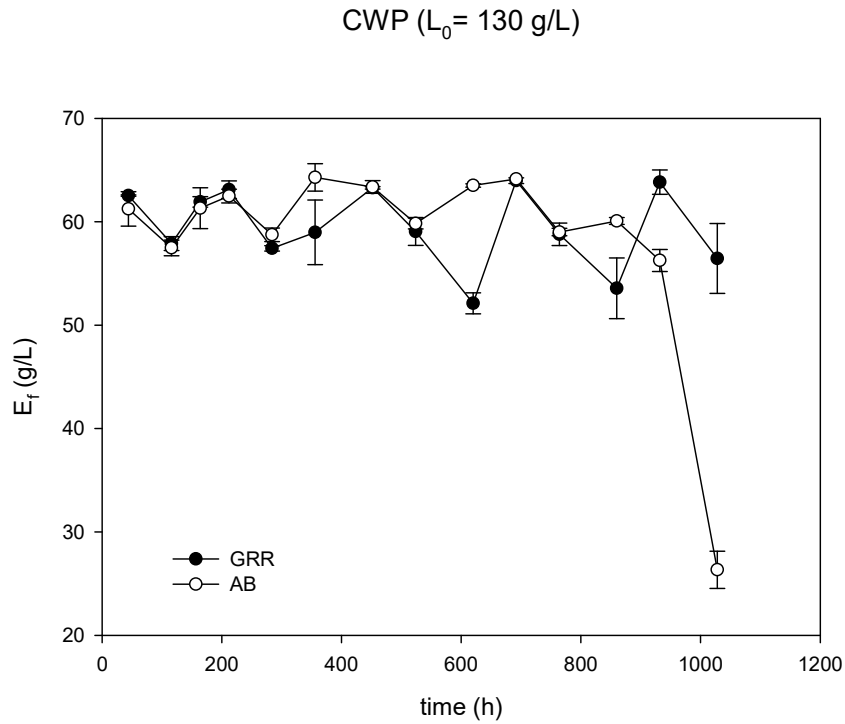


Figura 5.4. Evolution of ethanol concentration employing *K. marxianus* DSM 5422 on inorganic supports [glass Raschig rings (GRR) and alumina beads (AB)] during 14 fermentation cycles ($L_i = 130$ g/L).

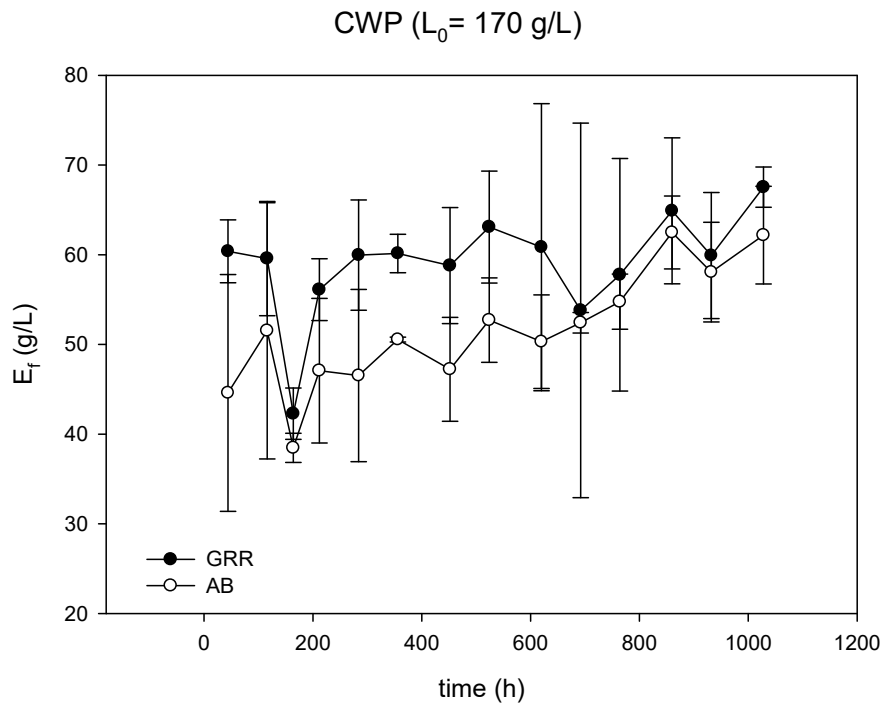


Figura 5.5. Evolution of ethanol concentration employing *K. marxianus* DSM 5422 on inorganic supports [glass Raschig rings (GRR) and alumina beads (AB)] during 14 fermentation cycles ($L_i = 170$ g/L).

The experimental results showed that *K. marxianus* DSM 5422 was able to metabolize more than 90% of the lactose present in the broth to produce ethanol in 48 – 72 hours of fermentation during the 14 operational cycles, working with a CWP with 130 g/L lactose load. However, the strain only metabolized 80% of this disaccharide when the CWP was loaded at $L_i = 170$ g/L, independent of the support. For this reason, from the 7th cycle, the fermentation time was increased to 72 – 96 hours for this high loaded CWP.

As it can be observed in Figure 5.4, in general the ethanol production remained constant at a value of 60 g/L during the 14 cycles for both supports, alumina beads and glass Raschig rings, working with a CWP with a lactose load of 130 g/L. The best performance was obtained with the alumina beads during all tested cycles with the exception of the 14th cycle, when a significant ethanol concentration drop was observed.

In the case of CWP loaded with 170 g/L lactose (Figure 5.5), the alumina beads had a worse performance than the glass Raschig rings during all the experimental cycle but their behavior was improving over time. The mean ethanol production was of 58.2 g/L after 14 cycles prolonging during more than 1.000 hours of fermentation.

The mean fermentation kinetic parameters for each inorganic support at the two tested CWP loads (130 g/L and 170 g/L) during the 14 cycles are summarized in Table 5.4. An important decrease of all the kinetic parameters was observed working with lactose concentrations of 170 g/L, due to possible inhibitions by substrate. It is noteworthy that lactose consumption decreased in almost 25%, affecting significantly the profit factor (π_E) and the productivity (W_E). In base of the results, it would be more convenient to work with CWPs with lactose concentration lower than 170 g/L in order to get a total lactose depletion and avoid environmental problems.

Tabla 5.4. Comparison of mean fermentation parameters: Ethanol final concentration (E_f), ethanol yield factor ($Y_{E/L}$), ethanol yield conversion efficiency (η_E), lactose consumption (ΔL), ethanol profit factor (π_E) and ethanol volumetric productivity (W_E) for *K. marxianus* DSM 5422 during the 14 cycles employing CWP with lactose loads of 130 g/L and 170 g/L for glass Raschig rings (GRR) and alumina beads (AB) supports.

		E_f (g/L)	$Y_{E/L}$ (g/g)	η_E (%)	ΔL (%)	W_E (g/L·h)	π_E (g/L)
CWP ($L_i=130$ g/L)	GRR	59.13	0.452	83.98	97.66	1.09	57.96
	AB	58.43	0.450	83.60	96.00	1.09	57.21
CWP ($L_i=170$ g/L)	GRR	56.71	0.449	81.93	75.66	0.82	43.84
	AB	50.94	0.445	82.64	68.07	0.72	35.57

5.4. Conclusions

High loaded cheese whey permeates (CWP) could be a feasible feedstock for ethanol fermentation, contributing simultaneously to an efficient reuse of the main waste stream of the dairy industry. The selection of an appropriate yeast strain is basic to overcome current techno-economical process difficulties including low ethanol titers, low osmotic tolerance and prolonged fermentation times. After the screening of eight yeast strains of the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*, the best performance was obtained employing *K. marxianus* DSM 5422, capable of fermenting directly high lactose-load CWP (> 130 g/L) to ethanol without the need of adding nutrients to the fermentation broth. The statistical optimization of fermentation conditions (temperature, initial pH and time) allowed the maximization of the fermentation performance (ethanol titer, ethanol yield and lactose consumption). Ethanol titers of 6% (v/v) and a total consumption of lactose in only 44 h were attained. Moreover, the feasibility of immobilizing this yeast strain on inorganic supports was assessed reporting stable ethanol production, yielding ethanol titers of 60 g/L for more than 1.000 hours (i.e. fourteen consecutive cycles), which remarkably reduces yeast cultivation costs. Economic and scale-up studies are needed to verify the feasibility of the proposed process.

Acknowledgements

Authors are grateful to ITACyL and FEDER European Regional Development funds (FEDER) for financial support. María 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 thanks R. Antón and N. del Castillo and G. Sarmiento for the technical help during the experiments. The authors thank Tomsa Destil S.L for kindly providing samples of *S. cerevisiae* CECT 13152 strain. The authors are grateful to Quesería Entrepinares SAU for generously supplying cheese whey permeate.

Bibliography

- Baldasso, C., Barros, T.C., Tessaro, I.C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278, 381–386.
- Christensen, A.D., Kádár, Z., Oleskovicz-Popiel, P., Thomsen, M.H. (2011). Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38, 283-289.
- 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.
- Dragone, G., Mussatto, S.I., Almeida e Silva, J.B., Teixeira, J.A. (2011). Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy*, 35, 1977-1982.
- Diniz, R.H.S., Rodrigues, M.Q.R.B., Fietto, L.G., Passos, F.M.L., Silveira, W.B. (2014). Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 111-117.
- Dombek, K.M., Ingram, L.O. (1986). Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 5975-5981.
- Ergüder, T.H., Tezel, U., Güven, E., Demirer, G.N. (2001). Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Management*, 21(7): 643-650.
- Gabardo, S., Rech, R., Ayub, M.A.Z. (2012). Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized

continuous bioreactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(8), 1194-1201.

Gabardo, S., Rech, R., Rosa, C.A., Ayub, M.A.Z. (2014). Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renewable Energy*, 69, 89-96.

Gabardo, S., Pereira, G.F., Rech, R., Ayub, M.A.Z. (2015). The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(9), 1243-1253.

Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 334-361.

Gonzalez-Siso, M.I.G. (1996). The bio-technological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57, 1-11.

Gonçalves, L.M.D., Barreto, M.T.O., Xavier, A.M.B.R., Carrondo, M.J.T., Klein, J. (1992). Inert supports for lactic acid fermentation—a technological assessment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(3): 305-311.

Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Advances*, 28, 375-384.

Guimarães, P.M., Teixeira, J.A., Domingues, L. (2008). Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 30(11), 1953.

Hensing, M.C., Rouwenhorst, R.J., Heijnen, J.J., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1995). Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 261-279.

Hensing, M.C., Vrouwenvelder, H., Hellinga, C., Baartmans, R., van Dijken, J.P. (1994). Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 516-521.

Kargi, F., Ozmişci, S. (2006). Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 711-718.

- Kosikowski, F.V. (1979). Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science*, 62, 1149-1160.
- Koushki, M., Jafari, M., Azizi, M. (2012). Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. *Journal of food science and technology*, 49(5), 614-619.
- Lane, M.M., Morrissey, J.P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24, 17-26.
- Lee, S.E., Lee, C.G., Kang, D.H., Lee, H.Y., Jung, K.H. (2012). Preparation of corncob grits as a carrier for immobilizing yeast cells for ethanol production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1673-1680.
- MacFaddin, J.F. (1985). *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Mawson, A.J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, 47(3), 195-203.
- Mollea, C., Bosco, F., Marmo, L. (2013). Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: *Food Industry*. Ed.: I. Muzzalupo, IntechOpen, DOI: 10.5772/53159.
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2013-2022*. OECD Publishing.
- Ozmihci, S., Kargi, F. (2007). Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution, *Letters in Applied Microbiology*, 44, 602–606.
- Ozmihci, S., Kargi, F. (2009). Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 84(1), 106-111.
- Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M., Bressler, D. C. (2016). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1859-1867.
- Parrondo, J., García, L. A., Díaz, M. (2009). Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26(3), 445-456.

- Pasotti, L., Zucca, S., Casanova, M., Micoli, G., De Angelis, M. G. C., & Magni, P. (2017). Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 17(1), 48.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. (2012). Cheese whey management: a review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.
- Rubio-Texeira, M. (2005). A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 5(12), 1115-1128.
- Saini, P., Beniwal, A., Kokkiligadda, A., Vij, S. (2017). Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol. *Process Biochemistry*, 62, 69-79.
- Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., Iorio, G. (2010). Optimization of ricotta cheese whey (RCW) fermentation by response surface methodology. *Bioresource Technology*, 101, 9156-9162.
- Silveira, W.B., Passos, F.J.V., Mantovani, H.C., Passos, F.M.L. (2005). Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxidoreductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 930-936.
- Singh, N.L., Srivastava, P., Mishra, P.K. (2009). Studies on ethanol production using immobilized cells of *Kluyveromyces thermotolerans* in a packed bed reactor. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 68, 617-623.
- Soupioni, M., Golfopoulou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A.A. (2013). Study of whey fermentation by kefir immobilized on low cost supports using ¹⁴C-labelled lactose. *Bioresource Technology*, 145, 326-330.
- Timson, D.J. (2007). Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochemistry. Process Biotechnology and Molecular Biology*, 1(1), 63-73.
- USDA Rural Business and Cooperative Programs. 2008. Research Report 214: Whey to ethanol: A biofuel role for dairy cooperatives? <https://www.rd.usda.gov/files/RR214.pdf>.
- Zhang, Q., Wu D., Lin Y., Wang X., Kong H., & Tanaka S. (2015). Substrate and product inhibition on yeast performance in ethanol fermentation. *Energy & Fuels*, 29(2), 1019-1027.

Zoppellari, F, Bardi, L. (2013). Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. *New Biotechnology*, 30, 607-613.

