

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL



**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE GRANO GASTADO DE CERVEZA Y SU EFECTO
SOBRE LA PRODUCCIÓN SECUENCIAL FERMENTATIVA DE HIDRÓGENO Y
BUTANOL EN UN SISTEMA DE DOS ETAPAS**

POR

CARLOS MORENO ALMAGUER

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL

SEPTIEMBRE DE 2026



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

FECHA: 2026/08/10

DR. JOSÉ MANUEL MENDOZA RANGEL
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
PRESENTE.-

Estimado Dr. Mendoza Rangel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **"HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE GRANO GASTADO DE CERVEZA Y SU EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN SECUENCIAL FERMENTATIVA DE HIDRÓGENO Y BUTANOL EN UN SISTEMA DE DOS ETAPAS"**, que presenta el **ING. CARLOS MORENO ALMAGUER**, como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, del programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** con la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictamino que este trabajo sea **APROBADO**.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,

DR. ARQUÍMEDES CRUZ LÓPEZ

Evaluador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Av. Pedro de Alba S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455

81 8329 4000 ext. 4060 • www.fic.uanl.mx



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

2026/08/19

DR. JOSÉ MANUEL MENDOZA RANGEL

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

PRESENTE.-

Estimado Dr. Mendoza Rangel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE GRANO GASTADO DE CERVEZA Y SU EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN SECUENCIAL FERMENTATIVA DE HIDRÓGENO Y BUTANOL EN UN SISTEMA DE DOS ETAPAS”**, que presenta el **ING. CARLOS MORENO ALMAGUER**, como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, del programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictamino que este trabajo sea **APROBADO**.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,


Dra. Lirio María del T. Reyna Gómez

Evaluador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Av. Pedro de Alba S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455

81 8329 4000 ext. 4060 • www.fic.uanl.mx



INSTITUTO
DE INGENIERÍA
UNAM

2025/agosto/12

DR. JOSÉ MANUEL MENDOZA RANGEL

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

PRESENTE.-

Estimado Dr. Mendoza Rangel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **"HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE GRANO GASTADO DE CERVEZA Y SU EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN SECUENCIAL FERMENTATIVA DE HIDRÓGENO Y BUTANOL EN UN SISTEMA DE DOS ETAPAS"**, que presenta el **ING. CARLOS MORENO ALMAGUER**, como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, del programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

Por lo anterior, me permito informar a Usted que el documento **CUENTA** con la calidad y nivel **CIENTÍFICO**, adecuados para su defensa, por lo que dictamino que este trabajo sea **APROBADO**.

Asimismo, anexo a este documento el formato de evaluación correspondiente, donde hago saber mis comentarios y observaciones al respecto.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración que considere pertinente.

Atentamente,

Dra. Idania Valdez Vazquez

Evaluador



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Comprobante de corrección de escritos

ESTUDIANTE ☒ PROFESOR ☐

NOMBRE: CARLOS MORENO ALMAGUER

TIPO DE DOCUMENTO: ARTÍCULO ☐ TESIS ☒ PI ☐ OTRO ☐

TÍTULO DEL DOCUMENTO A REVISAR:

HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE GRANO GASTADO DE CERVEZA Y SU EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN SECUENCIAL FERMENTATIVA DE HIDRÓGENO Y BUTANOL EN UN SISTEMA DE DOS ETAPAS.

RECOMENDACIONES ADICIONALES:

REALIZAR LAS CORRECCIONES QUE APAREZCAN EN LA TESIS IMPRESA.

*Este documento certifica la corrección DEFINITIVA del trabajo arriba identificado, en los aspectos: ortográfico, metodológico y estilístico.

Nombre y firma de quien corrigió:

Arq. Ramón Longoria Ramírez
Asesor Profesional de Apoyo



Dr. José Manuel Mendoza Rangel

Subdirector de Estudios de Posgrado e Investigación
Ciudad Universitaria, 06 de Agosto de 2016

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Av. Universidad S/N Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P.P. 66455
Tels. (81) 14424400 ext. 4448 | 83294000 ext. 7216, 7234
correo electrónico: spi.fic@uanl.mx

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ingeniería Civil
Subdirección de Estudios de Posgrado e Investigación.

Los miembros del comité evaluador recomendamos que la Tesis titulada **“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE GRANO GASTADO DE CERVEZA Y SU EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN SECUENCIAL FERMENTATIVA DE HIDRÓGENO Y BUTANOL EN UN SISTEMA DE DOS ETAPAS”**, realizada por el **ING. CARLOS MORENO ALMAGUER**, con número de matrícula **1726325**, sea aceptada para su defensa como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Ciencias** dentro del programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

El Comité Evaluador:

Dr. Arquímedes Cruz López
Director de tesis

Dra. Lirio María Reyna Gómez
Evaluador/Codirector de la tesis

Dra. Idania Valdez Vazquez
Evaluador/Asesor externo de la tesis

Dr. José Manuel Mendoza Rangel
Subdirector de Estudios de Posgrado e Investigación

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del pretratamiento alcalino y la hidrólisis enzimática del grano gastado de cerveza (BSG, por sus siglas en inglés) sobre la producción secuencial de hidrógeno y butanol. Para poder cumplir lo anterior primeramente se realizó un pretratamiento alcalino con NaOH a diferentes concentraciones (0.2, 0.5, 1 y 5 %p/v) y dos relaciones sólido/líquido (5 y 10 %p/p), con el fin de romper la barrera de la lignina y poder aprovechar la hemicelulosa y celulosa mediante el empleo de las enzimas Viscozyme L y Ultraflo L, las cuales fueron empleadas de manera individual a diferentes pHs y una mezcla de ambas para la liberación de azúcares fermentables. Por último, se montaron reactores en lotes y en lote con renovación parcial del medio a 37 °C y pH inicial de 5.5 para la producción de hidrógeno y butanol empleando el hidrolizado obtenido y la cepa de *Clostridium beijerinckii* DSM 6422.

El BSG presentó un contenido de humedad de 80.13 %, así como composiciones de 16.75 % de celulosa, 44.82 % de hemicelulosa y 9.17 % de lignina. El pretratamiento alcalino con NaOH al 0.5% p/v a 120 °C, a una relación sólido/líquido del 10 % p/p favoreció la ruptura de la fibra de lignina, mientras que la hidrólisis enzimática con la mezcla de Viscozyme L y Ultraflo L a pH de 4.5 mostró un efecto sinérgico, alcanzando un grado de sinergismo de 1.60, incrementando aproximadamente un 45 % la liberación de azúcares y alcanzando un rendimiento de 0.35 g AR/g BSG seco.

La fermentación en lote empleando una concentración de azúcares reductores (AR) de 7 g/L, logró una producción de hidrógeno de 953 mL/L y de butanol de 0.6 g/L con un rendimiento de 142.1 mL de H₂/g AR consumido y para el butanol 0.095 g/g AR consumido. Por otro lado, de las fermentaciones en lote con renovación parcial del medio la que mejores resultados obtuvo fue cuando se realizó a una concentración de AR de 14 g/L, sin ajuste del pH entre ciclos, logrando una producción total de 3,895 mL/L y 1.43 g/L (de hidrógeno y butanol, respectivamente), con un rendimiento total del proceso de 138.6 mL de H₂/g AR consumido y para el butanol de 0.052 g/g AR consumido. En cuanto a las especies

presentes en los reactores con los mejores resultados (en lote y en lote con renovación parcial del medio), se identificaron principalmente del género *Clostridium* y en la mayoría de los tiempos de estudio la especie predominante fue el *Clostridium beijerinckii*.

Finalmente, en la fermentación con la microbiota nativa del BSG se logró una producción de 3.4 L de H₂/L, con un rendimiento de 34.5 mL de H₂/g BSG seco, lo cual representa un área de oportunidad para la valorización del BSG por medio de fermentación oscura como una etapa previa a los pretratamientos normalmente desarrollados. Durante el proceso, las bacterias presentes fueron del género *Clostridium* en su mayoría.

Con la elaboración del presente trabajo de investigación se concluyó que la aplicación de un pretratamiento en dos etapas, compuesto por una etapa alcalina seguida de una etapa de sacarificación enzimática, favoreció la liberación de azúcares fermentables a partir del BSG. Los azúcares obtenidos permitieron el desarrollo de procesos fermentativos capaces de generar productos de interés biotecnológico, tales como hidrógeno, ácidos grasos volátiles y solventes como el butanol.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain (BSG) on the sequential production of hydrogen and butanol. To achieve this, an alkaline pretreatment was first carried out using NaOH at different concentrations (0.2, 0.5, 1 and 5% w/v) and two solid-to-liquid ratios (5 and 10% w/w), to break down the lignin barrier and facilitate the utilization of hemicellulose and cellulose. Subsequently, the enzymes Viscozyme L and Ultraflo L were applied individually at different pH levels and as a mixture of both for the release of fermentable sugars. Finally, batch and batch with partial renewal of the medium reactors were conducted at 37 °C and an initial pH of 5.5 to produce hydrogen and butanol using the hydrolysate obtained and the *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 strain.

The BSG had a moisture content of 80.13%, as well as compositions of 16.75% cellulose, 44.82% hemicellulose and 9.17% lignin. Alkaline pre-treatment with 0.5% w/v NaOH at 120 °C, at a solid-to-liquid ratio of 10% w/w, promoted the breakdown of the lignin fibre, whilst enzymatic hydrolysis using a mixture of Viscozyme L and Ultraflo L at pH 4.5 exhibited a synergistic effect, achieving a synergy index of 1.60 and increasing sugar release by approximately 45% and a yield of 0.35 g reducing sugars/g dry BSG.

Batch fermentation using a reducing sugar (RS) concentration of 7 g/L produced 953 mL/L of hydrogen and 0.6 g/L of butanol, with a yield of 142.1 mL of H₂ per gram of RS consumed and 0.095 g of butanol per gram of RS consumed. On the other hand, of the batch with partial renewal of the medium fermentations, the best results were obtained when carried out at an RS concentration of 14 g/L, without pH adjustment between cycles, achieving a total production of 3,895 mL/L and 1.43 g/L (of hydrogen and butanol, respectively), with a total process yield of 138.6 mL H₂/g AR consumed and 0.052 g butanol/g AR consumed. As for the species present in the reactors with the best results (in batch and in a batch with partial renewal of the medium modes), those identified were mainly of the genus *Clostridium*, and in most of the study periods the predominant species was *Clostridium beijerinckii*.

Finally, fermentation using the natural microbiota of BSG produced 3.4 L of H₂/L, with a yield of 34.5 mL of H₂/g of dry BSG, which represents an opportunity for the valorization of BSG through dark fermentation as a preliminary step to the pre-treatments normally employed. During the process, the bacteria present were predominantly of the genus *Clostridium*.

This research concluded that the application of a two-stage pre-treatment, comprising an alkaline stage followed by an enzymatic saccharification stage, promoted the release of fermentable sugars from BSG. The sugars obtained enabled the development of fermentation processes capable of generating products of biotechnological interest, such as hydrogen, volatile fatty acids and solvents such as butanol.

Agradecimientos

Agradezco el apoyo institucional de la Facultad de Ingeniería Civil y a las administraciones de la FIC por brindarme la formación académica y permitirme el uso de las instalaciones para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico otorgado durante todo el periodo de la maestría (No. CVU: 2058393).

A los proyectos CF-2023-I-916, CBF-2025-I-2850 y a DGAPA-UNAM (proyecto PAPIIT, No. IN105224) por el financiamiento otorgado para el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Arquímedes Cruz López y la Dra. Lirio Reyna Gómez por aceptar ser mis directores de tesis. Agradezco que compartieran sus conocimientos conmigo y la paciencia durante el proceso.

A la Dra. Idania Valdez Vazquez, por su asesoría durante la estancia realizada, agradezco enormemente todos sus consejos y por compartir sus conocimientos teóricos y prácticos para el proyecto.

Al Dr. Santiago Suarez Vázquez, por estar presente cada que lo necesitaba y brindarme su apoyo para el análisis de resultados y manejo de la presentación de estos.

Al Departamento de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil de la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitir el uso de las instalaciones a lo largo del proyecto.

Al Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas de la Universidad Autónoma de México, Unidad Académica Juriquilla por permitirme el uso de las instalaciones durante mi estancia.

Al Laboratorio de Nutrición y Calidad de los Alimentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme usar sus instalaciones para hacer caracterizaciones de mi sustrato.

Al Dr. Juan Emmanuel Segura Carmona por transmitirme el conocimiento para realizar los análisis de las fracciones de fibra del sustrato y por su apoyo brindado.

A la Dra. Cecilia Álvarez Guzmán y al Maestro Alejandro Rodríguez Rodríguez por brindarme su apoyo durante mi estancia de investigación, agradezco la paciencia que tuvieron para transmitirme el conocimiento del uso de equipos y software.

Agradezco a las grandes personas y amigos que estuvieron presentes durante mi estancia en posgrado: M.C. Julián Álfaro Chacón, M.C. Adriana Álvarez Ramos, Ing. Arturo Velasco Moo, Ing. Raúl Barragán Buenrostro, Lic. Paulina Barrera Martínez, Ing. Eladio Campos Aguilera, Ing. Diego Ortiz Ramírez, M.C. Isidrio De León Abarte, Lic. Naomi Ramírez Zúñiga, M.C. Roberto Campos Flores, Ing. Nora Hernández Almaguer y Ing. Heidy López López

A la Ing. Monserrat Martínez Medina, al Dr. José Álvarez Pérez y al Dr. Miguel Guerra Cossío, por impulsarme a buscar algo mejor para mí, brindarme su apoyo y estar presentes a lo largo del posgrado.

A mis padres y hermano, por su apoyo durante el transcurso de mi etapa académica.

Agradezco también mi esfuerzo, constancia y dedicación durante este proceso, así como la capacidad de mantenerme firme ante los retos presentados a lo largo de esta etapa académica y personal.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	1
1.1 Introducción	1
1.2 Hipótesis	6
1.3 Objetivos	6
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	7
2.1 BSG como sustrato	7
2.2 Pretratamientos del BSG	15
2.3 Fundamentos de la fermentación	24
2.4 Justificación	33
CAPÍTULO 3. MÉTODOS EXPERIMENTALES	35
3.1 Estrategia Experimental	35
3.2 Materiales y Métodos	36
3.3 Pretratamientos alcalino y enzimático de BSG	40
3.4 Fermentación	46
3.5 Producción de hidrógeno con microbiota nativa	50
3.6 Rendimiento y productividad	52
3.7 Análisis molecular e identificación de especies	53
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	56
4.1 Caracterización fisicoquímica del BSG	56
4.2 Pretratamiento alcalino	58
4.3 Hidrólisis enzimática	68
4.4 Fermentación en lote del material hidrolizado para la producción de H ₂ y ABE.....	73
4.5 Fermentación en lotes con renovación parcial del material hidrolizado para la producción de H ₂ y ABE.....	79

4.6 Productividad y rendimiento.....	91
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES DE LA ESTANCIA.....	94
5.1 Fermentación con la microbiota nativa del BSG	94
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	99
Referencias bibliográficas consultadas	104

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

1.1 Introducción

En los últimos años se han buscado nuevas formas de generar energías que reduzcan los efectos negativos al medio ambiente por el uso de los combustibles fósiles que hoy en día son los más utilizados para este fin, donde se encuentra principalmente como efecto negativo la contaminación del aire por el CO₂ emitido, es por esto que se han realizado avances en las investigaciones realizadas sobre fuentes de energía renovable, entre las cuales una que ha resultado ser muy adecuada debido a que tiene el potencial de generar biocombustibles y además tiene un impacto positivo en la disminución de residuos que emiten las diferentes actividades humanas es la energía proveniente de la biomasa. El empleo de la biomasa para generar biocombustibles es una solución porque se ha estudiado a partir de diferentes residuos de actividades humanas, de acuerdo con Pérez-Denicia et al. (2017) en México, las fuentes de biomasa, incluyendo el biogás, la madera y el bagazo de caña de azúcar, contribuyeron con el 4.14% de la producción total de energía primaria en México en 2014, lo que representa 365.4 petajulios (PJ).

En México existen 68 proyectos de generación de energía a partir de biomasa, con una capacidad instalada de 647.16 MW y una generación de 1,414 GWh/año (Pérez-Denicia et al., 2017). Toda la generación es de producción privada; la CFE no produce electricidad a partir de biomasa, pero se realiza mediante dos procesos: calor y electricidad, y biogás. Sin embargo, estas tecnologías desarrolladas para producir electricidad mediante biomasa deben evaluarse para determinar su impacto ambiental, el cual debe tener una relación costo-beneficio positiva a largo plazo.

En este sentido, los métodos biológicos como la fermentación se presentan como una alternativa tecnológica como prometedores portadores de energía alternativo, ya que posee un alto contenido energético, un bajo impacto ambiental y funcionan en condiciones muy cercanas a la presión y temperatura estándar lo que implica un bajo aporte energético. Mediante el pretratamiento adecuado de los residuos generados en grandes centros urbanos o en campo, estos han sido estudiados en

la generación de biocombustibles como metano, etanol, hidrógeno, butanol, entre otros. El butanol tiene como características un alto contenido energético (142 KJ/g), baja explosividad y una alta compatibilidad con la gasolina, así como varias aplicaciones industriales, como son la formulación de detergentes, fármacos, hormonas y cosméticos (Y. Li et al., 2019). Mientras que el hidrógeno, es el combustible con el poder calorífico más alto (143 MJ/Kg) y su combustión sólo genera agua como subproducto (Han et al., 2017).

Respecto a los residuos sólidos, la industria alimentaria destaca por ofrecer diversas materias primas para este fin. Un ejemplo notable es la industria cervecera, que en 2019 produjo 190.4 millones de m³ cerveza en el año (Wagner et al., 2021) generando grandes cantidades de residuos uno de ellos el grano gastado de cerveza (conocido como BSG, por sus siglas en inglés), el cual tradicionalmente se aprovecha como alimento para animales, elaboración de pesticidas, puede usarse en conjunto con harinas para hacer alimentos. Sin embargo, la mayor parte de estos residuos no recibe el tratamiento adecuado contribuyendo a las emisiones de gases de efecto invernadero, la contaminación del suelo y el agua, y la creación de un espacio de reproducción para patógenos (Ikechukwu et al., 2026). Por lo tanto, es pertinente implementar estrategias eficientes de gestión de residuos para mitigar estos impactos sobre la base del marco legal existente.

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años se ha estudiado el potencial que tiene el BSG en la producción de biocombustibles (Bachmann et al., 2022; Mussatto, 2014; Mussatto et al., 2006). La composición del BSG está en función de los tipos de granos utilizados para el proceso de fabricación de cerveza, y consisten principalmente de celulosa, hemicelulosa, y cantidades considerables de proteínas y lignina, por lo que tiene un potencial alto para su utilización en aplicaciones biotecnológicas, como la producción de hidrógeno, ácidos grasos volátiles (AGV's) y/o solventes como butanol.

Sin embargo, el uso de BSG para aplicaciones biotecnológicas en la obtención de biocombustibles presenta algunos inconvenientes, específicamente debido a la naturaleza química de la celulosa, su grado de polimerización, su porosidad, y al contenido de lignina. Esto hace necesario la aplicación de pretratamientos como

pasos previos limitantes al proceso hidrolítico-fermentativo (S. Sharma et al., 2020; S. Tang et al., 2019). Una alternativa para ello, es la aplicación de tratamientos físicos, químicos o enzimáticos, o bien algunas combinaciones de estos. Se destacan los pretratamientos químicos a bajas concentraciones de ácidos (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄), o álcalis (NaOH, NH₄OH), por ser rápidos y efectivos en la hidrólisis de celulosa, hemicelulosa y lignina (Mussatto & Roberto, 2006). Durante los pretratamientos ácido-alcalinos se aplica una temperatura para favorecer la velocidad de reacción que puede oscilar entre los 100°C y los 180 °C en promedio. Existe una vasta literatura referente a la producción de hidrógeno y de butanol empleando procesos de fermentación oscura o fermentación acetona-butanol-etanol (ABE), respectivamente (Barampouti et al., 2019; Stephen & Periyasamy, 2018; Veza et al., 2021).

En estos estudios se busca la eficiencia de cada proceso por separado. Sin embargo, es deseable que, mediante estrategias adecuadas de operación y control del proceso, se explore la posibilidad de producir ambos combustibles de forma simultánea, lo que rendirá en una mayor recuperación energética neta y favorecerá la viabilidad económica de esta tecnología.

En la coproducción de hidrógeno y butanol, se han evaluado diferentes parámetros como la carga orgánica, concentración de azúcares simples, presencia de metabolitos intermediarios (Díez-Antolínez et al., 2016; Vilela et al., 2019; C. Zhang et al., 2022), así mismo, diferentes niveles de ajuste y control de pH y su relación con las fases de acidogénesis y solventogénesis (Su et al., 2022) además del tamaño de inóculo (V. Singh et al., 2019; Sivagurunathan & Lin, 2020) cuyo efecto sobre la productividad se asocia con la reducción de la fase lag. Otras variables recientemente evaluadas como el control del potencial óxido reducción (ORP), como promotor de una adecuada actividad de coenzimas e intercambiadores de electrones (V. Singh et al., 2020), uso de co-cultivos con características hidrolítico-fermentativas (C. Zhang et al., 2022), así como la adición de cofactores y metabolitos intermediarios, como iones calcio y ácido butírico (C. Zhang et al., 2020, 2022), que pueden promover cambios metabólicos para favorecer la producción de un combustible en particular. Otros estudios, han explorado la integración de

procesos empleando un sustrato común, (Valdez-Vazquez et al., 2015) emplearon residuos de maíz para producir hidrógeno y butanol, en sistemas integrados, en los que con la fase acidogénica se aprovecha la fracción fermentable del residuo mientras que el residuo de este sistema es acondicionado y posteriormente utilizado para un sistema basado en la fermentación ABE, alimentado con AGV's y la fase gaseosa del sistema acidogénico (H_2 - CO_2). Sin embargo, la posibilidad de reducir a un sistema fermentativo mediante el adecuado control de los parámetros operativos para la producción de hidrógeno como para la producción de butanol, con las ventajas que esto traería en términos operativos y económicos, no ha sido estudiado de forma más exploratoria.