Supplementary Material (SM)

Table SM.5.1. Experimental results of glucose (G_f) and galactose (Gal_f) release and hydrolysis efficiency ($\eta_{(G+Gal)/L}$) according to a central composite design.

Run	Variable Factor			Responses		
	pH (-)	Lactase dosage (μ L)	Time (h)	G_f (g/L)	Gal_f (g/L)	$\eta_{(G+Gal)/L}$ (%)
1	6	100	4	28.94	22.55	42.44
2	5.63	175	7	45.42	34.11	65.55
3	5.63	175	7	45.44	34.16	65.61
4	6	250	10	45.54	34.21	65.74
5	5.63	175	7	45.42	34.11	65.55
6	5.63	175	2	44.33	31.29	62.33
7	5.63	175	7	44.49	33.56	64.33
8	5.25	250	4	18.88	13.87	26.99
9	5.63	48.87	7	22.18	19.89	34.68
10	5.25	100	10	5.51	8.64	11.66
11	6.26	175	7	45.15	33.97	65.22
12	5.63	175	12	44.37	34.32	64.86
13	5.63	175	7	44.22	33.17	63.79
14	5.63	301.13	7	56.36	44.77	83.36
15	4.99	175	7	2.48	4.46	5.72
16	6	250	4	46.87	34	66.66
17	5.25	250	10	18.26	15.09	27.49
18	6	100	10	31.26	25.72	46.97
19	5.63	175	7	35.53	26.49	51.12
20	5.25	100	4	6.94	7.81	12.16

Table SM.5.2. Estimated regression coefficients of lactose hydrolysis efficiency ($\eta_{(G+Gal)/L}$). Note: This model includes all the terms.

Term	Coefficient	SE coef.	T	P
Constant	43.7453	2.686	16.285	0
Time (h)	-0.0727	1.782	-0.041	0.968
Initial pH	12.7981	1.782	7.181	0
Enzyme dosage (μL)	8.3756	1.782	4.699	0.001
Time (h) * time (h)	-1.7973	1.735	-1.036	0.325
Initial pH * Initial pH	-9.0575	1.735	-5.221	0
Enzyme dosage (μL) * Enzyme dosage (μL)	-3.5933	1.735	-2.071	0.065
Time (h) * initial pH	0.38	2.329	0.163	0.874
Time (h) * Enzyme dosage (μL)	-0.355	2.329	-0.152	0.882
Initial pH * Enzyme dosage (μL)	0.94	2.329	0.404	0.695
	PRESS =	2814.42		
S = 6.58633	R-square(pred.)	=	42.94%	
R-square = 91.20 %	R-square(adj.) =	83.29%		

Table SM.5.3. Analysis of variance of lactose hydrolysis efficiency ($\eta_{(G+Gal)/L}$). Note: This model includes all the terms.

Source	Df	SSS	SSA	MSA	F	P
Regression	9	4498.41	4498.41	499.82	11.52	0.000
Lineal	3	3194.98	3194.98	1064.99	24.55	0.000
Time (h)	1	0.07	0.07	0.07	0.00	0.968
Initial pH	1	2236.88	2236.88	2236.88	51.57	0.000
Enzyme dosage (μL)	1	958.03	958.03	958.03	22.08	0.001
Quadratic	3	1294.20	1294.20	431.40	9.94	0.002
Time (h) * time (h)	1	6.29	46.55	46.55	1.07	0.325
Initial pH * Initial pH	1	1101.83	1182.28	1182.28	27.25	0.000
Enzyme dosage (μL) *	1	186.08	186.08	186.08	4.29	0.065
Enzyme dosage (μL)						
Interaction	3	9.23	9.23	3.08	0.07	0.974
Time (h) * initial pH	1	1.16	1.16	1.16	0.03	0.874
Time (h) * Enzyme dosage (μL)	1	1.01	1.01	1.01	0.02	0.882
Initial pH * Enzyme dosage (μL)	1	7.07	7.07	7.07	0.16	0.695
Residual error	10	433.80	433.80	43.38		
Lack of fit	5	357.68	357.68	71.54	4.70	0.057
Pure error	5	76.12	76.12	15.22		
Total	19	4932.21				

Table SM.5.4. Estimated regression coefficients of ethanol (g/L) for strain *K. marxianus* DSM 5422. Note: This model includes all the terms.

Term	Coefficient	SE Coef.	T	P
Constant	52.6545	1.2594	41.8110	0.000
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	-11.5818	0.8356	-13.8610	0.000
Initial pH	1.1287	0.8356	1.3510	0.207
Time (h)	1.2063	0.8356	1.4440	0.179
Temperature ($^{\circ}\text{C}$) *				
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	-8.2077	0.8134	-10.0910	0.000
Initial pH * Initial pH	-2.5897	0.8134	-3.1840	0.010
time (h) * time (h)	-3.0777	0.8134	-3.7840	0.004
Temperature ($^{\circ}\text{C}$) * Initial pH	3.2200	1.0917	2.9500	0.015
Temperature ($^{\circ}\text{C}$) * time (h)	-4.0250	1.0917	-3.6840	0.004
Initial pH * time (h)	-0.4200	1.0917	-0.3850	0.708
S = 3.08780	PRESS = 624.161			
R-square = 97.08 %	R-square(pred.) = 80.85 % R-square(adjusted) = 94.44 %			

Table SM.5.5. Analysis of variance of Ethanol (g/L) for strain *K. marxianus* DSM 5422. Note: This model includes all the terms.

Source	df	SSS	SSA	MSA	F	P
Regression	9	3164.68	3164.68	351.63	36.88	0.000
Lineal	3	1869.17	1869.17	623.03	65.35	0.000
Temperature (°C)	1	1831.9	1831.9	1831.9	192.13	0.000
Initial pH	1	17.4	17.4	17.4	1.82	0.207
Time (h)	1	19.87	19.87	19.87	2.08	0.179
Quadratic	3	213.96	213.96	71.32	7.48	0.006
Temperature (°C) *	1	908.85	970.84	970.84	101.82	0.000
Temperature (°C)	1	36.19	96.65	96.65	10.14	0.010
Initial pH * Initial pH	1	136.5	136.5	136.5	14.32	0.004
time (h) * time (h)	1	213.96	213.96	71.32	7.48	0.006
Interaction	3	82.95	82.95	82.95	8.7	0.002
Temperature (°C) * Initial pH	1	129.61	129.61	129.61	13.59	0.004
Temperature (°C) * time (h)	1	1.41	1.41	1.41	0.15	0.708
Initial pH * time (h)	1	95.35	95.35	9.53		
Residual error	10	79.27	79.27	15.85	4.93	0.052
Lack of fit	5	16.07	16.07	3.21		
Pure error	5					
Total	19	3260.05				

Table SM.5.6. Estimated regression coefficients of Ethanol (g/L) for strain *S. cerevisiae* Ethanol Red®. Note: This model includes all the terms.

Term	Coefficient	SE coef.	T	p
Constant	45.0389	1.3947	32.293	0
Temperature (°C)	-8.6176	0.9253	-9.313	0
Initial pH	3.8474	0.9253	4.158	0.002
Time (h)	-1.085	0.9253	4.158	0.002
Temperature (°C) * Temperature (°C)	-4.9045	0.9008	-5.445	0
Initial pH * Initial pH	-2.6647	0.9008	-2.958	0.14
Time (h) * Time (h)	-1.6217	0.9008	-1.8	0.102
Temperature (°C) * Initial pH	0.6025	1.209	0.498	0.629
Temperature (°C) * time (h)	-3.395	1.209	-2.808	0.019
Initial pH * time (h)	-0.605	1.209	-0.5	0.628
S = 3.41960	PRESS = 765.074	R-square(adj.) = 88.16%		
R-square = 93.77 %	R-square(pred.) =	59.22%		

Table SM.5.7. Analysis of variance of Ethanol (g/L) for strain *S. cerevisiae* Ethanol Red®. Note: This model includes all the terms.

Source	df	SSS	SSA	MSA	F	P
Regression	9	1759.07	1759.07	195.45	16.71	0.000
Lineal	3	1232.45	1232.45	410.82	35.13	0.000
Temperature (°C)	1	1014.21	1014.21	1014.21	86.73	0.000
Initial pH	1	202.16	202.16	202.16	17.29	0.002
Time (h)	1	16.08	16.08	16.08	1.37	0.268
Quadratic	3	428.58	428.58	142.86	12.22	0.001
Temperature (°C) *	1	299.45	346.64	346.64	29.64	0.000
Temperature (°C)	1	299.45	346.64	346.64	29.64	0.000
Initial pH * Initial pH	1	91.23	102.33	102.33	8.75	0.014
Time (h) * time (h)	1	37.9	37.9	37.9	3.24	0.102
Interaction	3	98.04	98.04	32.68	2.79	0.095
Temperature (°C) * Initial pH	1	2.90	2.90	2.9	0.25	0.629
Temperature (°C) * time (h)	1	92.21	92.21	92.21	7.89	0.019
Initial pH * time (h)	1	2.93	2.93	2.93	0.25	0.628
Residual error	10	116.94	116.94	11.69		
Lack of fit	5	96.93	96.93	19.39	4.85	0.054
Pure error	5	20.00	20.00	4.00		
Total	19	1876				

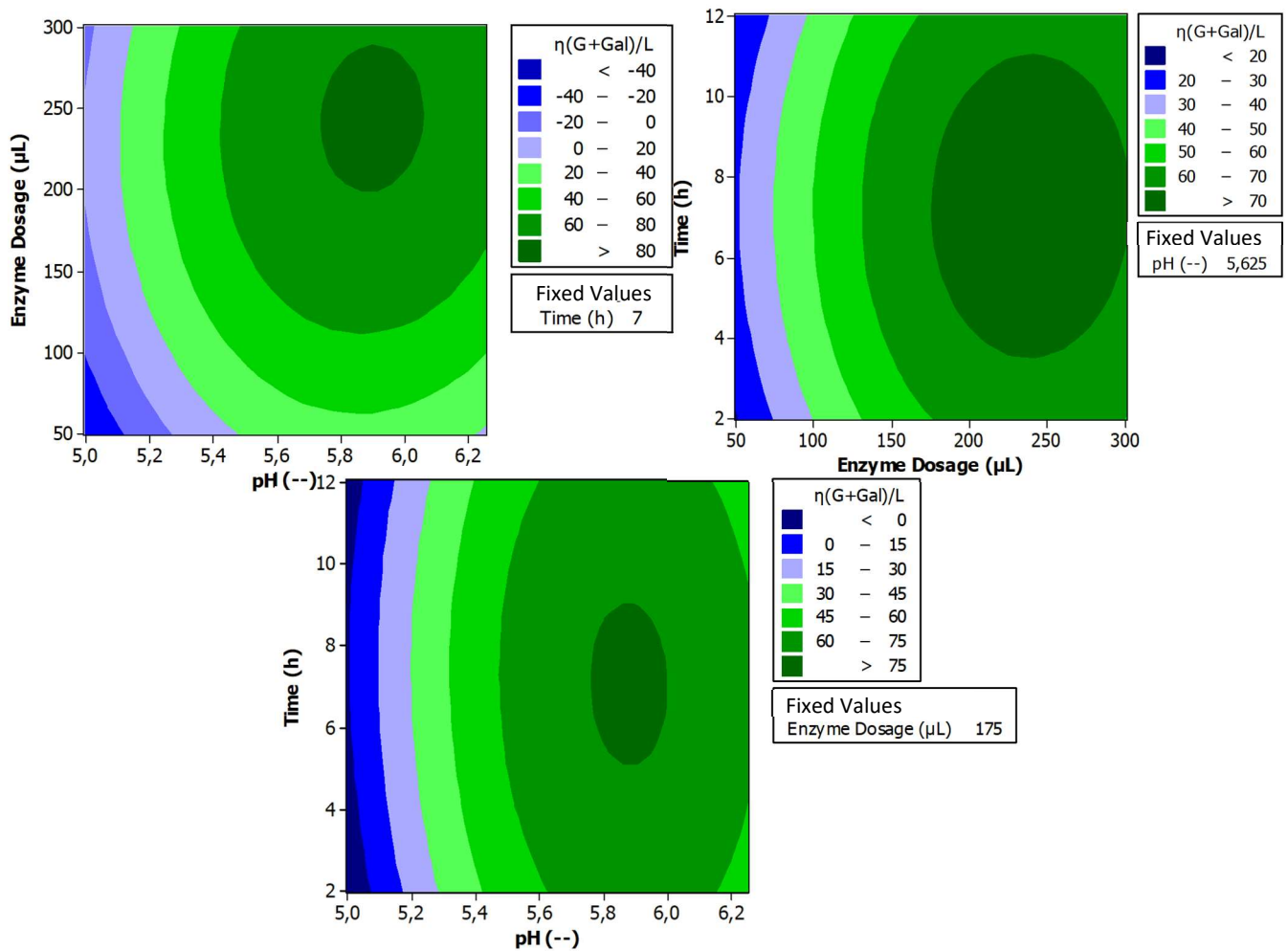
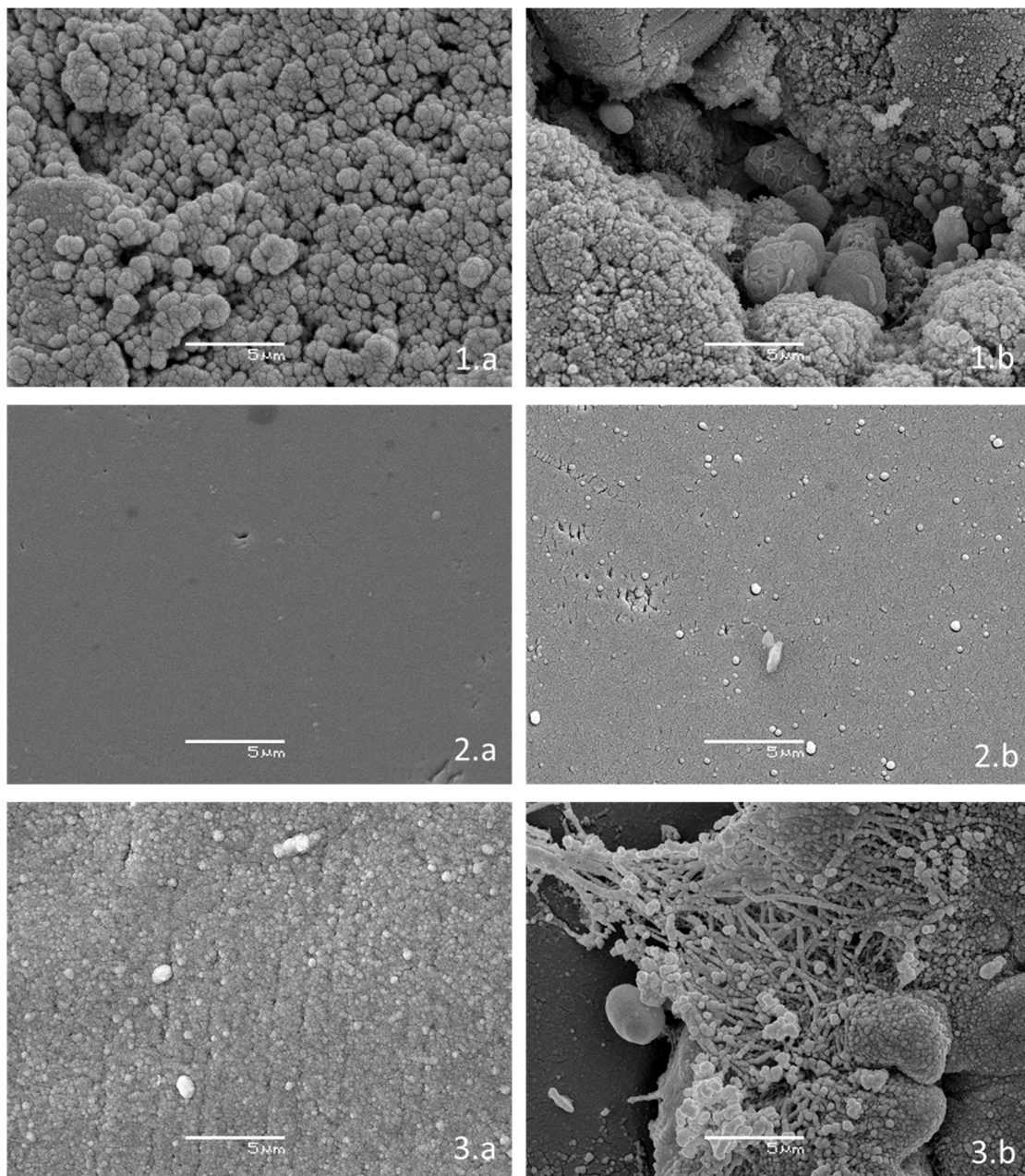


Figure SM.5.1. Contour plots for the estimation of lactose hydrolysis efficiency ($\eta_{(G+Gal)/L}$) as a function of hydrolysis conditions (enzyme dosage, initial pH and time), according to the mathematical RSM model.

Anexo 5.1.

En la Figura A.5.1., se muestran las imágenes de la distribución y colonización de la cepa *K. marxianus* DSM 5422 inmobilizada sobre cuatro soportes inertes por adsorción: esferas de alúmina, anillos Raschig de plástico, anillos Raschig de Tygon® y anillos Raschig de vidrio.



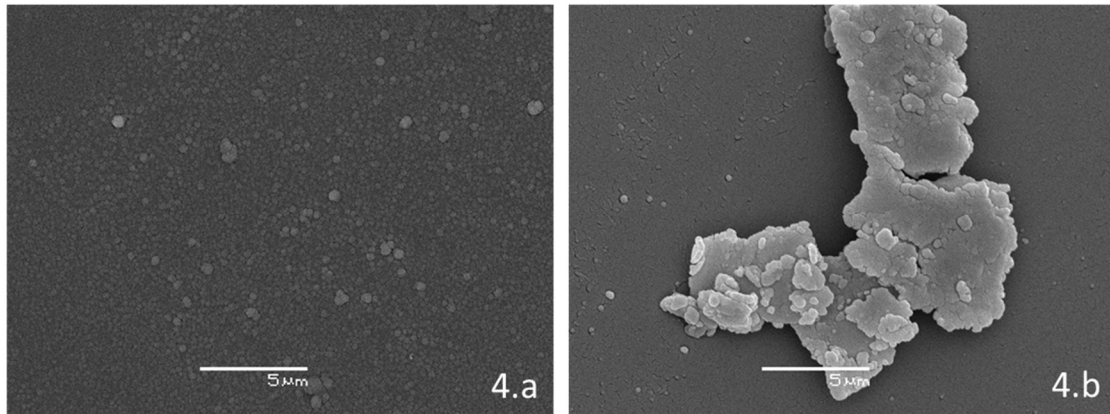
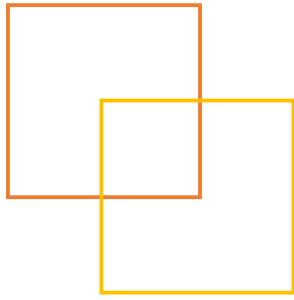
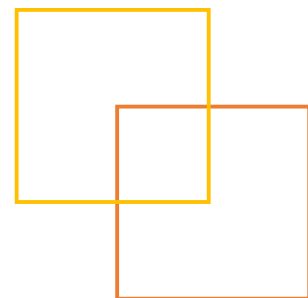


Figura A.5.1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SME) mostrando la distribución y colonización de *K. marxianus* DSM 5422 inmovilizada sobre soportes inertes: a) soportes inertes utilizados b) microorganismo inmovilizado sobre 1. Alúmina; 2. Plástico; 3. Tygon® y 4. Vidrio.



6. Effect of Nutrient Supplementation on Biobutanol Production from Cheese Whey by Acetone–Butanol–Ethanol Fermentation



Effect of Nutrient Supplementation on Biobutanol Production from Cheese Whey by Acetone–Butanol–Ethanol (ABE) Fermentation

Abstract

*Cheese whey is a liquid effluent obtained from the cheese manufacturing process, presenting a high volumetric production and high organic loads related to its lactose content. The aim of this research was to increase the productivity of ABE fermentation with the bacterial strain *Clostridium beijerinckii* CECT 508, when using nanofiltered sheep cheese whey as a substrate. Thermal sterilization of the whey was essential to avoid the proliferation of lactic acid bacteria. An experimental design including Plackett-Burman and Response Surface Methodology (RSM) was applied to figure out which additional nutrients were necessary for the fermentation process and their optimum concentrations. For this specific whey, it was established that 1 g/L yeast extract, 5 g/L CaCO_3 , 0.019 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 2.1 g/L NH_4Cl needed to be added. Under optimal nutrient conditions, the highest butanol production (9.11 g/L) was obtained with an initial lactose concentration of 57 g/L; achieving 49% lactose consumption and 0.311 g/g $Y_{B/L}$ yield. However, the best lactose consumption rate (87%) was recorded for lactose initial concentrations of 30 g/L, which also allowed satisfactory fermentation values (8.51 g/L butanol and 0.328 g/g $Y_{B/L}$ yield). On the other hand, the best $Y_{B/L}$ yields (0.428 g/g; which is close to the theoretical value) were obtained for initial lactose concentrations of 40 g/L, attaining a value of 52% lactose consumption and 8.91 g/L butanol. Therefore, the ABE fermentation could be a feasible solution to treat cheese whey and remove lactose, obtaining acceptable amounts of butanol.*

Keywords: ABE fermentation, *Clostridium* sp., RSM, nutrient supplementation.

Díez-Antolínez R, Hijosa-Valsero M, Paniagua-García AI, 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.

The edition of this manuscript was in accordance with the scientific journal requirements.

6.1. Introduction

Biocatalytic processes are presented as a real alternative to face new social challenges of a post-oil era. Since the 1980s, there has been an ongoing search for alternative fuels to be used either directly or mixed with fossil fuels. Interest in butanol production is increasing (Meesukanun and Satirapipathkul, 2014), because this alcohol presents higher energy content, lower volatility, lower hygroscopicity and it is less corrosive than ethanol. Additionally, butanol is an important chemical compound with many applications, like the production of solvents, resins and plasticisers.

The Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation with *Clostridium* strains was used worldwide at industrial scale for the production of acetone and butanol from the early twentieth century until the 1960s (Jones and Woods, 1986), but this fermentation was replaced by petrochemical processes with higher profitability. The major factors that compromised ABE fermentation economic feasibility included: the high cost of traditional substrates (corn, molasses, etc.), low concentration of butanol in fermented broth (associated with strong product inhibition affronted by microorganisms) (Ezeji *et al.*, 2004), low butanol yield, low volumetric productivity with typical values lower than 0.5 g/L·h (Ezeji *et al.*, 2013) and, finally, the high cost of solvent recovery processes, not only due to the diversity of solvents produced, but also to the high boiling point of butanol (118 °C) (Qi *et al.*, 2014). Under batch conditions, ABE fermentation takes place in two main phases: a first phase called acidogenesis, associated with rapid cell growth and secretion of carboxylic acids (acetate and butyrate) and a mixture of H₂ and CO₂ as gaseous substances, and a second phase involving the conversion of acid intermediates into solvents, called solventogenesis.

With the aim of reducing fermentation costs, the utilization of an agro-industrial waste with high polluting potential is of great relevance (Pisano *et al.*, 2015). An interesting substrate for ABE fermentation is whey. This liquid effluent obtained from the cheese manufacturing process presents high volumetric production and high organic loads. Typical chemical and biological oxygen demand (COD and BOD) values are 50 – 102 kg/m³ and 27 – 60 kg/m³, respectively (Ergüder *et al.*, 2001). This high organic load is mainly due to its lactose content (48 – 60 g/L), which may be too low for most industrial

fermentation processes, but results optimal in the case of butanol production. Cheese whey is also characterised by high protein content in the range of 33 – 67 g/L and fat content in the range of 8 – 10 g/L, which also contributes to its high organic load.

ABE fermentation has been extensively studied as an alternative for whey valorization. Most of these studies have been conducted in batch conditions resulting in higher acetone/butanol/ethanol production ratios than those typically obtained when fermenting carbohydrate substrates, such as starch or molasses (3: 6: 1). Reported solvent concentrations range between 5 – 15 g/L, with typical butanol productivities and yields ranging from 0.1 – 0.3 g/L·h and 0.23 – 0.40 g_{solvents}/g_{substrate} (Alam *et al.*, 1988; Napoli *et al.*, 2010; Welsh and Veliky, 1984), respectively.

The objective of this work was to improve lactose transformation in ABE fermentation of nanofiltered sheep cheese whey. In the first place, the composition of the fermentation medium (including the necessity of nutrient addition) was optimised for a maximal butanol production. Secondly, the effect of initial lactose concentration was studied in order to increase the fermentation yield and favour lactose depletion, thus reducing the polluting potential of the resulting effluent.

6.2. Material and Methods

6.2.1. Microorganisms and culture conditions

The strain used was *Clostridium beijerinckii* CECT 508 (NCIMB 8052), provided by the Spanish Collection of Type Strains (CECT, Paterna, Spain). The lyophilised cells were resuspended in synthetic medium consisting of 19 g/L Reinforced Clostridial Medium (Oxoid, Basingstoke, UK) and 10 g/L lactose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and exposed to a thermal shock (2 min at 80 °C in a water bath and 5 min in ice). They were subjected to sporulation according to the CECT protocol. Then, 500 µl spores were added to 100 mL of the above-mentioned synthetic medium, which was placed in glass bottles capped with a rubber septum, and exposed to a thermal shock. 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 6·10⁸ cells/mL.

6.2.2. Cheese whey and fermentation media

All fermentations were performed with sheep cheese whey provided by the cheese factory Quesería Artesanal del Río Carrión S.L. (La Serna, Palencia, Spain). This whey was nanofiltered, resulting in an increase in the concentrations of its components (Table 1). Whey ultrafiltration or nanofiltration is sometimes performed at the cheese producer's facilities in order to reduce transport costs if the whey is to be treated at a different locality. In the present work, the use of nanofiltered whey allowed for the possibility of making dilutions to obtain different lactose concentrations for the experiments.

Tabla 6.1. Composition of the nanofiltered sheep cheese whey employed in the experiments.

	Concentration		Concentration		Concentration
Lactose (g/L)	137	Mg (mg/L)	207	Cl ⁻ (mg/L)	1181
Proteines (g/L)	5.5	Cu (mg/L)	<1.0	Br ⁻ (mg/L)	33
Fats (%)	< 0.05	Fe (mg/L)	<5	NO ₂ ⁻ (mg/L)	<1
K (mg/L)	2524	Mn (mg/L)	<8	NO ₃ ⁻ (mg/L)	<1
Na (mg/L)	751	Zn (mg/L)	<1	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	222
Ca (mg/L)	193	F ⁻ (mg/L)	139	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	1907

Previous works indicate that ABE fermentation is properly developed up to lactose levels of 50-60 g/L (Qureshi and Maddox, 2005). Therefore, in the present work the nanofiltered whey was diluted with distilled water in order to obtain initial lactose concentrations which were more suitable for the development of *C. beijerinckii*. An adequate balance of organic and inorganic nutrients is required for growth and solvent production by *Clostridium* sp. Current studies confirm the fact that nutrient supplementation, particularly the addition of yeast extract, is essential for solvent production (Ezeji *et al.*, 2013). In the present work, the need for addition of supplementary nutrients was studied with the following substances: yeast extract (Fluka, Buchs, Switzerland) as vitamin source, KH₂PO₄ and KHPO₄ (Sigma-Aldrich) as phosphorus source, NH₄Cl (Panreac, Castellar del Vallés, Spain) as nitrogen source,

MgSO₄·7H₂O and FeSO₄·7H₂O (Sigma-Aldrich) as mineral sources, CaCO₃ (Sigma-Aldrich) as pH buffer, and cysteine (Sigma-Aldrich) as reducing agent.