Este trabajo se divide en 6 capítulos, en el primero se busca ubicar al lector en el contexto del aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos de la industria agroalimentaria en la zona metropolitana de Monterrey y potencial aprovechamiento en la generación de hidrógeno y butanol empleando procesos fermentativos empleando una cepa de *Clostridium beijerinckii* (que se abreviará como *C. beijerinckii*). En el segundo capítulo se presenta el análisis de literatura sobre la importancia de valorización del BSG considerando los diferentes parámetros de estudio durante el pretratamiento químico y enzimático seguido del proceso de fermentación oscura y ABE. En el capítulo, 3 se describen las metodologías y condiciones experimentales de la caracterización fisicoquímica del BSG antes y durante las diferentes etapas del proceso (hidrólisis y fermentación). En la Capítulo 4 se presentan los resultados y discusión de los experimentos que consistieron en muestras de BSG (relación sólida/líquido de 5 y 10 %p/p) y una concentración de NaOH en el intervalo de 0.5 a 5% p/v. A partir de la caracterización por Microscopia Electrónica de Barrido, Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier, así como carbohidratos totales (CHT) y azúcares reductores (AR), donde se seleccionó la muestra A4 y para la etapa de hidrólisis enzimática empleando Viscozyme L, Ultraflo L, y una combinación de ambas en el intervalo de pH 4.5 a 5.5. La hidrólisis enzimática permitió obtener $21,192 \pm 365$ (A4S-EV), $24,048 \pm 660$ (A4S-EU) y 35,000 mg/L (A4S-Mix) de azúcares reductores (AR) a pH 4.5. A partir del hidrolizado A4S-Mix se evaluó en la fermentación de H_2 y Butanol empleando

C. beijerinckii a 37°C, pH inicial de 5.5 y AR de 14 g/L. Los resultados confirman el consumo de más de 90% de AR y la producción de H₂ (953 mL/L) y butanol (0.6 g/L) en 72 h. Los subproductos de la fermentación confirman que las rutas metabólicas favorecen la producción de ácido butírico mismo que se asocia con la producción de butanol una vez que *C. beijerinckii* realiza la transición. Finalmente, los rendimientos fueron 142 mL H₂/g AR_{consumido} y 0.095 g/g AR_{consumido} para H₂ y butanol, respectivamente. En una segunda etapa el reactor también se evaluó en forma de lote con renovación parcial de medio logrando incrementar 88 y 50% la productividad de H₂ y butanol, respectivamente.

Posteriormente en el capítulo 5 se muestran los resultados obtenidos de la fermentación del BSG empleando su microbiota nativa donde se logró producir $2,976 \pm 139$ mL de H₂/L en el primer lote de 3 días, y en el segundo lote la producción fue de 474 ± 44 mL de H₂/L. Finalmente, en el Capítulo 6 se presentan las conclusiones donde se destacan las principales aportaciones de este trabajo.

1.2 Hipótesis

El empleo de un pretratamiento alcalino seguido de un pretratamiento enzimático del grano gastado de cerveza incrementará la disponibilidad de azúcares fermentables en el hidrolizado, lo que favorecerá las rutas metabólicas de *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 para la producción secuencial de hidrógeno y butanol.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del pretratamiento alcalino y la hidrólisis enzimática del grano gastado de cerveza sobre la producción secuencial de hidrógeno y butanol empleando la cepa de *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 para aprovechar los subproductos del proceso.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Muestrear y caracterizar fisicoquímicamente el BSG mediante análisis de fracción de fibra y la determinación del porcentaje de humedad.
2. Evaluar el efecto de pretratamiento alcalino (NaOH) a 120 °C sobre los BSG para su hidrólisis y generación de carbohidratos y azúcares reductores.
3. Comparar el impacto de la enzima en la hidrólisis del BSG.
4. Evaluar el impacto de la concentración de AR en el intervalo de 6 a 15 g/L del BSG en la fermentación secuencial de hidrógeno y butanol en reactor en lote (pH inicial 5.5, V=1 L, 37°C).
5. Evaluar el efecto de la renovación parcial del medio con hidrolizado de BSG en el reactor para incrementar el rendimiento y productividad fermentativa (pH inicial 5.5, V=1 L, 37°C).
6. Identificar mediante técnicas moleculares las especies presentes en los reactores que hayan presentado producción de hidrógeno y butanol.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 BSG como sustrato

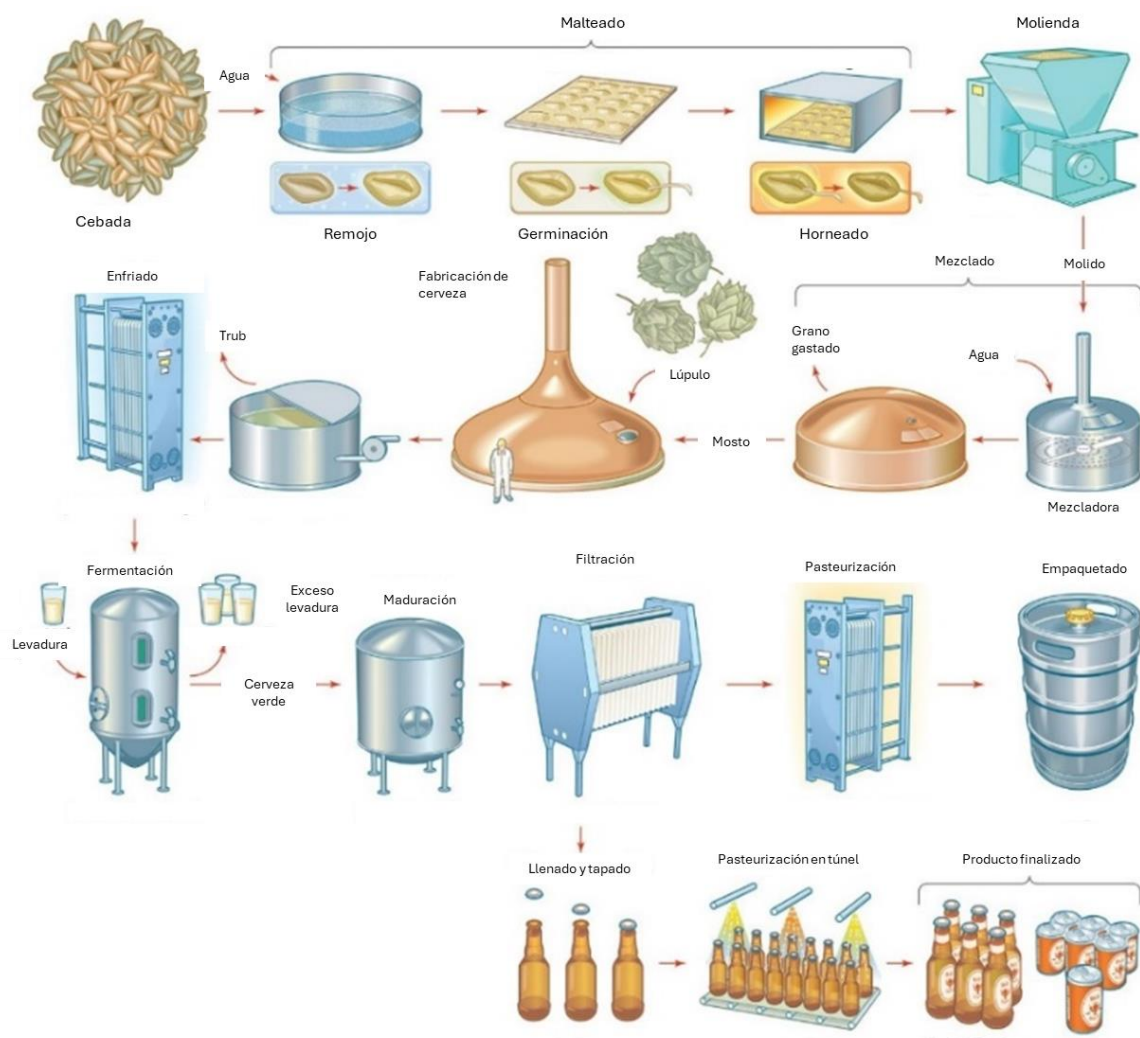
El aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos de la industria alimentaria generados en grandes centros urbanos es una propuesta sostenible que busca transformar cantidades significativa de biomasa en la generación de energía verde, esto se debe a que este tipo de residuos suelen contener cantidades sustanciales de material orgánico (carbohidratos, proteínas, grasa y aceite, entre otros) (S. Li et al., 2026; R. Sharma, 2024). Además, el sector agroindustrial a nivel mundial se está dando cuenta que el reciclaje de residuos representa una ventana desde el punto de vista ecológico como económico porque hoy en día, esta tendencia es una realidad en sectores, como el minero, el metalúrgico, las cenizas de incineración, el caucho, etc (Aguiar et al., 2022). Por lo tanto, los residuos de la industria agroindustrial no deben ser la excepción para aprovechar la fracción lignocelulósica como materia prima secundaria para la conversión bioquímica de hidrógeno y otros metabolitos de interés con la finalidad de reducir la dependencia de la industria petroquímica y así coadyuvar a mitigar el cambio climático.

El BSG es el principal residuo sólido generado por la industria cervecera y se produce en grandes cantidades, lo que puede constituir un problema ambiental si no se gestiona adecuadamente. Debido a su alta disponibilidad, bajo costo y composición lignocelulósica, el BSG ha despertado un creciente interés como sustrato para procesos de bioconversión debido a su importante contenido de celulosa, hemicelulosa y en menor porcentaje lignina. En la siguiente sección se describe el origen y la composición del BSG, su generación a nivel industrial, las propiedades relevantes para su valorización, los principales retos asociados a su aprovechamiento y sus usos actuales y potenciales.

2.1.1 Origen y composición del BSG

La industria cervecera es una de las principales actividades industriales a nivel mundial, en cuanto a su manera de producción se tienen diversas etapas (Figura 1) como la maceración, la cocción, la fermentación y la maduración. De estas, la maceración tiene como objetivo la activación enzimática, el agotamiento de los

granos malteados molidos debido a la extracción de sustancias fenólicas, azúcares simples y compuestos nitrogenados necesarios para las fases posteriores de la producción de la cerveza. Posterior a la maceración se realiza una filtración con el fin de separar el material orgánico del mosto, obteniendo así el grano gastado de cerveza (Cruz-Cardona et al., 2019). Este residuo tiene un alto valor nutricional y es el residuo sólido más grande producido, lo que resulta en un gran volumen de residuos durante todo el año, con un costo bajo o nulo para su adquisición (Belardi et al., 2023; Kavalopoulos et al., 2021; Raftopoulou, 2019).



© 2012 Encyclopædia Britannica, Inc.

Figura 1. Proceso de generación del BSG. Reimpreso de: (Young, 2026)

El BSG puede estar compuesto de un 15 - 26% de proteínas y un 70% de fibras, que incluyen celulosa (entre 15.5 y 25%), hemicelulosa (28 a 35%) y lignina (aproximadamente el 28%). También puede contener lípidos (entre 3.9 y 18%, de

los cuales el 67% son triglicéridos), cenizas (2.5 a 4.5%), vitaminas, aminoácidos y compuestos fenólicos (Dos Santos et al., 2015; Kavalopoulos et al., 2021; Ministerio de Agricultura, n.d.). El BSG contiene diversos monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos más abundantes son la glucosa, la xilosa y la arabinosa. Las proteínas más comunes son las hordeínas, las glutelinas, las globulinas y las albúminas (Mitri et al., 2022). Por lo anterior el BSG es considerado un material lignocelulósico, debido a que cumple que se encuentra formado principalmente de tres tipos diferentes de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 2). Esta composición puede variar de acuerdo con las diferencias que se pueden tener en la cebada utilizada, así como las condiciones en las que se lleva a cabo la cosecha, el malteado y la maceración del proceso, entre otros factores. (Belardi et al., 2023; Raftopoulou, 2019; Wilkinson et al., 2014; Xiros & Christakopoulos, 2012; Zacharie Merlin Ayissi et al., 2024) A pesar de las variaciones, la composición, la abundancia y las características ecológicas del BSG lo convierten en una opción atractiva para las iniciativas de bioeconomía circular.

La celulosa está compuesta por subunidades de D-glucosa, unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos. La celulosa vegetal se compone de partes con una estructura cristalina (organizada) y partes con una estructura amorfa, no bien organizada. Las cepas de celulosa se agrupan formando las llamadas fibrillas de celulosa o haces de celulosa. Estas fibrillas de celulosa son en su mayoría independientes y están débilmente unidas mediante enlaces de hidrógeno (Bajpai, 2016; Decker et al., 2017; Hendriks & Zeeman, 2009).

La hemicelulosa es una estructura compleja de carbohidratos que consta de diferentes polímeros como pentosas (como la xilosa y la arabinosa), hexosas (como la manosa, la glucosa y la galactosa) y ácidos de azúcar. La hemicelulosa actúa como enlace entre la lignina y las fibras de celulosa, y confiere mayor rigidez a toda la red celulosa-hemicelulosa-lignina (Bajpai, 2016; Decker et al., 2017; Hendriks & Zeeman, 2009).

La lignina es, después de la celulosa y la hemicelulosa, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza y está presente en la pared celular. Es un heteropolímero amorfo compuesto por tres unidades diferentes de fenilpropano

(alcohol p-cumarílico, coniferílico y sinapílico), unidas mediante diferentes tipos de enlaces. Su principal función es proporcionar a la planta soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque microbiano y al estrés oxidativo (Bajpai, 2016; Decker et al., 2017; Hendriks & Zeeman, 2009).

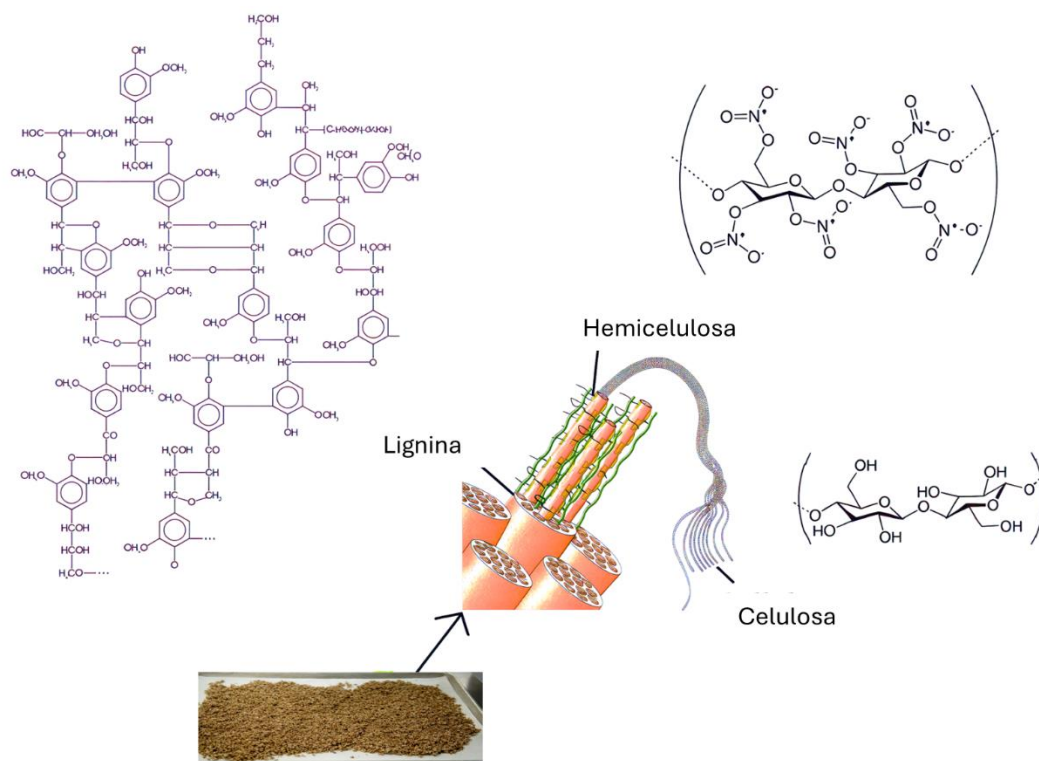


Figura 2. Esquema de la composición del BSG. Adaptado de: (Wang & Yin, 2017)

2.1.2 Generación y disponibilidad en la industria cervecera

En 2021, la producción mundial de cerveza fue de 186 GL (Belardi et al., 2023; Dancker et al., 2025; Zeko-Pivač et al., 2022). Se generan aproximadamente 20 kg de BSG por cada 100 L de cerveza producida (Dos Santos et al., 2015; Mitri et al., 2022). Esta cantidad representa el 85 % (p/p) de los residuos específicos de la cerveza (Corchado-Lopo et al., 2021; Di Matteo et al., 2023; Silbir & Goksungur, 2019) y, por lo tanto, representa la mayor proporción en masa. Por lo anterior, la producción a nivel mundial de BSG fue de 37.8 Mt (Belardi et al., 2023; Dancker et al., 2025).

De acuerdo con Zeko-Pivač (2022) a nivel mundial los principales productores de BSG en el año 2020 fue Norteamérica y Sudamérica con 12.306 millones de toneladas, seguido por Asia con 11.018 millones de toneladas y Europa con 10.019

millones de toneladas (Figura 3). Los principales países productores de cerveza son China, Estados Unidos, Brasil y México (Coronado et al., 2020; Saldarriaga-Hernandez et al., 2025). En México de acuerdo con datos de Salud Justa Mx (2024) la producción de cerveza fue de 12, 218 millones de L, lo cual correspondería a 2.44 millones de toneladas de BSG. Según datos del Instituto Nacional Estadística y Geografía (INEGI) (2019) Nuevo León contribuyó con aproximadamente el 11% de la producción total de cerveza en México en el año 2019, si ese porcentaje se mantuviera para el año 2023, se hubiera producido aproximadamente 1,343 millones de L de cerveza, lo que ocasionaría una generación de 0.268 millones de toneladas de BSG.

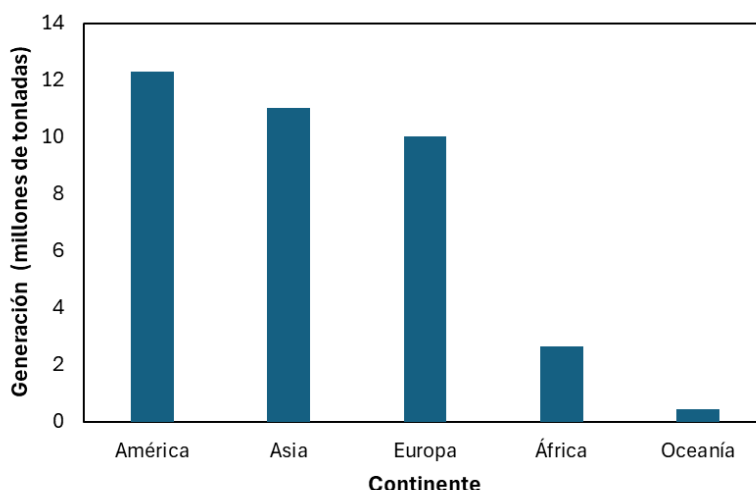


Figura 3. Generación de BSG por continente en el año 2020.

2.1.3 Usos tradicionales y estrategias de valorización del BSG

Aproximadamente el 70 % del BSG se utiliza para la alimentación animal, del restante, el 10 % es empleado para la producción de biogás y el 20 % se envía a vertederos, lo que genera un impacto de aproximadamente 513 kg de CO₂ equivalente por tonelada. Además, entre el 5 % y el 10 % del BSG se utiliza en la producción de alimentos y fertilizantes en la agricultura. Se han realizado diversos intentos para maximizar el valor del BSG mediante la producción de bioetanol, biobutanol, hidrógeno, carbón activado y adsorbentes, sustituyéndolo por serrín en la fabricación de ladrillos e incorporándolo a la fabricación de papel. El BSG también se ha explorado como relleno en matrices poliméricas, aunque esto a menudo ha

resultado en una disminución de sus propiedades mecánicas (Belardi et al., 2023; Kavalopoulos et al., 2021; C. Liu et al., 2023; Mitri et al., 2022; Pires et al., 2012; Sganzerla et al., 2022).

Como se mencionó anteriormente el uso más común del BSG es su comercialización en la producción de alimento para animales, ya que se ha comprobado que es una excelente fuente de proteínas para rumiantes. Independientemente de la ubicación o el tamaño de la cervecería. Las grandes cervecerías suelen encargar la eliminación del BSG a productores de alimento para animales que lo procesan como materia prima, en lugar de entregarlo directamente a las granjas (Raftopoulou, 2019). Las cervecerías venden el bagazo a los agricultores locales. El problema con la venta de BSG puede surgir durante la primavera y el verano, ya que el interés de los agricultores en comprarlo disminuye debido a la mayor disponibilidad de forraje verde más económico (Głowacki et al., 2022). Otro problema asociado es que el alto contenido de fibra tiene efectos positivos en las vacas y negativos en las aves. Alimentar a las vacas con BSG mejora la digestibilidad y tiene un efecto positivo en la eficiencia y la rentabilidad de la producción de leche, pero también puede reducir el consumo de materia seca, el peso corporal, la proteína y la grasa láctea (Zeko-Pivač et al., 2022).