Therefore, fermentation media used in this study consisted on cheese whey supplemented with one or more of the above-mentioned substances at different concentrations. For fermentation experiments, 3 mL of inoculum were added to 97 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 80 °C and 100 rpm in an Infors HT Minitron orbital shaker (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) during 92 h. All experiments were performed in triplicate.

Fermentation media (before inoculation), bottles, control instruments and any material in contact with microorganisms susceptible to contamination were autoclaved for 15 min at 121 °C. The only exceptions were MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O and cysteine, which were added to the fermentation media as solutions filtered through syringe nylon filters with 0.20 µm pore size and 25 mm diameter (Auxilab SL, Beriáin, Spain). It was experimentally observed that cheese whey must be autoclaved before the inoculation of *C. beijerinckii*, regardless whether the whey has been previously pasteurised or nanofiltered, since lactic acid bacteria can survive these latter processes and inhibit ABE fermentation.

6.2.3. Analytical methods

Periodic samples were collected from the fermentation bottles using aseptic techniques to determine lactose and metabolite concentration. Samples were centrifuged at 5.000 rpm in a refrigerated microcentrifuge for 5 min. The supernatant was filtered through a 0.20 µm filter and analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). Acetone, butanol, ethanol, acetic acid and butyric acid were determined by GC using an Agilent 7890 GC equipped with a flame ionization detector (FID) and using a column HP Innowax 30 m x 0.530 mm, 1.00 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Lactose and lactic acid were determined by an Agilent LC1200 HPLC equipment with a refractive index detector and an Aminex HPX-87-H column (Bio-Rad, Hercules, California, USA), where the mobile phase was 5 mM H₂SO₄.

Fermentation yields and productivity were calculated at the end of each run. Fermentation yield ($Y_{i/L}$, g/g) was calculated as the ratio between the metabolite (i) produced and lactose consumed. The metabolite productivity rate (W_i , g/(L·h)) was calculated as the ratio of metabolite (i) expressed in concentration (g/L) and the time of fermentation (h).

6.2.4. Statistical analyses

For the optimization step, experimental designs, such as Plackett-Burman and Response Surface Methodology (RSM) were generated and interpreted with the software Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA). Comparisons among treatments were assessed with a one-way ANOVA and the Tukey HSD test using the software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA); differences were considered significant when $p < 0.05$.

6.3. Results and Discussion

6.3.1. Optimization of nutrient supplements in cheese whey

In the first place, it was necessary to figure out which additional nutrients were essential for a correct ABE fermentation with cheese whey. It must be noted that the optimal nutrient content and fermentation parameters depend on the specific cheese whey used, since whey chemical composition varies among cheese factories. In order to select those relevant compounds, a Plackett-Burman experimental design was performed with the independent variables and value ranges shown in Table 6.2. Twelve experiments were performed in which the composition of the fermentation media was different in each run and was a combination of the conditions given in Table 6.2. The variable Initial lactose in whey refers to the concentration of lactose in whey after diluting with water (since nanofiltered whey had a too high lactose content). The variable Added lactose represents the addition of commercial lactose to the fermentation media. The response variables (i.e. the dependent variables) analysed in every experiment were butanol concentration (g/L), $Y_{B/L}$ (g/g) and consumed lactose (%), after 92 h of fermentation.

Table 6.2. Independent variables included in the Plackett-Burman experimental design with their respective minimum and maximum values, and effects of each independent variable on the three response variables. Note: Asterisks indicate a significant effect ($p < 0.05$).

Independent variables	Response variables (dependent variables). Effects.			
	Range	Butanol (g/L)	$Y_{B/L}$ (g/g)	Consumed lactose (%)
Yeast extract (g/L)	1-5	-0.302	-0.0057	1.903
FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0-0.01	2.908 *	0.0509 *	12.32
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0-0.2	0.712	0.0156	7.717
Cysteine (g/L)	0-0.5	-1.038	-0.0207	-6.893
NH ₄ Cl (g/L)	0-2.1	0.485	0.0102	10.29
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0-1	-0.525	-0.0085	0.300
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0-1	-2.158	-0.0388	-4.123
CaCO ₃ (g/L)	1-8	1.348	0.0216	11.33
Initial lactose in whey (g/L)	38-54	-0.118	-0.0103	-5.34
Added lactose (g/L)	0-15	0.742	0.0059	-3.68
Temperature (°C)	30-37	0.265	0.0089	-0.617

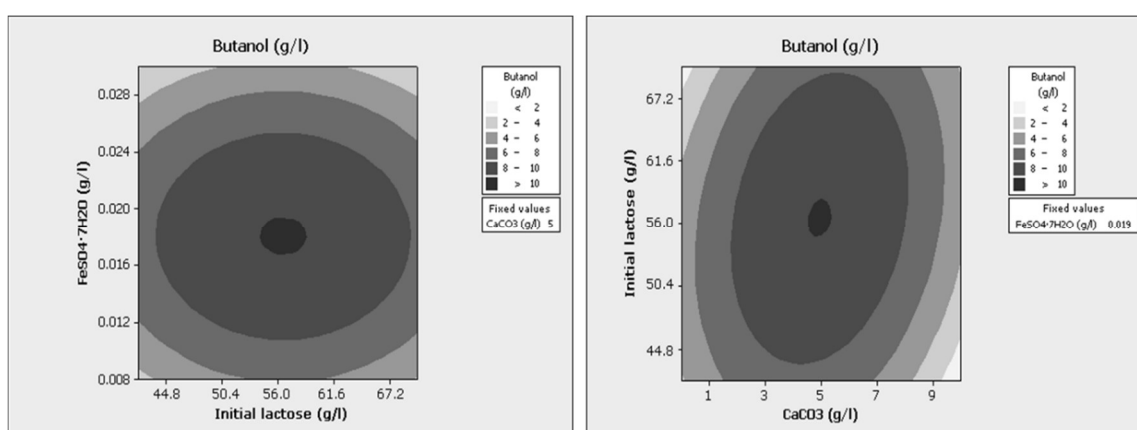
The results for butanol concentration and $Y_{B/L}$ showed parallelism. There were six independent variables with a positive effect on the response variables (FeSO₄·7H₂O, MgSO₄·7H₂O, NH₄Cl, CaCO₃, added lactose and temperature). However, the only nutrient with a significant ($p < 0.05$) effect on butanol concentration and $Y_{B/L}$ was FeSO₄·7H₂O (Table 6.2). All those nutrients with a negative effect (yeast extract, cysteine, K₂HPO₄, KH₂PO₄) were considered to be detrimental for the ABE process, and they were therefore set at the lower values of their ranges for the subsequent experiments. The effects on the variable Consumed lactose were slightly different, since this variable is more dependent on the initial lactose concentration.

The following step consisted on an RSM experiment where only three variables were optimized, whereas the others were kept at fixed values, according to Table 6.3.

Tabla 6.3. Conditions of the RSM experiment. In the case of the RSM variables, axial values are indicated.

RSM variables		Fixed parameters			
CaCO ₃ (g/L)	0-10	Yeast extract (g/L)	1	K ₂ HPO ₄ (g/L)	0
Initial lactose (g/L)	42-70	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.2	KH ₂ PO ₄ (g/L)	0
FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.008-0.03	NH ₄ Cl (g/L)	2.1	Cysteine (g/L)	0

The number of variables to be optimized was reduced to three in order to simplify the process, and they were chosen according to the sign and value of their effects in the Plackett-Burman test. The RSM design had 20 experiments and included 8 cube points, 6 central points and 6 axial points ($\alpha=1.68179$). The initial lactose concentration in each experiment was obtained by diluting the nanofiltered whey with distilled water. The fermentation was performed at 35 °C during 92 h, and the studied responses were butanol concentration and $Y_{B/L}$. It was decided to prioritize butanol concentration and, according to the RSM mathematical estimations, an optimal of 10.09 g/L butanol would be theoretically obtained when 5.35 g/L CaCO₃, 56.7 g/L initial lactose and 0.019 g/L FeSO₄·7H₂O are used. Contour plots can be seen in Figure 6.1.

**Figura 6.1.** Contour plots for butanol production in the RSM experimental design.

Therefore, the final composition of the whey was established as follows: an initial concentration of lactose at 57 g/L (obtained by dilution with water), and the addition of

1 g/L yeast extract, 5 g/L CaCO₃, 0.019 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O and 2.1 g/L NH₄Cl.

To validate the RSM model, a fermentation was performed in triplicate at 35 °C and using the optimized composition of the whey (lactose initial concentration and nutrient addition). After 92 h of fermentation, 9.11 ± 0.66 g/L butanol, 1.44 ± 0.24 g/L acetone, 0.13 ± 0.01 g/L ethanol, 1.47 ± 0.14 g/L acetic acid and 1.12 ± 0.06 g/L butyric acid were recorded. The consumption of lactose attained 48.5 ± 4.2%, the Y_{B/L} yield was 0.3105 ± 0.0081 g/g and the productivity rate WB were 0.0979 ± 0.0071 g/L·h. Concentrations of butanol and ABE solvents ranging from 5.2 to 8.1 g/L and 8.5 to 11.3 g/L, respectively, have been reported by different authors (Ennis and Maddox, 1985; Qureshi and Blaschek, 2001; Qureshi and Maddox, 2005) under batch conditions at 50 g/L of lactose and using *C. acetobutylicum*.

6.3.2. Effect of initial lactose concentration on Y_{B/L} yield and lactose consumption

Although butanol concentrations were satisfactory when using the optimized supplemented whey described in Section 6.3.1, lactose consumption was not very high. Depending on the particular circumstances and the industrial objectives, and given the polluting nature of cheese whey (especially regarding COD), it could be desirable to maximize lactose consumption by microorganisms instead of prioritizing high butanol productions. This can be made by reducing initial lactose concentrations; however, too low lactose concentrations hinder the solventogenesis phase (Welsh and Veliky, 1986).

In order to find a compromise between lactose consumption and the feasibility of ABE fermentation, four different initial lactose concentrations were tested (30 g/L, 40 g/L, 50 g/L and 60 g/L, obtained by dilution of the nanofiltered whey), maintaining the addition of supplementary nutrients established in Section 6.3.1. (1 g/L yeast extract, 5 g/L CaCO₃, 0.019 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O and 2.1 g/L NH₄Cl). The samples were fermented during 92 h, providing the results shown in Table 6.4.

Tabla 6.4. Fermentation results for different initial lactose concentrations. Note: For the dependent variables marked with an asterisk (*) some letters are given between brackets, which are related to the results of the ANOVA. If two treatments share one of the letters, there are no significant differences between treatments (i.e. between initial lactose concentrations); if they do not have any letter in common, there are significant differences ($p < 0.05$) between treatments. In the case of those dependent variables without an asterisk, no significant differences appeared between treatments.

Dependent variables	Initial lactose concentration (g/L)			
	30	40	50	60
Acetone (g/L)	1.01 ± 0.22	1.19 ± 0.13	1.27 ± 0.33	1.69 ± 0.33
Butanol (g/L)	8.51 ± 0.17	8.91 ± 0.48	8.47 ± 1.21	9.15 ± 2.32
Ethanol (g/L)	0.12 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.03
Acetic acid (g/L) *	0.69 ± 0.06 (a)	1.15 ± 0.09 (b)	1.24 ± 0.18 (b)	1.64 ± 0.22 (c)
Butyric acid (g/L)	1.44 ± 0.34	1.01 ± 0.15	0.98 ± 0.15	1.28 ± 0.23
Lactose consumption (%) *	86.8 ± 5.4 (a)	52.2 ± 4.1 (b)	52.0 ± 9.0 (b)	50.7 ± 12.8 (b)
$Y_{B/L}$ (g/g) *	0.328 ± 0.018 (a)	0.428 ± 0.019 (b)	0.327 ± 0.011 (a)	0.301 ± 0.006 (a)
W_B (g/L·h)	0.093 ± 0.002	0.097 ± 0.005	0.092 ± 0.013	0.099 ± 0.025

Lactose consumption was significantly larger (86.8%) when the initial lactose concentration was at its lowest level (30 g/L); whereas the best $Y_{B/L}$ yields were obtained for initial lactose concentrations of 40 g/L, attaining a value of 0.428 g/g, which is considerably high, since the theoretical $Y_{B/L}$ value is 0.41 g/g for lactose (Napoli, 2009). As Madihah *et al.* (2001) concluded, limited nitrogen concentrations or low carbon/nitrogen ratios result in better yields and productivities. A higher lactose content in the medium increases fermentation time and reduces lactose exploitation, therefore reducing solvent product rates. In addition, an increase in the production of acetic acid was observed with the increase in the initial value of lactose concentration (Table 4). The production of metabolites (acetone, butanol, ethanol, acetic acid and butyric acid) is directly related to lactose utilisation due to the stoichiometry of the reaction. Initial lactose concentrations also affected A: B: E ratios. Hence, the following ratios were calculated: 8:71:1 for 30 g/L, 9:66:1 for 40 g/L, 10:64:1 for 50 g/L and 12:64:1 for 60 g/L. These values are similar to those reported in literature for whey but vary significantly from those traditionally reported when using glucose as a substrate (ABE ratio of 6:3:1)

(Qureshi and Blaschek, 2001). In fact, Bahl *et al.* (1986) also obtained variations in these ratios by altering nutritional factors affecting growth conditions.

6.4. Conclusions

Nutrient addition and optimization are essential when subjecting cheese whey to ABE fermentation. This optimization must be performed with each type of whey, since its composition and fermentation suitability differ depending on the cheese manufacturer. Experimental design methodologies, like Plackett-Burman and RSM, can simplify the optimization process and provide reliable results. In addition, lactose consumption and $Y_{B/L}$ yield can be maximized and yet without a loss in butanol concentration.

Acknowledgements

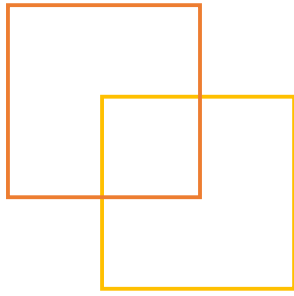
Authors are grateful to ITACyL (Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León) for financial support. MH-V is supported by a postdoctoral contract (DOC-INIA, grant number DOC 2013-010) funded by the Spanish Agricultural and Agrifood Research Institute (INIA) and the European Social Fund. Authors thank Raquel Antón and Nuria del Castillo for their technical help during the experiments.

References

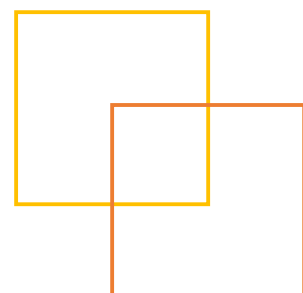
- Alam S., Stevens D., Bajpai R., 1988, Production of butyric acid by batch fermentation of cheese whey with *Clostridium beijerinckii*, *Journal of Industrial Microbiology*, 2, 359–364.
- Bahl H., Gottwald M., Kuhn A., Rale V., Andersch W., Gottschalk G., 1986, Nutritional factors affecting the ratio of solvents produced by *Clostridium acetobutylicum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 169–172.
- Ennis B.M., Maddox I.S., 1985, Use of *Clostridium acetobutylicum* P262 for production of solvents from whey permeate, *Biotechnology Letters*, 7, 601–606.
- Ergüder T.H., Tezel U., Güven E., Demirer G.N., 2001, Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors, *Waste Management*, 21, 643–650.
- 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.C., Qureshi N., Blaschek H.P., 2013, Microbial production of a biofuel (acetone–butanol–ethanol) in a continuous bioreactor: impact of bleed and simultaneous product removal, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 109–116.
- Jones D.T., Woods D.R., 1986, Acetone-butanol fermentation revisited, *Microbiological Reviews*, 50, 484–524.
- Madiah M.S., Ariff A.B., Sahaid K.M., Suraini A.A., Karim M.I.A., 2001, Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 567–576.
- Meesukanun K., Satirapipathkul C., 2014, Production of acetone-butanol-ethanol from cassava rhizome hydrolysate by *Clostridium saccharobutylicum* BAA 117, *Chemical Engineering Transactions*, 37, 421-426
- Napoli F., 2009, Development of an integrated process for butanol production, PhD Thesis, Università di Napoli Federico II. <http://www.fedoa.unina.it/4273/1/Fabio_Napoli.pdf> accessed 08.10.2015.
- Napoli F., Olivieri G., Russo M.E., Marzocchella A., Salatino P., 2010, Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a continuous packed bed reactor, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 603–608.
- Pisano I., Agrimi G., Grosso G., Mena M.C., Ricci M.A., Palmieri L., 2015, Improved *Saccharomyces cerevisiae* growth on cheese whey by controlling enzymatic lactose hydrolysis, *Chemical Engineering Transactions*, 43, 637-642
- Qi B., Chen X., Yi S., Wan Y., 2014, Inhibition of cellulase, β -glucosidase, and xylanase activities and enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by acetone-butanol-ethanol fermentation products, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 33, 497–503.
- Qureshi N., Blaschek H.P., 2001, Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping, *Renewable Energy*, 22, 557–564.
- Qureshi N., Maddox I.S., 2005, Reduction in butanol inhibition by perstraction: utilization of concentrated lactose/whey permeate by *Clostridium acetobutylicum* to enhance butanol fermentation economics, *Food and Bioproducts Processing*, 83, 43–52.
- Welsh F.W., Veliky I.A., 1984, Production of acetone-butanol from acid whey, *Biotechnology Letters*, 6, 61–64.

Welsh F.W., Veliky I.A., 1986, The metabolism of lactose by *Clostridium acetobutylicum*.
Biotechnology Letters, 8, 43-46.



7. In situ two-stage gas stripping for the recovery of Butanol from Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation broths



In situ two-stage gas stripping for the recovery of Butanol from Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation broths

Abstract

*Separation and purification of butanol from Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation broths is one of the main challenges related to the implementation of butanol biorefineries from agrofood wastes. Due to the great energy consumption of conventional solvent recovery technologies, it is essential to find more environmentally friendly and economically viable techniques. In this work, two-stage gas stripping was assessed as an ecoefficient butanol recovery technique. Firstly, in a one-stage stripping unit, three working variables (feed temperature, gas flow and refrigeration temperature) were optimized via response surface methodology (RSM) to increase simultaneously butanol selectivity (α_B) and butanol recovery efficiency (η_B). After one-stage simple gas stripping optimization ($T_{\text{feed}} = 60\text{ }^\circ\text{C}$, Gas flow = 1.34 L/min, $T_{\text{refrigeration}} = 5\text{ }^\circ\text{C}$ and $t = 4\text{ h}$), values of $\alpha_B = 11.08 - 13.95$ and $\eta_B = 59 - 67\%$ were reached, with a butanol concentration in the condensate of 119 g/L (141 g/L ABE). These working conditions were applied to two-stage gas stripping, and a butanol concentration of 300-360 g/L was attained in the condensate of the second stripping, reaching a butanol selectivity (α_B) of 7 - 8 and a butanol recovery (η_B) of 70 - 80%. This process could significantly reduce energy consumption in the final butanol purification process. In addition, the resistance of the ABE fermentation strain *Clostridium beijerinckii* CECT 508 to this technique was assessed by subjecting the microorganism to various in situ gas stripping processes under fed-batch conditions employing cheese whey as a substrate. Bacteria were negatively affected by the stripping process, due to the high T_{feed} (60 °C) but they were able to recover and produce butanol again.*

Keywords: gas stripping, butanol, ABE fermentation, *Clostridium beijerinckii*, response surface methodology.

Díez-Antolínez R, Hijosa-Valsero M, Paniagua-García AI, 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. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.062

The edition of this manuscript was in accordance with the scientific journal requirements.

7.1. Introduction

Biobutanol is not only an important commodity with capacity as a platform chemical. Moreover, butanol is an advanced biofuel which overcomes most of the limitations of ethanol as a biofuel. In this line, butanol has higher energy content, lower volatility, lower hygroscopicity and it is less corrosive than ethanol (Taconi *et al.*, 2009). It could be even directly used in current internal combustion engines without any modification. However, until now, ABE fermentation, the most common process to produce biobutanol, is not economically competitive with petrochemical processes (Kumar and Gayen, 2011). The high cost of traditional food feedstocks, together with the low titer, yield and volumetric productivity of butanol in fermented broths, solvent toxicity and the high cost of solvent recovery processes compromise its economic feasibility (Green, 2011).

To decrease the feedstock cost, the utilization of agrofood wastes with high polluting potential is of great relevance. Interesting substrates for ABE fermentation are cheese whey and cheese whey permeate (CWP) (Diez-Antolinez *et al.*, 2016). On the other hand, integrated fermentation with in situ product recovery is an effective way to reduce ABE fermentation energy costs (Xue *et al.*, 2012; 2014a). Among butanol recovery methods, gas stripping has some advantages such as an easy operation, simple scale-up, low capital investment and low energy cost (Kumar and Gayen, 2011; Xue *et al.*, 2013, 2014a). However, gas stripping typically removes large amounts of water in the butanol stream and requires a high energy input due to its lower selectivity in comparison with other recovery techniques (Qureshi *et al.*, 2005). To improve gas stripping efficiency, coupling gas stripping to broths with butanol concentrations higher than 8 g/L; concentration at which the condensate vapor has a butanol concentration higher than its solubility in water (7.7%, w/w) - increases butanol concentration in the organic phase of the condensate (Chen *et al.*, 2014).

In this study, a central composite design with three independent variables (feed temperature, gas flow and refrigeration temperature) was used to determine the optimum combination of these working conditions to maximize the response variables [butanol selectivity (α_B) and butanol recovery efficiency (η_B)]. Moreover, a two-stage gas

stripping was performed increasing significantly butanol concentration in the condensate to reduce dewatering energy consumption and improving the energetic efficiency of the overall recovery process. Besides, a simplified gas stripping unit was coupled with fermentation of cheese whey by *Clostridium beijerinckii* CECT 508 to enhance the fermentability and assess the effect of gas stripping conditions on bacterial development by performing two consecutive stripping processes on the same fermentation broth.

7.2. Material and Methods

7.2.1. Media and culture

Two different feed media solutions were tested: a) a synthetic aqueous solution containing 5 g/L acetone, 10 g/L butanol and 1.67 g/L ethanol (A:B:E, 3:6:1) and b) a real fermentation broth containing bacteria. These broths were obtained by fermenting sheep cheese whey with an initial lactose concentration of 40 g/L, using *Clostridium beijerinckii* CECT 508, as described by Díez-Antolínez *et al.* (2016).

7.2.2. Gas-stripping optimization

The gas stripping system including a double-cooling coil Dimroth condenser (400 mm length and 1,135 cm² surface area (Pobel, Madrid, Spain)) for vapour condensation, pumps and storage vessels was connected to a screw-capped bottle (1 L) (Figure 7.1). The gas flow was controlled by a manually adjustable rotameter (Key Instruments, Brooks Instruments, Hatfield, PA, USA). The feed solution consisted of a 500-mL aqueous solution (5 g/L acetone, 10 g/L butanol, 1.67 g/L ethanol) placed in a 1-L glass bottle containing a magnetic stirrer. The bottle was closed with a special cap which enabled the entrance of a temperature probe, a submerged metal stone diffuser for the entrance of the stripping gas and a stripping gas exit over the surface of the solution. The bottle was placed on a heating-stirring plate with controllable temperature. The whole gas circuit was purged during 2 min with industrial N₂ to replace atmospheric air. Then, the gas flow was fixed with a rotameter and the internal N₂ was continually recirculated with a pump. The refrigeration temperature of the condensation system was controlled with a thermostat LAUDA Integral T 2200 using a monoethylene glycol/water mixture

(LAUDA, Lauda-Königshofer, Germany). After 15 min of stabilization, the gas stripping experiment was started. For each experimental run, the duration of the stripping was initially fixed in 18 h.

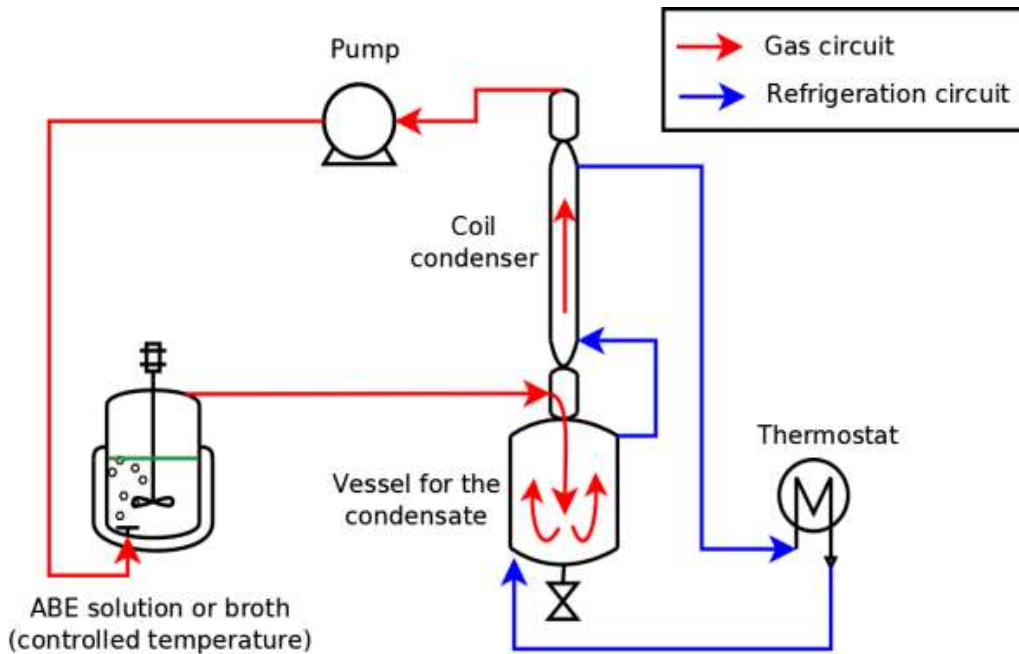


Figura 7.1. Setup diagram of the gas stripping system used in the experiments

A central composite design with three independent variables (feed temperature, gas flow and refrigeration temperature) was used to determine the optimum combination of these working conditions to maximize the response variables (butanol selectivity (α_B) and butanol recovery efficiency (η_B)). The RSM design had 20 experiments and included 8 cube points, 6 central points and 6 axial points ($\alpha=1.68179$). The responses measured for each trial were introduced in the model to obtain three-variable quadratic polynomial regression equations to estimate the response variables. These equations were used to mathematically determine the values of the three independent variables (T feed, Gas flow and T refrigeration) which maximized the response values (butanol selectivity and butanol recovery). The response variables were calculated according to Equations (1) (Lu *et al.*, 2016) and (2), respectively:

$$\alpha_{i/j} = \frac{x_i y_j}{x_j y_i} \quad (\text{ec. 7.1})$$

$$\eta_i = \frac{m_{iC}}{m_{iF}} \times 100 \quad (\text{ec. 7.2})$$

where α_i is the selectivity for metabolite i , x_i is the mass ratio of metabolite i in the feed solution, y_i is the mass ratio of metabolite i in the condensate, η_i is the percentage recovery efficiency for metabolite i , m_{iC} is the mass of metabolite i in the condensate (expressed in g) and m_{iF} is the mass of metabolite i in the feed solution.