En la industria alimentaria, el BSG se utiliza para la producción de pan, galletas, magdalenas, pasta, barras de cereales, patatas fritas y yogur. Su alto contenido de fibra dietética favorece la eliminación del colesterol y las grasas, y mejora los síntomas de la colitis ulcerosa. Además, la presencia de compuestos fenólicos, considerados antioxidantes naturales, se asocia con la prevención de enfermedades crónicas, cardiovasculares y neurodegenerativas, ciertos tipos de cáncer y la diabetes (Zeko-Pivač et al., 2022).

Si bien el BSG se ha utilizado previamente como sustrato en diversas aplicaciones, en los últimos años se han evaluado distintos pretratamientos con el objetivo de obtener azúcares fermentables a partir de este subproducto, ampliando así su potencial de valorización (Corchado-Lopo et al., 2021). El alto contenido de carbohidratos del BSG, principalmente en forma de celulosa y hemicelulosa, lo convierte en un sustrato atractivo para múltiples aplicaciones biotecnológicas. Tras

su procesamiento químico o enzimático, los azúcares liberados pueden ser convertidos microbiológicamente en una amplia variedad de bioproductos, tales como ácidos orgánicos, etanol, hidrógeno y butanol, entre otros (Raftopoulou, 2019).

El empleo del BSG como sustrato de fermentación presenta ventajas económicas significativas, ya que puede utilizarse como fuente de carbono de bajo coste en medios de cultivo para diversos microorganismos, en comparación con sustratos convencionales, permitiendo una producción más rentable del producto de interés (Raftopoulou, 2019). Gracias a su disponibilidad constante, su composición nutricional y su bajo precio, el BSG se ha consolidado como un sustrato viable para procesos a escala de laboratorio e industrial.

En este contexto, el uso alternativo del BSG ha cobrado un creciente interés impulsado por los avances tecnológicos en su procesamiento y por el desarrollo del concepto de economía circular. Diversos estudios han demostrado su viabilidad como sustrato en la producción de productos de alto valor añadido, incluyendo biocombustibles (bioetanol, biobutanol, biogás, biohidrógeno y biolípidos), ácidos orgánicos (como ácido láctico y ácido cítrico), enzimas (celulasas, xilanasas), proteínas unicelulares, oligosacáridos prebióticos, xilitol, entre otros compuestos de interés industrial (Mussatto & Roberto, 2005; Puligundla & Mok, 2021).

Por lo tanto, la valorización del BSG mediante procesos biotecnológicos de fermentación, orientados a la producción de hidrógeno y butanol, puede enmarcarse en un enfoque de biorrefinería (Valdez-Vazquez et al., 2015), ya que permite la obtención de múltiples bioproductos de valor añadido a partir de un único sustrato. Este tipo de estrategias contribuye a maximizar el aprovechamiento del residuo, reducir su impacto ambiental y promover modelos de economía circular más sostenibles. Sin embargo, a pesar del elevado potencial del BSG como materia prima para procesos biotecnológicos, su aprovechamiento se ve limitado por una serie de limitaciones asociadas a su composición y a las condiciones en las que se genera. Estas limitaciones deben ser abordadas para permitir una conversión eficaz del BSG en productos de valor añadido y garantizar la viabilidad de los procesos a escala industrial.

2.1.4 Limitaciones y retos del BSG como sustrato lignocelulósico

El BSG es un sustrato abundante y económico, proveniente de una fuente renovable, y requiere un proceso para su valorización y reciclaje, con el fin de añadir un valor agregado a este subproducto y evitar una eliminación ecológicamente perjudicial, sin embargo, debido a las características propias del BSG es complicado el uso de este, su alto contenido de humedad (hasta un 80 %p/p) propio del proceso productivo de la elaboración de cerveza, además de su susceptibilidad microbiana junto al pH inadecuado para la estabilización aeróbica y su relación carbono/nitrógeno (C/N) no óptima para aprovechar el subproducto en compostaje directo (Belardi et al., 2023; Dancker et al., 2025). El proceso de almacenamiento de BSG también provoca cambios en la composición química (Zeko-Pivač et al., 2022) debido a la humedad estos cambios se pueden ver reflejados entre 7 y 10 días (Mitri et al., 2022; Terefe, 2022).

Un factor que limita la valorización del BSG es su composición lignocelulósica, donde el polímero de lignina de cadena larga reduce la accesibilidad de los microorganismos a los componentes biodegradables (holocelulosa: celulosa y hemicelulosa) que están inmersos en la lignina dificultando la transferencia de masa de calor, catalizadores o enzimas. Por lo tanto, es recomendado emplear un pretratamiento que rompa la pared celular para mejorar la accesibilidad a la holocelulosa retenida en el interior, con el fin de acelerar la hidrólisis e incrementar la conversión en productos de interés (Belardi et al., 2023; Corchado-Lopo et al., 2021; Dancker et al., 2025). Las estructuras cristalinas organizadas se modifican durante la etapa de pretratamiento, lo que repercute en las características intrínsecas de los enlaces presentes en los materiales lignocelulósicos. Debido a esto, el pretratamiento se convierte en un proceso crucial para mejorar la despolimerización de los componentes estructurales y optimizar eficazmente la conversión en subproductos beneficiosos (K.N et al., 2023).

Sin embargo, la selección del pretratamiento adecuado para el BSG representa un desafío técnico y económico, ya que debe lograr un equilibrio entre la eficiencia de desestructuración lignocelulósica, el consumo energético, el uso de reactivos químicos y la formación de compuestos inhibidores (Plaza Lázaro, 2022).

2.2 Pretratamientos del BSG

La producción de biocombustibles a partir de lignocelulosa sigue un proceso integrado que consta básicamente de tres pasos: pretratamiento, hidrólisis y fermentación (Cheng et al., 2012; Xu et al., 2025). La compleja estructura de la biomasa lignocelulósica hace necesario que se lleve a cabo un pretratamiento con el fin de alterar la estructura interna para que la sacarificación se pueda llevar a cabo (Plaza Lázaro, 2022). El principio general de estos métodos de pretratamiento es eliminar o alterar el contenido de hemicelulosa o lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la superficie de la biomasa (Bajpai, 2016; Kan et al., 2018; O. Singh & Chandel, 2018). Existen numerosas técnicas de pretratamiento disponibles para tratar la biomasa lignocelulósica, que pueden clasificarse en mecánicas, térmicas, químicas, biológicas, etc (Bajpai, 2016; Cheng et al., 2012; Plaza Lázaro, 2022; H. Singh et al., 2022; O. Singh & Chandel, 2018), de los cuales los pretratamientos químicos, y en particular los alcalinos, han mostrado ser especialmente eficaces para la remoción de lignina y la mejora de la digestibilidad de la biomasa en procesos subsecuentes de hidrólisis y fermentación.

Los objetivos del pretratamiento son básicamente eliminar la lignina y las hemicelulosas (Decker et al., 2017), así como reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad de los materiales. Para que un pretratamiento sea eficaz, debe: (1) mejorar la formación de azúcares o la capacidad de formar azúcares posteriormente mediante hidrólisis enzimática; (2) prevenir la degradación o pérdida de carbohidratos; (3) prevenir la formación de subproductos inhibidores para los procesos de hidrólisis y fermentación posteriores (LOBO GOMES et al., 2021; Lobo Gomes et al., 2023).

La liberación de glucosa requiere separar la celulosa de la lignina, ya que esta última interfiere con la acción enzimática sobre la celulosa (Lobo Gomes et al., 2023), es por esta razón que emplear un pretratamiento alcalino que degrade la lignina y posteriormente aplicar un pretratamiento enzimático con enzimas especializadas para aprovechar las fracciones de hemicelulosa y celulosa y convertirlas en azúcares fermentables se vuelve una alternativa adecuada para emplearla en la valorización de residuos lignocelulósicos.

2.2.1 Pretratamientos alcalinos

El tratamiento alcalino se considera un método de pretratamiento prometedor que altera las propiedades estructurales, como el área superficial accesible y la cristalinidad del sustrato pretratado, mejorando así su hidrólisis enzimática. Durante el pretratamiento alcalino, la lignocelulosa experimenta dos reacciones: solvatación y saponificación, que provocan el hinchamiento de su estructura, disminuyendo así el grado de polimerización y haciendo que sus componentes sean más susceptibles a la degradación enzimática y microbiana. También se ha descubierto que las soluciones alcalinas pueden utilizarse en la solubilización, redistribución y condensación de la lignina, lo que también conduce a la modificación de la celulosa cristalina. Los pretratamientos alcalinos más comunes utilizan hidróxido de sodio (NaOH) y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Cheng et al., 2012; LOBO GOMES et al., 2021; Lobo Gomes et al., 2023; Mussatto, Dragone, et al., 2008; Pandey et al., 2015). En general, el pretratamiento alcalino es más eficaz en residuos con bajo contenido de lignina que en residuos con alto contenido de lignina (Bajpai, 2016). Además, los pretratamientos alcalinos suaves producen una menor formación de compuestos inhibidores en comparación con los procesos ácidos y pueden operar a temperaturas más bajas (Fernández-Delgado et al., 2019).

De manera general, los pretratamientos alcalinos han destacado entre todas las técnicas de pretratamiento, debido a que: (1) los métodos alcalinos utilizan principalmente productos químicos no contaminantes ni corrosivos, como amoníaco (acuoso, líquido y gaseoso), hidróxido de sodio, carbonato de sodio e hidróxido de calcio (cal); (2) el pretratamiento alcalino se lleva a cabo en condiciones más suaves que las necesarias para el pretratamiento ácido; (3) los reactivos alcalinos interactúan principalmente con la lignina, lo que lo hace más eficiente para su eliminación que el pretratamiento ácido. Además, se menciona que el pretratamiento alcalino es preferible a otros métodos de pretratamiento químico para la biomasa destinada a la digestión anaerobia (Kan et al., 2018).

2.2.1.1 Efectos del pretratamiento alcalino sobre la estructura del BSG

Diversos estudios han demostrado que el pretratamiento alcalino genera modificaciones estructurales significativas en el BSG. Mitri et al. (2022) reportaron

que el uso de reactivos alcalinos, como hidróxidos de sodio, calcio y potasio, favorece la eliminación parcial de la lignina y, en menor medida, de la hemicelulosa, lo que mejora la accesibilidad de la celulosa y facilita su posterior conversión en azúcares fermentables mediante procesos de sacarificación.

Estos efectos se atribuyen principalmente a reacciones de saponificación, las cuales provocan la ruptura de los enlaces éster intermoleculares entre la lignina y las hemicelulosas presentes en el BSG. Como consecuencia, se debilita la matriz lignocelulósica y se libera la fracción celulósica, reduciendo la recalcitrancia del material. Adicionalmente, los reactivos alcalinos inducen un mecanismo de hinchamiento de la biomasa, que se traduce en un aumento de la porosidad, una disminución del grado de polimerización y una reducción de la cristalinidad de la celulosa, incrementando así la superficie interna disponible para la acción enzimática (Jiayang Cheng, 2002).

En conjunto, estos cambios estructurales explican el incremento en la eficiencia de la hidrólisis enzimática del BSG pretratado alcalinamente, consolidando este método como una alternativa adecuada para mejorar el aprovechamiento de este residuo agroindustrial.

2.2.2 Hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica

Posterior al pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, en el cual se producen modificaciones estructurales internas, es posible llevar a cabo la hidrólisis enzimática, también conocida como sacarificación. Este proceso permite la degradación de los polisacáridos complejos de la celulosa y la hemicelulosa para la obtención de azúcares fermentables que pueden ser metabolizados por microorganismos, principalmente azúcares de seis carbonos (C6), como glucosa, galactosa y manosa, y azúcares de cinco carbonos (C5), como xilosa y ramnosa (Plaza Lázaro, 2022; O. Singh & Chandel, 2018).

La hidrólisis enzimática se ha consolidado como un método de elección debido a sus múltiples ventajas, entre las que destacan el alto rendimiento de conversión, los menores requerimientos de reactivos químicos, el bajo consumo energético, la operación bajo condiciones ambientales suaves y la reducida formación de compuestos inhibidores de la fermentación (O. Singh & Chandel, 2018). En las

siguientes secciones se describen los fundamentos del proceso, las principales enzimas involucradas y los factores que influyen en su eficiencia, así como la sinergia entre el pretratamiento alcalino y la hidrólisis enzimática.

2.2.2.1 Fundamentos y sistemas enzimáticos en la sacarificación

Las enzimas funcionan como catalizadores de las reacciones biológicas, con ellas se disminuye la energía de activación de una reacción y, por consiguiente, aumenta la velocidad de la reacción. Cada enzima cataliza solamente un único tipo de reacción química o, en el caso de algunas enzimas, una clase de reacciones estrechamente relacionadas. Esta especificidad se debe a la estructura tridimensional de la molécula de la enzima, lo cual hace que se tenga una ausencia de reacciones secundarias, por lo tanto, no habría formación de productos secundarios (Garske et al., 2017; LOBO GOMES et al., 2021).

En una reacción catalizada enzimáticamente, la enzima se combina temporalmente con el sustrato, para formar un complejo enzima-sustrato, luego se genera el producto y la enzima vuelve a su estado original. Para catalizar una reacción específica, una enzima debe realizar dos cosas: 1) unirse al sustrato adecuado y 2) colocar el sustrato de modo preciso para que interaccione con los grupos catalíticos del sitio activo de la enzima (Garske et al., 2017; Madigan et al., 2003).

La hidrólisis enzimática de la celulosa es una reacción realizada por las enzimas celulasas, que son altamente específicas. Las celulasas suelen ser una mezcla de varias enzimas que contienen tres grupos principales que participan en el proceso de hidrólisis de la celulosa: (i) β -1-4-endoglucanasas, que atacan las regiones de baja cristalinidad de las fibras de celulosa, creando extremos libres de la cadena; (ii) β -1-4-exoglucanasas o celobiohidrolasas, que degradan aún más la molécula eliminando unidades de celobiosa de los extremos libres de la cadena; (iii) β -glucosidasas o celobiasas, que hidrolizan la celobiosa para producir glucosa. Desafortunadamente, se requieren grandes cantidades de enzimas, lo que perjudica el costo y la rentabilidad de esta tecnología (Galindo Hernández, 2017; Mussatto, Fernandes, et al., 2008; Pierre et al., 2011; Raftopoulou, 2019; Wilke et al., 1980).

En un proceso de hidrólisis convencional se usa sólo un grupo de enzimas, celulasas principalmente, no obstante, éstas no logran entrar en la estructura heterogénea de la hemicelulosa puesto que, por su composición más variada en comparación con la celulosa, requiere un gran número de enzimas con distintas actividades para lograr una hidrólisis completa. Por esta razón, se emplean enzimas auxiliares que atacan la hemicelulosa, como la glucuronidasa, la acetilesterasa, la xilanasas, la β -xilosidasa, la galactomananasa y la glucomananasa (Galindo Hernández, 2017; Jiayang Cheng, 2002).

La hidrólisis eficiente de la biomasa lignocelulósica no depende de la acción individual de una sola enzima, sino del sinergismo entre diferentes actividades enzimáticas. Las endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas actúan de manera complementaria, donde la acción inicial de las endoglucanasas genera nuevos extremos accesibles que son posteriormente hidrolizados por las exoglucanasas, mientras que las β -glucosidasas evitan la acumulación de celobiosa, la cual puede inhibir el sistema enzimático (Figura 4). De forma similar, las hemicelulasas actúan de manera conjunta para degradar la compleja estructura de la hemicelulosa, facilitando el acceso de las celulasas a la celulosa (Galindo Hernández, 2017; Sørensen et al., 2003). Por lo tanto, al hidrolizar la hemicelulosa de manera simultánea con la celulosa o de forma secuencial es posible incrementar los rendimientos de sacarificación enzimática, siendo esto una oportunidad de mejora para los rendimientos de azúcares (Galindo Hernández, 2017).

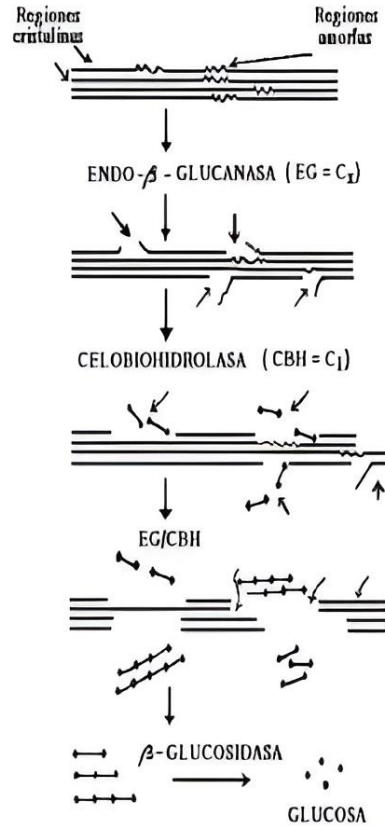


Figura 4. Mecanismo de funcionamiento de las celulasas. Reimpreso de: (Plaza Lázaro, 2022)

El sinergismo enzimático, es un término utilizado para describir la acción cooperativa entre las enzimas durante el proceso de sacarificación, con el fin de llevar a cabo un proceso eficiente. De tal forma que existe sinergismo cuando el grado total de hidrólisis de una mezcla de enzimas es mayor que la suma de los grados de hidrólisis observados por las enzimas individuales. El sinergismo enzimático se puede calcular mediante la ecuación modificada de Andersen et al., (Andersen et al., 2008) (Ec. 1) en la cual se calcula un grado de sinergismo y se involucra la formación de producto (p.ej., suma de todos los azúcares solubles) o a las velocidades de hidrólisis generales. De esta manera, si el cociente de la ecuación 1 es mayor que 1 se determina que existe sinergismo, de lo contrario se determina que se trata de antagonismo o que no existe sinergismo

$$GS = \frac{(AR)_{Mezcla\ de\ enzimas}}{\alpha(AR)_{Enzima\ 1} + \beta(AR)_{Enzima\ 2}} \quad (1)$$

donde α y β corresponden a las fracciones de la enzima 1 y la enzima 2 (respectivamente) en la mezcla enzimática. AR es la concentración de azúcares reductores obtenidos (g/L).

2.2.2.2 Parámetros que afectan la eficiencia de la hidrólisis

Debido a la naturaleza heterogénea de la biomasa lignocelulósica y a la naturaleza intrínseca de las enzimas, hacen que la eficiencia de la hidrólisis varíe. Los factores que afectan se dividen en 2 grupos: Relacionados con las enzimas y relacionados con el sustrato (Aguado García, 2020; Jiayang Cheng, 2002; Mussatto, Dragone, et al., 2008).

Entre los factores relacionados con las enzimas se encuentran la concentración, el tipo y la fuente de enzimas, la adsorción enzimática sobre lignina, la sinergia, la inhibición del producto final. Además, parámetros operativos como la temperatura y el pH influyen de manera directa en la actividad enzimática. La temperatura es crítica para la adsorción de las celulasas, mientras que el pH afecta la ionización del sitio activo y la conformación tridimensional de la enzima. Las enzimas solo son activas dentro de un rango específico de pH, ya que desviaciones significativas pueden provocar inestabilidad estructural o cambios e los parámetros cinéticos (Punekar, 2018; Shuler & Kargi, 2002). De igual modo, la exposición a condiciones extremas, como altas temperaturas, ácidos o bases fuertes y disolventes orgánicos, pueden conducir a la desnaturalización enzimática y a la pérdida de la actividad catalítica (Garske et al., 2017).

Por otro lado, los factores relacionados con el sustrato están asociados principalmente a su estructura y composición. Entre estos se incluyen el grado de cristalinidad de la celulosa, la porosidad, la superficie específica disponible, el tamaño de partícula, la humedad, la concentración de sólidos que pueden limitar el acceso de la enzima a la celulosa (Aguado García, 2020; Garske et al., 2017; Hendriks & Zeeman, 2009; Pierre et al., 2011). De igual manera, Mussatto, Dragone, et al. (2008), señalaron que la intensidad de la agitación juega también un papel importante en la hidrólisis, afectando al contacto entre la enzima y el sustrato.

La hidrólisis enzimática de materiales celulósicos es una reacción heterogénea en la que enzimas solubles se unen a la celulosa y la convierten en azúcares solubles.

Por lo tanto, el tamaño de partícula desempeña un papel fundamental, ya que una reducción en su tamaño incrementa la superficie disponible para la acción enzimática. Dado que la velocidad de reacción es proporcional a la cantidad de enzima adsorbida, una mayor superficie de contacto favorece la hidrólisis (Mussatto, Dragone, et al., 2008; Mussatto, Fernandes, et al., 2008).

En conjunto, estos factores evidencian que la eficiencia de la hidrólisis enzimática depende en gran medida de las modificaciones estructurales inducidas durante el pretratamiento, las cuales influyen directamente en la accesibilidad del sustrato y en la interacción enzima-sustrato.

2.2.3 Sinergia entre pretratamiento alcalino y la hidrólisis enzimática

En la mayoría de los procesos de conversión de biomasa lignocelulósica, la hidrólisis enzimática se emplea para transformar la celulosa en glucosa. Sin embargo, en residuos como el BSG la celulosa está ligada físicamente a la hemicelulosa y fisicoquímicamente a la lignina, lo que dificulta el acceso de las enzimas a la matriz de celulosa (Sibono et al., 2023). Esta limitación, junto con la elevada cristalinidad y la baja porosidad del sustrato crudo, hacen necesario que se lleve a cabo un pretratamiento que favorezca la hidrólisis enzimática (Macheiner et al., 2003; Wagner et al., 2021; Wilke et al., 1980).