The final output of the RSM is an equation for each response variable, which is used to estimate the most adequate values for the independent variables to maximize α_B and η_B . The estimated optimal working conditions were experimentally validated with a synthetic aqueous solution and with a real fermentation broth. Moreover, the effect of gas stripping on bacteria was assessed by performing two consecutive stripping processes separated by a resting fermentation period where bacteria were kept at fed-batch conditions. The optimal working conditions calculated with the RSM equations were experimentally validated at various operation times (4 – 18 h). Besides, alternative feed temperatures (35 °C) suitable for bacteria were also tested.

7.2.3. Two-stage gas-stripping

A second-stage gas stripping was applied to further concentrate butanol from the aqueous phase formed in the condensate collected from the first-stage gas stripping. The condensate obtained in the first-stage, with an organic phase consisting of ~ 60% (w/w) butanol was stored and the aqueous phase with ~ 8% (w/w) butanol was subjected to gas stripping again under the working conditions optimized according to section 7.2.2.

7.2.4. Fed-batch fermentation system coupled with gas-stripping

The best working conditions obtained with the synthetic aqueous medium were tested with a fermentation broth. The feed solution was a 500-mL fermented cheese whey sample containing 0.40 g/L residual lactose, 3.02 g/L acetone, 12.04 g/L butanol, 0.23 g/L ethanol, 0.99 g/L acetic acid and 1.15 g/L butyric acid, with a bacterial density of $7 \cdot 10^8$ cell/mL. The gas stripping started as explained in 7.2.2. A stripping time of 4 h was the most suitable from preliminary tests. Additionally, the effect of gas stripping conditions on *C. beijerinckii* CECT 508 was assessed. After a first stripping cycle, distilled

water and lactose were added to the fermentation to guarantee a total volume of 500 mL and a lactose concentration of ~40 g/L; yeast extract (0.5 g) was also supplemented. When bacteria had reached again their stationary phase and produced ~10 g/L butanol, a second stripping cycle was performed employing the same working conditions that were used in the first cycle.

7.2.5. Analytical methods

Aqueous samples were taken from the feed bottle before and after the gas stripping process, and from the condensate after the stripping process. All volumes were measured with a graduated cylinder. Synthetic aqueous solutions and the condensate were directly analysed for ABE metabolite concentration. Samples from the real fermentation broth were centrifuged at 13,000 rpm for 3 min in a microcentrifuge (Minispin, Eppendorf, Hamburg, Germany) and their supernatant was filtered through a 0.20 μm nylon filter. Analyses by GC were carried out as described by Díez-Antolínez *et al.* (2016).

7.2.6. Statistical analyses

For the optimization step, experimental designs following the Response Surface Methodology (RSM) were generated and interpreted with the software Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

7.3. Results and Discussion

7.3.1. Gas stripping optimization

The results of the RSM model showed that the optimal working conditions to maximize butanol selectivity (α_B) and recovery efficiency (η_B) were $T_{\text{feed}} = 60\text{ }^\circ\text{C}$, gas flow = 1.34 L/min, $T_{\text{refrigeration}} = 5\text{ }^\circ\text{C}$. The estimated responses for an 18-h gas stripping were $\alpha_B = 6.29$; $\eta_B = 94.56\%$. The model was experimentally validated for various stripping times (Table 1). The results were in accordance with literature, where feed temperatures for gas stripping of 30 – 67 $^\circ\text{C}$, refrigeration temperatures from -60 to 4 $^\circ\text{C}$, and gas flow rates of 1.25 – 15 L/min have been reported (Yang and Lu, 2013; Abdehagh *et al.*, 2014). It was observed that shorter stripping times increased selectivity (α_B) without drastically reducing recovery efficiency (η_B) (Table 7.1). It must be pointed out that the shortest

stripping time (4 h) produced a condensate with a butanol concentration of 92 g/L, which is above its solubility value in water, which implies the formation of two phases (an aqueous and a butylic phase). The upper butylic phase represents about 10% of the total volume and it usually contains 500 – 680 g/L butanol; and it can be easily separated from the bottom aqueous phase, which contains 77 – 79 g/L butanol.

Tabla 7.1. Gas stripping performance indicators for a synthetic aqueous medium (5 g/L A; 10 g/L B; 1.67 g/L E) under optimal RSM conditions. Operation conditions: T feed = 60 °C, Gas flow = 1.34 L/min, T refrigeration = 5 °C. A: Acetone, B: Butanol, E: Ethanol.

Stripping time (h)	Selectivity, α			Recovery efficiency, η (%)			Concentration in condensate, (g/L)		
	A	B	E	A	B	E	A	B	E
18	1.74	3.61	3.64	41.6	84.6	87	9.41	34.71	6.34
10	3.66	5.52	5.32	59.2	86.8	86.6	19.23	51.32	9.46
4	6.28	10.36	7.74	51.3	79.8	64.2	32.55	92.14	13.69

It is worth mentioning that a feed temperature of 60 °C differs from the standard fermentation temperature of solventogenic *Clostridium* species (35 – 37 °C). Therefore, performing the gas stripping at T feed = 35 °C, keeping the other independent variables fixed (Gas flow = 1.34 L/min, T refrigeration = 5 °C), was tested with synthetic aqueous medium. However, butanol selectivity (α_B) of 4.21 – 5.71 and butanol recovery efficiencies (η_B) of 15.29 – 35.90%, depending on the stripping time, were obtained. As a result, it was decided to work at T feed = 60 °C and experimentally assess the resistance of bacteria to these conditions (see section 7.3.3).

7.3.2. Two-stage gas stripping

To further concentrate butanol from the aqueous phase generated in the condensate collected from the first-stage gas stripping, a second gas stripping stage was applied to that phase after separation. The dynamic variations of ABE concentration in the condensate and the ABE recovery percentage are shown in Figure 7.2. After 4 – 5 h, the second-stage gas stripping produced a highly concentrated condensate with 350 – 400 g/L butanol, whose butylic phase represented 61 – 66% volume and contained 477 g/L butanol. A butanol recovery higher than 80% was attained at 5 h, with an acetone recovery of 47% and an ethanol recovery of 61%. These results are in agreement with

other works which observed that solutions containing butanol concentrations near or exceeding butanol solubility in water ($\sim 7.7\%$, w/w) and subjected to gas stripping result in a significantly high concentrated butanol condensate, thus improving the energy-saving potential of gas stripping for energy-efficient dewatering technologies (Xue *et al.* 2013; 2014a,b; Chen *et al.*, 2014).

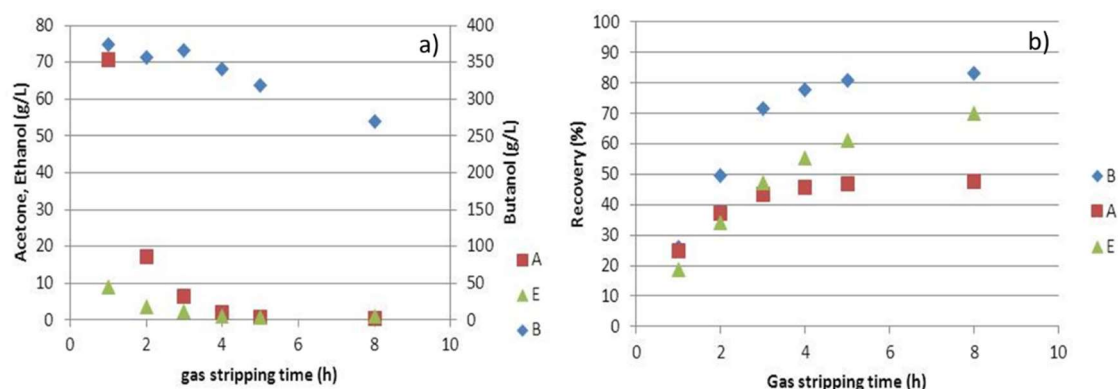


Figure 7.2. a) Dynamic evolution of ABE solvent concentration in the condensate during second-stage gas stripping; b) Dynamic evolution of ABE solvents recovery during second-stage gas stripping.

The optimal working conditions established with synthetic medium were tested with cheese whey fermentation broth. According to the previous experiments, the selected time for gas stripping was 4 h (Table 7.1). It must be noted that it was necessary to add 0.3 mL of an antifoaming agent to the solution before connecting the gas stripping. The results of this experiment are given in Table 7.2 (First stripping cycle). A good selectivity ($\alpha_B = 11.08$) and a high butanol concentration (119 g/L) were found in the condensate. Once more, this butanol concentration was above its solubility limit in water and two phases could be separated. The upper butylic phase represented 7% of the total condensate volume with concentrations of 661.5 g/L butanol, 13.4 g/L acetone and 7.6 g/L ethanol, whereas the bottom aqueous phase represented 93% of the total condensate volume and its concentrations were 77.1 g/L butanol, 14.1 g/L acetone and 2.2 g/L ethanol.

Tabla 7.2. Gas stripping performance indicators for the fermentation broth (cheese whey with *C. beijerinckii* CECT 508). Stripping conditions T feed = 60 °C, Gas flow = 1.34 L/min, T refrigeration = 5 °C, t = 4 h. Initial concentrations (1st stripping): 3.02 g/L A; 12.04 g/L B; 0.23 g/L E. Initial concentrations (2nd stripping): 4.71 g/L A; 9.63 g/L B; 0.29 g/L E. A: Acetone, B: Butanol; E: Ethanol.

Cycle N ^o	Selectivity, α			Recovery efficiency, η (%)			Concentration in condensate, (g/L)		
	A	B	E	A	B	E	A	B	E
1st stripping cycle	4.65	11.08	9.32	27.60	59.29	55.83	13.89	118.9	2.14
2nd stripping cycle	4.79	13.95	17.11	25.41	66.97	91.99	22.16	119.43	4.94

The effect of gas stripping conditions (particularly T feed = 60 °C) on bacterial development was assessed by performing two consecutive stripping processes on the same fermentation broth. Therefore, after the first 4-h stripping process, the circuit was closed and the feed was supplemented as explained in section 7.2.4. Despite the extreme temperature, bacteria could recover and produce butanol again (9.6 g/L were attained). Afterwards, a second 4-h stripping was run. Table 7.2 and Figure 7.3 show the results of these stripping/resting cycles. It was corroborated that bacteria were negatively affected by this high temperature (mortality ~ 85%) and the time to reach again the stationary phase after nutrient addition was 6 – 7 days. Nevertheless, bacteria could recover and produce butanol titers of 9.6 g/L. Under the tested conditions, stripping offered good selectivity and recovery efficiency values (α_B : 10 – 14; η_B : 59 – 80 %), for both synthetic media and fermentation broths. Butanol selectivity values of 5.6 – 23 have been reported in model solutions (Ezeji *et al.*, 2005; Yang and Lu, 2013; Qureshi *et al.*, 2014) and 4 – 31 in fermentation broths (Qureshi and Blaschek, 2001; Ezeji *et al.*, 2005). This work agrees with publications reporting condensates with 151 g/L butanol, which could be phase-separated to get an organic phase with 445 – 610 g/L butanol (Xue *et al.*, 2012; Rochón *et al.*, 2017). Others, on the contrary, reported lower butanol concentrations between 66 – 76 g/L in the condensate (Cai *et al.*, 2016).

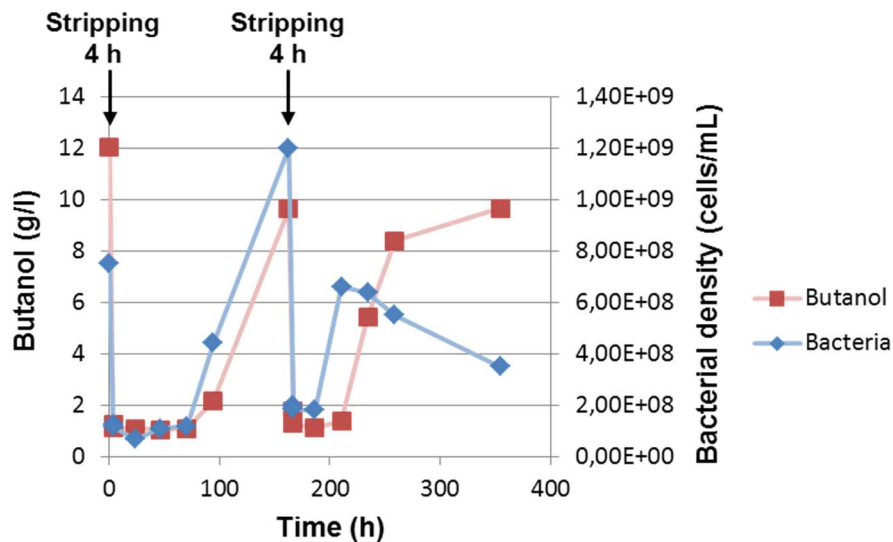


Figura 7.3. Evolution of ABE fermentation by *C. beijerinckii* in a fed-batch system with cheese whey during two gas stripping/resting cycles. Stripping conditions $T_{\text{feed}} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, Gas flow = 1.34 L/min, $T_{\text{refr}} = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 4\text{ h}$.

On the other hand, the optimal feed temperature ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) was not very appropriate for bacterial growth, and cells needed 6-7 days to recover after applying stripping. However, Xue *et al.* (2012) reported that the asporogenic mutant *C. acetobutylicum* JB200 was successfully subjected to eight gas stripping periods with six feeding cycles over 326 h, keeping butanol concentrations of 6 – 13 g/L in the broth. These data differ significantly from our results with *C. beijerinckii* CECT 508, which needs longer recovery times.

7.4. Conclusions

Process parameters of gas stripping, including feed temperature, gas flow rate and refrigeration temperature, were crucial for butanol recovery. A two-stage gas stripping process was proven as an efficient technique to obtain a highly concentrated butanol stream, attaining 350 – 400 g/L butanol in the condensate, with a concentration of 477 g/L of butanol in the organic phase. This contributes to reducing energy consumption for dewatering in a final butanol purification process. Besides, the resistance of *Clostridium beijerinckii* CECT 508 to gas stripping was assessed and, although bacteria were negatively affected by the stripping process ($T_{\text{feed}} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$), they could recover and produce butanol again.

Acknowledgments

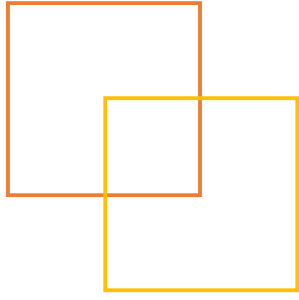
The present work was performed as part of the H2020-LCE-2015 Waste2Fuels project (Sustainable production of next generation biofuels from waste streams - GA-654623), funded by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme. MH-V is supported by a postdoctoral contract (DOC-INIA, grant number DOC 2013-010) funded by the Spanish Agricultural and Agrifood Research Institute (INIA) and the European Social Fund. Authors thank R. Antón, N. del Castillo and G. Sarmiento for their technical help.

References

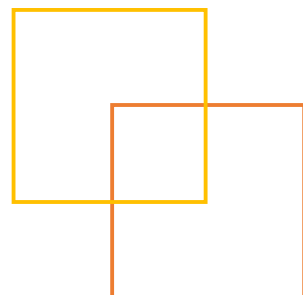
- Abdehagh N., Tezel, F.H., Thibault, J., 2014, Separation techniques in butanol production: Challenges and developments, *Biomass and Bioenergy* 60, 222-246.
- Cai D., Chen, H., Chen, C., Hu, S., Wang, Y., Chang, Z., Miao, Q., Qin, P., Wang, Z., Wang, J., Tan, T., 2016, Gas stripping–pervaporation hybrid process for energy-saving product recovery from acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation broth, *Chemical Engineering Journal* 287, 1-10.
- Chen Y., Ren H., Liu D., Zhao T., Shi X., Cheng H., Zhao N., Li Z., Li B., Niu H., Zhuang W., Xie J., Chen X., Wu J., Ying H., 2014, Enhancement of n-butanol production by in situ butanol removal using permeating–heating–gas stripping in acetone–butanol–ethanol fermentation, *Bioresource Technology* 164, 276-284.
- Díez-Antolínez R, Hijosa-Valsero M, Paniagua-García AI, 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.
- Ezeji T.C., Karcher, P.M., Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2005, Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 27, 207-214.
- Green E.M., 2011, Fermentative production of butanol: the industrial perspective, *Current Opinion in Biotechnology* 22, 1-7.
- Kumar M., Gayen K., 2011, Developments in biobutanol production: New insights, *Applied Energy* 88, 1999-2012.

- Lu K.M., Chiang Y.S., Wang Y.R., Chein R.Y., Li S.Y., 2016, Performance of fed-batch acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation coupled with the integrated *in situ* extraction-gas stripping process and the fractional condensation, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 60, 119–123.
- Qureshi N., Blaschek, H.P., 2001, Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping, *Renewable Energy* 22, 557-564.
- Qureshi N., Hughes S., Maddox I. S., Cotta M. A., 2005, Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 27(4), 215-222.
- Qureshi N., Singh, V., Liu, S., Ezeji, T.C., Saha, B.C., Cotta, M.A., 2014, Process integration for simultaneous saccharification, fermentation, and recovery (SSFR): Production of butanol from corn stover using *Clostridium beijerinckii* P260, *Bioresource Technology* 154, 222-228.
- Rochón E., Ferrari, M.D., Lareo, C., 2017, Integrated ABE fermentation-gas stripping process for enhanced butanol production from sugarcane-sweet sorghum juices, *Biomass and Bioenergy* 98, 153-160.
- Taconi K.A., Venkataramanan K.P., Johnson D.T., 2009, Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianum* ATCC® 6013™ utilizing biodiesel - derived crude glycerol as the sole carbon source, *Environmental Progress & Sustainable Energy* 28(1), 100–110.
- Xue C., Zhao, J., Lu, C., Yang, S.-T., Bai, F., Tang, I.-C., 2012, High-titer n-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in fed-batch fermentation with intermittent gas stripping, *Biotechnology and Bioengineering* 109, 2746-2756.
- Xue C., Zhao, J., Liu, F., Lu, C., Yang, S.-T., Bai, F.-B., 2013, Two-stage *in situ* gas stripping for enhanced butanol fermentation and energy-saving product recovery, *Bioresource Technology* 135, 396-402.
- Xue C., Zhao, J.-B., Chen, L.-J., Bai, F.-W., Yang, S.-T., Sun, J.-X., 2014a, Integrated butanol recovery for an advanced biofuel: current state and prospects, *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 3463-3474.
- Xue, C., Du, G. Q., Sun, J. X., Chen, L. J., Gao, S. S., Yu, Yang S.T., Bai, F. W., 2014b, Characterization of gas stripping and its integration with acetone–butanol–ethanol fermentation for high-efficient butanol production and recovery, *Biochemical Engineering Journal* 83, 55-61.

Yang S.-T., Lu, C., 2013, Extraction-fermentation hybrid (extractive fermentation), In: Separation and Purification Technologies in Biorefineries, Eds. Ramaswamy S., Huang, H.J., Ramarao, B.V., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.



8. Conclusiones/ Conclusions



Las principales conclusiones obtenidas de esta investigación sobre la “Producción eco-sostenible de biocarburantes y bioproductos a partir de suero lácteo”, se recogen a continuación:

Relativas a la producción de etanol a partir de permeado de suero lácteo industrial

1. El permeado de suero lácteo industrial concentrado es un sustrato de bajo coste idóneo para la fermentación alcohólica. Se ha identificado la cepa *K. marxianus* DSM 5422 como levadura hiperproductora de etanol utilizando permeado de suero industrial crudo altamente concentrado, frente a cepas hiperproductoras de etanol de la especie *S. cerevisiae*, como Ethanol Red®, sin la adición de costosos suplementos nutritivos.
2. La combinación de procesos fermentativos de alta y muy alta densidad junto con técnicas de inmovilización celular ha sido una exitosa aproximación a la fermentación alcohólica a partir de permeado de suero. El uso de permeado de suero bruto con concentraciones de lactosa de 170 – 190 g/L como sustrato de fermentación, en condiciones de operación optimizadas, ha permitido obtener rendimientos de fermentación del 95,5% sobre el valor teórico, con productividades superiores a 1,80 g/L·h en procesos discontinuos con microorganismos libres.
3. Se ha demostrado que la levadura *K. marxianus* DSM 5422 no sufre problemas importantes de inhibición por sustrato hasta concentraciones de lactosa en el permeado de suero superiores a 230 g/L, aunque el límite de concentración de trabajo se debe establecer en 190 g/L para evitar reducciones drásticas de la productividad.
4. La levadura *K. marxianus* DSM 5422 fue inmovilizada con éxito por atrapamiento en esferas de alginato a escala de laboratorio durante 12 días (288 horas) para fermentar suero industrial concentrado. Se obtuvieron concentraciones medias de etanol de 83,2 g/L, una productividad de etanol de 1,60 g/L·h y un rendimiento de fermentación del 83,2%.

5. La adsorción de la levadura *K. marxianus* DSM 5422 sobre soportes inertes, utilizando permeado de suero industrial concentrado no suplementado como sustrato, fue eficaz y estable, con rendimientos de fermentación superiores al 90%, alcanzando concentraciones finales de etanol en el caldo del 6% (v/v) con un aprovechamiento total de la lactosa en cortos periodos de fermentación (44 horas), prolongados en procesos discontinuos repetitivos durante más de 40 días (> 1.000 horas).
6. Entre los desafíos de este proceso destacan las bajas concentraciones finales de etanol en el caldo, la baja tolerancia osmótica de las levaduras y los prolongados tiempos de operación. Será necesario evaluar el desarrollo y rendimiento de la configuración de fermentación planteada en procesos continuos en reactores de biopelícula a escala experimental y demostrativa.

Relativas a la producción de butanol a partir suero lácteo de oveja

7. En el caso de la fermentación ABE, se ha comprobado que la adición y la optimización del aporte de nutrientes al lactosuero son esenciales cuando se utilizan cepas comerciales no modificadas genéticamente, como *C. beijerinckii* CECT 508. El uso de herramientas de diseño experimental como Plackett-Burman y MSR permite la optimización de estos procesos. Se han conseguido mediante diseño experimental rendimientos producto-sustrato ($Y_{B/L}$) cercanos al teórico con producciones de butanol de 8,9 g/L, utilizando lactosuero con concentraciones de lactosa de 40 g/L.
8. La recuperación por gas-stripping en dos etapas es una técnica eficiente de recuperación de butanol, que permite obtener concentraciones de 350 – 400 g/L de butanol en el condensado y 477 g/L de butanol en la fase orgánica, lo que reduce los costes de deshidratación.
9. Aunque la bacteria *C. beijerinckii* CECT 508 se ve negativamente afectada por el proceso de gas-stripping cuando se trabaja a temperaturas de alimentación

elevadas, tiene la capacidad de recuperarse y producir nuevamente butanol. Con este trabajo se ha conseguido producir butanol en procesos discontinuos con buenos rendimientos.

10. En futuras investigaciones será necesario avanzar hacia configuraciones de fermentación continuas con inmovilización bacteriana en reactores de biopelículas integrados con recuperación *in situ* de solventes mediante gas-stripping en dos fases para mejorar la productividad global de la fermentación ABE, a escala experimental y demostrativa.

The main conclusions obtained from this research related to the “Eco-sustainable production of biofuels and bioproducts from whey” are summarized below:

Regarding the production of ethanol from industrial whey permeate

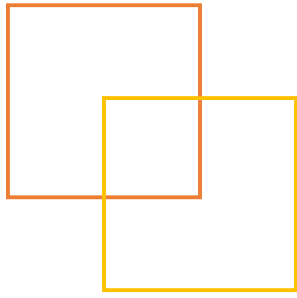
1. High lactose-loaded industrial whey permeate is a suitable low-cost substrate for alcoholic fermentation. *K. marxianus* DSM 5422 has been identified as a hyperproductive ethanol yeast strain using high-lactose loaded industrial cheese whey permeate (CWP) in comparison to hyperproductive strains of the species *S. cerevisiae*, as Ethanol Red®, without the addition of high-cost nutritional supplements.
2. The combination of high and very-high-gravity (HG/VHG) fermentative processes with cell immobilization techniques has been a successful approach to alcoholic fermentation from cheese whey permeate. The use of raw CWP with lactose concentrations between 170 and 190 g/L as fermentation substrate, under optimized operating conditions, provided fermentation yields of 95.5% over the theoretical value, with a productivity higher than 1.80 g/L·h in conventional discontinuous fermentation.
3. It has been shown that the yeast *K. marxianus* DSM 5422 suffers serious substrate inhibition problems with lactose concentrations in whey permeate above 230 g/L, although the limit of the working concentration should be set at 190 g/L to avoid drastic reductions in productivity.
4. Immobilization of *K. marxianus* by entrapment in alginate spheres, optimized by Response Surface Methodology (RSM), has been validated in continuous processes at laboratory scale for 12 days (288 hours) with good performance results. Average ethanol productions of 83.2 g/L, ethanol productivities of 1.60 g/L·h and fermentation yields of 83.2% have been reported.
5. The adsorption of the yeast *K. marxianus* DSM 5422 on inert supports, using non-supplemented high lactose-loaded CWP, was effective and stable. Fermentation yields greater than 90% were obtained, with titers of ethanol of 6% (v/v) and a

total use of lactose in short fermentation periods (44 hours) in repetitive discontinuous processes, prolonged for more than 40 days (> 1,000 hours).

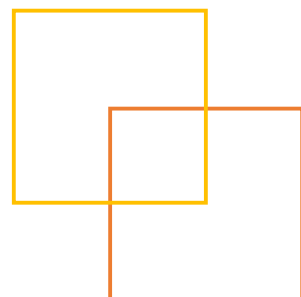
6. The main challenges of ethanol fermentation are the low final titer of ethanol in the broth, the low osmotic tolerance of yeasts and the long operating times. It will be necessary to evaluate the development and performance of the proposed fermentation configuration in continuous processes in biofilm reactors at experimental and demonstrative scale.