En este sentido, los pretratamientos alcalinos, como aquellos que emplean hidróxido de sodio (NaOH), actúan principalmente degradando la lignina y, en menor medida, sobre la hemicelulosa, provocando su solubilización parcial y la alteración de la matriz lignocelulósica. Lo anterior hace que se facilite un mejor acceso enzimático a los componentes de celulosa y hemicelulosa (Wilkinson et al., 2014), además de reducir la posibilidad de unión no productiva de las enzimas a la lignina (Wilkinson et al., 2014). Al mismo tiempo, la eliminación parcial de la hemicelulosa contribuye al aumento del tamaño medio de poro del sustrato y, por lo tanto, la probabilidad de que la celulosa se hidrolice (Hendriks & Zeeman, 2009; Pierre et al., 2011).

La sinergia entre el pretratamiento alcalino y la hidrólisis enzimática se manifiesta, por tanto, en la mejora simultánea de la accesibilidad del sustrato y de la eficacia de la acción enzimática. Adicionalmente, la combinación del pretratamiento alcalino

con tratamientos físicos orientados a la reducción del tamaño de partícula puede potenciar aún más la liberación de azúcares fermentables (Puligundla & Mok, 2021).

2.3 Fundamentos de la fermentación

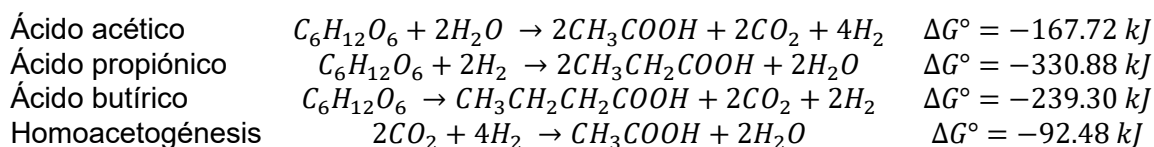
2.3.1 Fermentación oscura

La fermentación oscura produce hidrógeno a partir de compuestos orgánicos debido a la acción de microorganismos, teniendo así como ventajas ser un proceso simple, de bajo requerimiento energético, altas tasas de producción y la posibilidad de utilizar residuos de bajo costo como materia prima (Bhatia et al., 2022; Cisneros de la Cueva et al., 2024)

La fermentación oscura comienza con la hidrólisis del material orgánico que es la fuente de alimento para los microorganismos, de dicho material se rompen las cadenas de los polímeros insolubles haciéndolos disponibles. Posteriormente, las bacterias acidogénicas convierten esos productos de la hidrólisis e hidrógeno, amonio, alcoholes y ácidos orgánicos.

Durante el proceso se llevan a cabo diversas rutas dependiendo de las condiciones de operación del proceso, tales como la ruta celulolítica, butírica y acética (Albuquerque et al., 2024). La ruta celulolítica, por ejemplo, implica la degradación de la biomasa lignocelulósica por microorganismos, convirtiendo polisacáridos como la celulosa en azúcares simples como la glucosa. Si bien este método permite el uso de una amplia variedad de materiales de desecho como sustratos, como los abundantes y económicos residuos lignocelulósicos, es importante destacar que la hidrólisis de la celulosa es un proceso lento y a menudo requiere un pretratamiento para ser eficiente debido a la presencia de lignina, lo que representa un desafío significativo. La vía butírica se caracteriza por la conversión de azúcares simples como la glucosa en 2 moles de H_2 , 1 mol de ácido butírico, 2 moles de CO_2 . La principal limitación de esta vía es la acumulación de ácido butírico en el medio de cultivo, lo que puede provocar una disminución del pH e inhibir el metabolismo de los microorganismos productores de hidrógeno. La vía acética es llevada a cabo por una amplia variedad de microorganismos y se caracteriza por la conversión de azúcares simples como la glucosa en 4 moles de H_2 , 2 moles de acetato, 2 moles de CO_2 . Su principal limitación es la acumulación de ácido acético en el medio de cultivo, lo que puede afectar el metabolismo de los microorganismos productores de hidrógeno (Jain et al., 2024).

El piruvato produce AGVs como el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico, mediante la ruta acidogénica. Mientras que la homoacetogénesis es una ruta que consume el H₂ producido. Las reacciones involucradas en la ruta acidogénica y en la homoacetogénesis se muestran a continuación



2.3.1.1 Microorganismos involucrados en la fermentación oscura

A lo largo del tiempo se han investigado diversos microorganismos anaerobios estrictos o facultativos que puedan llevar a cabo la fermentación oscura, con el fin de convertir los sustratos orgánicos en hidrógeno, entre los cuales han destacado microorganismos como los de la familia Clostridiaceae (*Clostridium*), Enterobacteriaceae (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*) y otros (Albuquerque et al., 2024; Rajeswari et al., 2025).

Los microorganismos productores de hidrógeno pueden obtenerse de diversas fuentes, como estiércol animal, lodos de reactores anaeróbicos, residuos orgánicos, suelo y aguas residuales (Cruz-Méndez et al., 2022; R. Sharma, 2024). Estas fuentes orgánicas biodegradables son naturalmente ricas en microorganismos capaces de realizar fermentación anaeróbica. Los sistemas de fermentación oscura pueden inocularse con un consorcio microbiano o un cultivo puro.

La realización de la fermentación oscura a partir de cultivos puros a escala laboratorio facilita la manipulación del metabolismo microbiano mediante cambios en las condiciones de crecimiento, facilitando la minimización de subproductos no deseados (Albuquerque et al., 2024). Por otro lado, el uso de cultivos mixtos es ampliamente utilizado porque los microorganismos tienen mayor tolerancia al estrés metabólico y a la variabilidad de las condiciones de operación. Sin embargo, los inóculos obtenidos de diversas localizaciones también pueden contener microorganismos que consumen H₂, como los metanógenos, lo que requiere un pretratamiento para suprimir la actividad de estos microorganismos (Albuquerque et

al., 2024; Campos-Flores et al., 2026; Mokhtarani et al., 2025; Montoya-Rosales et al., 2026).

2.3.1.2 Factores importantes en la fermentación oscura

En lo que respecta a la fermentación oscura existen varios factores que influyen directamente en la misma, como lo son el pH, la temperatura, el tiempo de retención hidráulica, la presión parcial, los nutrientes, el tipo de sustrato, el tipo de reactor, entre otros (Grangeiro et al., 2023; Jain et al., 2024; Satishkumar et al., 2023).

El pH es uno de los principales factores a considerar en la producción de hidrógeno, debido a los efectos que tiene a nivel celular en los microorganismos, viéndose reflejado esto en las rutas metabólicas y por lo tanto, afectando al rendimiento de este. La producción se ve favorecida en intervalos de pH de 4.5 a 7, dependiendo del residuo empleado. De igual manera, la temperatura juega un papel crucial ya que esta afecta la tasa de crecimiento de los microorganismos, así como la tasa de conversión del sustrato durante la fermentación (Jain et al., 2024; Satishkumar et al., 2023).

Otro factor que influye en el metabolismo microbiano para la producción de hidrógeno son los nutrientes como fósforo, hierro, nitrógeno, entre otros. Dichos nutrientes ayudan al crecimiento microbiano y sus actividades (Jain et al., 2024).

Por otro lado, el tipo de sustrato impacta en la fermentación debido a que de este se obtiene la fuente de carbono, es decir, la concentración de carbohidratos, principalmente glucosa, aunque puede contener mezclas con otros azúcares, por lo que aprovechar residuos lignocelulósicos en este tipo de fermentación es una estrategia viable debido a su posibilidad de obtener a partir de ellos azúcares que se puedan emplear en el proceso fermentativo.

2.3.2 Fermentación Acetona-Butanol-Etanol (ABE)

Debido al creciente interés de obtener combustibles a partir de fuentes renovables, además de los avances tecnológicos en el campo biotecnológico han motivado que se recuperen los procesos de fermentación para la obtención de butanol, etanol, entre otros. Como consecuencia, ha aumentado la investigación enfocada en obtener un mejor conocimiento de esta fermentación para desarrollar procesos más

eficientes y competitivos (Plaza Lázaro, 2022), así como de los procesos previos a la fermentación con biomasa lignocelulósica como el BSG, con el fin de incrementar la cantidad de azúcares fermentables.

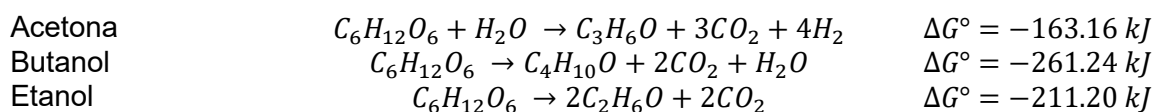
Dentro de los combustibles estudiados, el butanol destaca debido a su alto contenido energético, baja volatilidad y sus características de ser menos higroscópico y corrosivo (Cheng et al., 2012; Y. Zhang et al., 2021). Además, puede sustituir a la gasolina sin necesidad de modificar las tecnologías actuales de vehículos o motores.

Por lo anterior, la fermentación ABE se posiciona como uno de los procesos biotecnológicos más relevantes para la producción de butanol, así como otros subproductos como el H₂ y ácidos grasos volátiles (AGV) a partir de azúcares fermentables obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica.

2.3.2.1 Fundamentos de la fermentación ABE

Se sabe desde hace más de 100 años que el butanol se puede obtener mediante fermentación cultivando bacterias grampositivas anaerobias estrictas del género *Clostridium*. Entre las cepas más utilizadas son *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Plaza Lázaro, 2022).

Las cepas de *Clostridium beijerinckii* poseen una vía metabólica conocida como ABE, que les permite transformar azúcares en H₂, CO₂, ácidos acético y butírico en una primera fase llamada acidogénesis y, posteriormente, en butanol, acetona y etanol en una etapa conocida como solventogénesis (Shuler & Kargi, 2002; Velázquez-Sánchez et al., 2014), las reacciones globales en este tipo de fermentaciones se muestran a continuación



Estos mecanismos moleculares están vinculados con el proceso de esporulación y dependen de la generación de un gradiente de pH entre la célula y el medio de cultivo debido a la acumulación de moléculas producidas en la etapa acidogénica (Velázquez-Sánchez et al., 2014).

La producción de biobutanol depende en gran medida de la cepa empleada y su capacidad para asimilar azúcares fermentables y tolerar las condiciones de operación. Las cepas de *Clostridium* producen acetona, butanol y etanol (ABE) en una proporción molar de 3:6:1 durante el proceso de fermentación del biobutanol (O. Singh & Chandel, 2018) y son procesos que se llevan a temperaturas entre 35 y 40°C, con tiempos de duración de 36 hasta 120 h, dependiendo de la cepa (Aguado García, 2020).