Regarding the production of butanol from sheep whey

7. In the case of ABE fermentation, it has been proven that the addition and optimization of the nutrient intake to the whey are essential to improve ABE fermentation with commercial non-genetically modified strains, such as *C. beijerinckii* CECT 508. The use of experimental design tools such as Plackett-Burman and RSM allows the optimization of these processes. Product-substrate yields ($Y_{B/L}$) close to the theoretical value were obtained thanks to the experimental design, with butanol titers of 8.9 g/L, using wheys with lactose concentrations of 40 g/L.
8. The recovery by gas-stripping in two stages is an efficient technique to recover butanol in line with the fermentation processes obtaining high concentrated streams of 350 – 400 g/L of butanol in the condensate and 477 g/L of butanol in the organic phase.
9. Although *C. beijerinckii* CECT 508 bacteria were negatively affected by gas-stripping working at high temperatures in the feeding stream, the microorganism was capable of recovery and kept butanol production.
10. In future research, it will be necessary to move towards continuous fermentation configurations with bacterial immobilization in integrated biofilm reactors with in line solvent recovery by gas-stripping in two phases to improve the overall productivity of ABE fermentation, at experimental and demonstrative scale.



9. Anexos

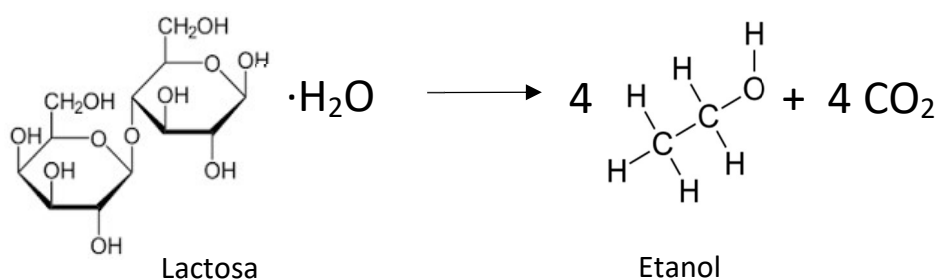


Anexo I. Estequiometría de las fermentaciones alcohólica y ABE

Al final de cada experimento, se calcularon los parámetros cinéticos de la fermentación. Aunque estos parámetros cinéticos no describen el proceso global, se utilizan de modo generalizado para hacer una aproximación a la evaluación del proceso; asumiendo que, a una mayor tasa de consumo inicial de sustrato, el sistema desarrollaría una mejor velocidad de reacción, que repercutiría en tiempos más cortos del proceso general.

Fermentación Alcohólica

Para la fermentación alcohólica, el mecanismo de fermentación simplificado a partir de lactosa es:



Partiendo del mecanismo de reacción para la producción de etanol, el rendimiento teórico de etanol en la fermentación se calcula de acuerdo a la ecuación:

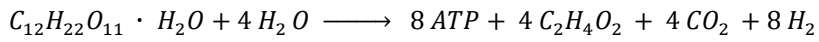
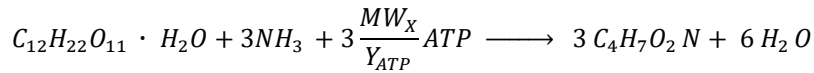
$$\frac{1 \text{ mol } C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O}{342,3 \text{ g } C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O} \times \frac{4 \text{ mol } CH_3CH_2OH}{1 \text{ mol } C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O} \times \frac{46,02 \text{ g } CH_3CH_2OH}{1 \text{ mol } CH_3CH_2OH} = 0,538 \frac{\text{g } CH_3CH_2OH}{\text{g } C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O}$$

Fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE)

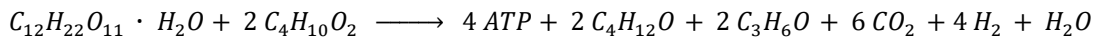
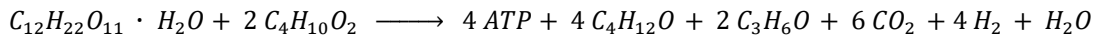
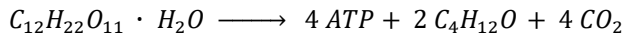
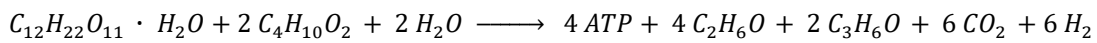
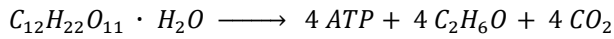
La conversión de la lactosa en compuestos ABE mediante el metabolismo microbiano de algunas especies de *Clostridium* es un proceso complejo. Sin embargo, las ecuaciones estequiométricas del proceso de conversión de la lactosa se pueden obtener de la suma de todas las etapas enzimáticas individuales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

Las principales reacciones que tienen lugar en el proceso son (Napoli, 2009):

Fase de Acidogénesis:



Fase de Solventogénesis:



El rendimiento del proceso de bioconversión de la lactosa en butanol es bajo, con un valor teórico en torno a 0,41 gbutanol/gsustrato.

Referencias:

Napoli F. Development of an integrated process for butanol production. Dottorato in Scienze Biotecnologiche- XXII ciclo Indirizzo Biotechnologie Industriali. 2009. University of Napoli Federico II.

Anexo II. Diseño Experimental

Metodología de Superficie de Respuesta

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es una combinación de análisis de regresión y diseño experimental, introducida por Box y Wilson en 1951. Se define como un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y tratar problemas en los que una respuesta de interés está influenciada por varios factores de carácter cuantitativo. Es una estrategia para el diseño experimental, mediante una experimentación secuencial y modelación de los resultados experimentales para determinar un modelo matemático que conduce a la localización de condiciones óptimas de operación para las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen ciertas restricciones en la/s variable/s respuesta/s.

El diseño de superficie de respuesta planteado en este trabajo para todos los casos en los que se aplica la metodología de superficie de respuesta (Capítulos 4, 5, 6 y 7) es un diseño central compuesto (DCC) con $2^K + 2K + 6$ experimentos, donde K es el número de factores. El DCC está formado por los siguientes tres términos: 1) una porción factorial no replicada con dos niveles para cada factor (2^K); 2) un conjunto de puntos axiales constituidos por experimentos idénticos al punto central, excepto por un factor, que asume valores por debajo y por encima de la mediana de los dos niveles factoriales ($2K$); 3) un punto central replicado 6 veces para mejorar la precisión experimental (6 experimentos). Los puntos axiales y centrales permiten experimentos con tres niveles para cada variable independiente. Los niveles son $-\alpha$, 0, α (donde α es la distancia del origen al punto axial en unidades codificadas), pudiéndose estimar de este modo los coeficientes cuadráticos. El valor de α equivale a $\alpha = n_F^{1/4}$, donde n_F es el número de puntos en el diseño factorial.

Generalmente, la relación entre las respuestas y las variables independientes no es conocida y no es lineal, por lo que se requiere de un modelo más complejo que aproxime la relación funcional entre las respuestas (Y) y los factores independientes (x_i). Las respuestas se ajustan a un modelo cuadrático para estimar la respuesta de cada factor con respecto al resto de factores independientes, de acuerdo con la ecuación:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^K b_i x_i + \sum_{i=1}^K b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{K-1} \sum_{j=1}^K b_{ij} x_{ij} + \varepsilon \quad (\text{ec. A.II.1})$$

donde Y es el valor de la respuesta experimental; b_0 es el coeficiente de intercepción; b_i , b_{ii} y b_{ij} son coeficientes constantes para los efectos lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente; x_i es cada variable independiente (i) y ε es el error aleatorio.

Una vez que el polinomio de segundo orden ha sido ajustado a la respuesta, se examina la forma de las curvas de superficie de respuesta y se determinan los máximos, los mínimos o los puntos de silla que se encuentran en la región experimental seleccionada. Para ello, se realiza un análisis canónico del modelo polinómico cuadrático predicho en un enfoque matemático que permite ubicar el punto estacionario de la superficie de respuesta y determinar si representa un punto máximo, mínimo o de silla de montar.

Para ello, el polinomio de aproximación de segundo orden se escribe de modo matricial:

$$\hat{Y} = b_0 + x' + x' B x \quad (\text{ec.A.II.2})$$

donde el vector b está formado por los coeficientes de la parte lineal (efectos principales) y la matriz B está formada por los coeficientes correspondientes a las interacciones y los términos cuadráticos puros.

El máximo se calcula resolviendo el sistema dado por:

$$\frac{d\hat{Y}}{dx} = b + 2Bx \quad (\text{ec. A.II.3})$$

El punto estacionario está dado por:

$$x_s = -\left(\frac{1}{2}\right) B^{-1} b \quad (\text{ec. A.II.4})$$

El análisis de varianza (ANOVA), la falta de ajuste y la importancia de la ecuación del modelo se evalúan mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el valor p de la prueba F. La prueba de significación estadística se basó en los criterios de error total con un nivel de confianza del 95.0%. Cuanto más pequeño es el valor p, mayor es la importancia del coeficiente correspondiente. La importancia de los factores y sus efectos también se explica por la magnitud y el signo de los coeficientes. Los niveles óptimos de valores independientes se analizaron utilizando la función de deseabilidad.

Diseños de Plackett-Burman

El diseño de Plackett-Burman (PB) es un diseño de barrido o “screening”, que permite identificar los principales factores al principio de la fase de experimentación, cuando no se dispone de un conocimiento completo sobre el sistema. Es una metodología muy eficiente para identificar un elevado número de factores con el menor número posible de experimentos (Plackett y Burman, 1946).

En este diseño, cada factor se coloca a dos niveles y el número de experimentos debe ser múltiplo de 4. Las variables pueden ser cualitativas o cuantitativas. Los niveles se denominan -1 y +1, escribiéndose de modo simplificado como (-) y (+). Para la construcción de la matriz para este diseño, la primera línea de signos viene dada y las restantes se obtienen por permutaciones, a excepción de la última fila, en la que todos los signos son negativos (-). En este diseño, los efectos principales tienen una compleja relación de interacciones interefecto. Por ello, estos diseños deben utilizarse fundamentalmente para estudiar los efectos principales cuando se supone que las interacciones bidireccionales son insignificantes.

La principal ventaja de este diseño respecto a otros diseños de barrido es la completa ortogonalidad entre las variables y el reducido número de experimentos trabajando con un elevado número de factores (Peggs *et al.*, 1999).

En este trabajo, mediante diseños de Plackett-Burman se evaluó el efecto de 11 factores sobre la fermentación de suero a butanol (Capítulo 6). Entre los factores evaluados estaban: los nutrientes esenciales adicionados al medio de fermentación (extracto de levadura; KH_2PO_4 ; K_2HPO_4 ; NH_4Cl ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; cisteína), la concentración del compuesto tamponador (CaCO_3), la concentración inicial de lactosa, la adición de lactosa suplementaria y la temperatura, para dos rangos de valores (máximo y mínimo), con el objeto de determinar el rendimiento de fermentación, evaluado sobre las respuestas, que eran concentración de butanol (g/L), rendimiento producto-sustrato ($Y_{B/L}$, g/g) y tasa de consumo de lactosa (%). De todos los factores cuyos efectos sobre la fermentación fueron analizados mediante el diseño PB, se seleccionaron los tres con un mayor efecto significativo. Posteriormente se realizó un diseño MSR para optimizar los factores.

Referencias:

Box, G. E., & Wilson, K. B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 13(1), 1-38.

Dombek, K. M., & Ingram, L. O. (1986). Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(5), 975-981.

Peggs, G. N., Lewis, A. J., & Oldfield, S. (1999). Design for a compact high-accuracy CMM. *CIRP Annals-Manufacturing Technology*, 48(1), 417-420.

Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325.

Anexo III. Otras publicaciones científicas

A continuación, se enumeran otras publicaciones científicas de la doctoranda durante el desarrollo de este trabajo de tesis en otras áreas temáticas distintas.

1. Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambronero, J., Paniagua-García, A. I., & Díez-Antolínez, R. (2019). A global approach to obtain biobutanol from corn stover. *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.026>.
2. 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. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104147>.
3. 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*(4), 1000-1011. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10016-7>.
4. Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambronero, J., Paniagua-García, A. I., & Díez-Antolínez, R. (2018). Biobutanol production from coffee silverskin. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 154. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.07.002>.
6. Paniagua-García, A. I., Hijosa-Valsero, M., Díez-Antolínez, R., Sánchez, M. E., & Coca, M. (2018). Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: The case of *Panicum virgatum*. *Biomass and Bioenergy*, *116*, 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.06.006>.
7. Moreno, R., Martínez, E., Escapa, A., Martínez, O., Díez-Antolínez, R., & Gómez, X. (2018). Mitigation of volatile fatty acid build-up by the use of soft carbon felt electrodes: evaluation of anaerobic digestion in acidic conditions. *Fermentation*, *4*(1), 2. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010002>.
8. Gómez, X., Meredith, W., Fernández, C., Sánchez-García, M., Díez-Antolínez, R., Garzón-Santos, J., & Snape, C. E. (2018). Evaluating the effect of biochar addition on the anaerobic

- digestion of swine manure: application of Py-GC/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(25), 25600-25611. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2644-4>.
9. 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 wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(21), 8041-8052. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8522-z>.
 10. 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(6), 1518-1524. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b02943>.
 11. Malmierca, S., Díez-Antolínez, R., Paniagua, A. I., & Martín, M. (2017). Technoeconomic study of biobutanol AB production. 2. Process design. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(6), 1525-1533. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b02944>.
 12. Paniagua, 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. <https://doi.org/10.3303/CET1649038>.