2.3.2.2 Microorganismos y metabolismo ABE

En la fermentación ABE se han estudiado diversas cepas microbianas, las cuales se han clasificado en dos tipos las del género *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium Acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*) y microorganismos no pertenecientes a este género (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus buchneri*, *Saccharomyces cerevisiae*) (Aguado García, 2020). Sin embargo, las especies del género *Clostridium* han sido las más ampliamente estudiadas y utilizadas debido a su capacidad natural para producir solventes en condiciones anaerobias estrictas.

Entre estas especies, *Clostridium beijerinckii* ha despertado un interés creciente en los últimos años, ya que, además de fermentar glucosa, es capaz de metabolizar una amplia gama de polisacáridos y disacáridos. Por lo tanto, le permite emplearse en procesos orientados a la producción de biocombustibles de segunda generación, los cuales buscan aprovechar fuentes de carbono más diversas, como residuos agrícolas y subproductos lignocelulósicos (Velázquez-Sánchez et al., 2014).

Las bacterias del género *Clostridium* presentan un metabolismo característico asociado a la presencia de ferredoxina, un transportador de electrones que contiene hierro y posee un bajo potencial redox. De tal forma que, esta proteína permite la utilización del hidrógeno molecular para la reducción del NAD⁺, facilitando el equilibrio de oxidación-reducción celular. A diferencia de los anaerobios facultativos, los *Clostridium* pueden reutilizar parte del H₂ generado durante la escisión inicial del ácido pirúvico, lo que favorece la conversión de los productos ácidos primarios, como el ácido acético y el ácido butírico, en solventes neutros como butanol, acetona, isopropanol y etanol (Carbonero Zalduegui, 1975).

Como consecuencia de este metabolismo, los productos finales de la fermentación ABE pueden variar considerablemente en función de la cepa utilizada y de las condiciones de operación. Durante las primeras etapas del proceso fermentativo se genera una elevada producción de dióxido de carbono e hidrógeno, lo cual contribuye a mantener las condiciones de anaerobiosis, así como la acumulación de ácido butírico (Ibrahim et al., 2017). Posteriormente, en la etapa final de la fermentación, se incrementa la producción de acetona y butanol, proceso asociado a un aumento en la actividad de la enzima acetoacetato descarboxilasa. Generalmente, la fermentación se completa en un periodo de 48 a 50 h, obteniéndose una proporción típica de butanol-acetona-etanol de 6:3:1 (Carbonero Zalduegui, 1975).

La producción de ABE en especies de *Clostridium* sigue una vía metabólica intracelular compleja, cuyos productos pueden agruparse en tres categorías principales: (1) solventes (acetona, butanol y etanol), (2) ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético y ácido butírico) y (3) gases (dióxido de carbono e hidrógeno). El proceso de fermentación comienza con la fase acidogénica, la cual ocurre durante la fase exponencial del crecimiento celular. En esta etapa, cada mol de glucosa puede convertirse en dos moles de ácido acético o en un mol de ácido butírico, provocando una disminución progresiva del pH del medio (Karimi et al., 2015; Visioli et al., 2014). La acumulación de ácidos orgánicos durante la acidogénesis puede inducir un fenómeno conocido como estrés ácido, que inhibe la actividad metabólica si no se cuenta con un control adecuado del pH (Blanco Londoño, 2013).

Cuando el pH del cultivo alcanza un valor umbral crítico, el metabolismo celular cambia hacia la fase solventogénica. Durante esta etapa, los ácidos orgánicos previamente acumulados se reasimilan y se convierten en solventes, mientras que la producción de hidrógeno disminuye significativamente o incluso se detiene, y el crecimiento celular entra en una fase estacionaria. En este sentido el ácido butírico actúa como un intermediario clave para la producción de butanol, ya que la formación de este ácido hace que baje el pH del medio lo cual provoca la transición de acidogénesis a solventogénesis, donde se reutiliza parte del butirato para hacia

butiril-CoA y posteriormente pasa a butiraldehído y este direcciona hacia el butanol (Guerrero et al., 2022; Lee & Lin, 2024; Zhou et al., 2020). En términos de aprovechamiento energético, la coproducción de hidrógeno y butanol mediante fermentación representa una alternativa más competitiva que la producción individual de cada uno de estos productos (Branska et al., 2024; Jones & Woods, 1986; J. Liu et al., 2019; Rajagopalan et al., 2016).

2.3.2.3 Parámetros que afectan la fermentación ABE

La fermentación ABE puede verse afectada por diversos factores, como el pH inicial, la concentración del sustrato, la producción de ácidos, los nutrientes y la producción de solventes (Morone & Pandey, 2014; Plaza Lázaro, 2022). Se puede considerar el pH como uno de los principales parámetros durante la fermentación, pues pequeños cambios en el pH afectan considerablemente al metabolismo microbiano originando lo que se conoce como caída ácida, lo cual es una pérdida del control del pH que impide una transición adecuada entre la acidogénesis y la solventogénesis, deteniendo el crecimiento celular, el consumo de sustrato y la formación de solventes (Bravo-Venegas et al., 2023). Sin embargo, aún no se ha aclarado el pH adecuado para la producción de butanol ni a qué nivel de pH comenzará la acumulación de ácido (Ibrahim et al., 2017). Según Maddox et al. (2000), un valor de pH inferior a 5,0 pudo activar la caída ácida debido a la producción insuficiente de ácidos (acético y butírico), lo que provoca la interrupción de la solventogénesis. Por esta razón, la determinación del pH inicial en la fermentación ABE es crucial para asegurar la transición de la fase acidogénica a la solventogénica.

Ahora bien, respecto a la concentración de ácidos, cuando está es elevada (ácido acético mayor de 5 g/L, ácido butírico mayor de 5 g/L) (Plaza Lázaro, 2022), se inhiben el crecimiento y el metabolismo celular. Si las concentraciones son bajas, el crecimiento se ralentiza, pero el consumo de sustrato y el metabolismo son capaces de continuar. La producción de solventes actúa como un mecanismo de detoxificación, siendo una respuesta adaptativa al efecto inhibitorio de los ácidos.

La concentración de carbono en el medio es baja sólo se producen ácidos, pero en cantidad insuficiente como para inducir la producción de solventes. Es necesario

que la concentración de monosacáridos sea suficiente para el inicio y mantenimiento de la producción de solventes. Otro compuesto limitante es el amonio, si la concentración es baja, la glucosa no se consume y no se entra en fase solventogénica, afectando esta relación amonio:glucosa al inicio de la fase solventogénica (Lin et al., 2023; Plaza Lázaro, 2022).

De los solventes producidos, el butanol es el más tóxico y el único que se produce en concentraciones inhibitorias durante la fermentación. La producción de disolvente cesa cuando la concentración de butanol alcanza aproximadamente 13 g/L en el proceso de fermentación industrial. Se ha informado que el efecto inhibitorio del butanol aumenta en células cultivadas en xilosa, y el crecimiento se inhibe totalmente cuando se añaden 8 g de butanol por litro al medio. Por otro lado, las concentraciones de acetona y etanol no parecen alcanzar niveles inhibitorios durante la fermentación (Jones & Woods, 1986; Lin et al., 2023).

2.3.2.4 Análisis bibliográfico de BSG en la fermentación ABE

Plaza et al. ((2017) emplearon un pretratamiento ácido para tratar el BSG, para posteriormente hidrolizarlo con Celluclast 1.5L y Novozyme 188 y aprovechar dicho material en la fermentación con *Clostridium beijerinckii*, y obtuvieron un rendimiento total de butanol de 75 g/kg de BSG seco y un rendimiento de ABE de 95 g/kg de BSG seco. Por otro lado, López-Linares *et al* (2019) estudiaron el pretratamiento hidrotérmico asistido por microondas para obtener azúcares fermentables con *C. beijerinckii* produciendo 46 kg de butanol/t de BSG y el rendimiento total de ABE fue de 62 kg/t de BSG. López-Linares *et al.* (2020) demostraron que tanto las pentosas como las hexosas de BSG, obtenidas tras un pretratamiento con ácido diluido asistido por microondas e hidrólisis enzimática, pueden fermentarse a butanol (91 kg/t de BSG) y ABE (138 kg/t de BSG) mediante *C. beijerinckii* utilizando un solo biorreactor.

En un estudio similar, Plaza et al. (2020) informaron rendimientos totales de 99,8 g de butanol/kg de BSG y 146,5 g de ABE/kg de BSG, tras el pretratamiento con ácido diluido, la hidrólisis enzimática y la fermentación por *C. beijerinckii*. Fernández Delgado et al. (2019) compararon diferentes estrategias de pretratamiento para la hidrólisis y fermentación de BSG para la producción de biobutanol. Los resultados

mostraron que el pretratamiento con ozono fue ineficaz tanto para la degradación de la lignina como para la recuperación de azúcares fermentables en el proceso enzimático. Por otro lado, tanto los métodos alcalinos con NaOH como con peróxido han demostrado ser altamente exitosos como pretratamientos de BSG para la producción de ABE utilizando *C. beijerinckii*. El BSG pretratado con NaOH (15 % BSG, 1 % p/p NaOH) produjo 44,4 g de butanol/kg y 54 g de ABE/kg, y el BSG pretratado con H₂O₂ (5 % BSG, 60 min) produjo 45,1 g de butanol/kg y 56,1 g de ABE/kg (Fernández-Delgado et al., 2019).

2.4 Justificación

Debido al continuo crecimiento poblacional, la demanda global de energía se ha incrementado significativamente para satisfacer las necesidades socioeconómicas actuales, la cual en la mayoría de los países es obtenida principalmente por medio de los combustibles fósiles, los cuales son considerados fuentes de energía no renovable debido a que provienen de fuentes finitas, por otro lado, el empleo de los combustibles fósiles genera grandes cantidades de CO₂ debido a la quema de estos, haciendo que impacte negativamente al medio ambiente, específicamente a la calidad del aire.

En este contexto, se ha buscado incrementar las investigaciones para aprovechar los recursos naturales como el sol, viento, biomasa, entre otras como fuentes de producción de energía. En México el empleo de la biomasa para generar biocombustibles y con ellos satisfacer una parte de la demanda energética del país, ha tenido una aceptación creciente, además, esta alternativa permite aprovechar un residuo con contenido orgánico de algunas de las principales actividades humanas en su día a día.

Una de las principales industrias en México es la de la elaboración de cerveza, ya que, el país se encuentra posicionado entre los primeros sitios a nivel mundial en su producción siendo de aproximadamente 12450 millones de litros en el año 2019 (INEGI, 2019), la producción de esta genera grandes cantidades de residuos como aguas residuales, levadura residual y grano gastado de cerveza (BSG), teniendo este último una gran diversidad de aplicaciones entre las que se ha encontrado la generación de biocombustibles como butanol e hidrógeno. En Nuevo León la producción de cerveza en el año 2019 fue de 1369.5 millones de litros lo que generó aproximadamente 273.9 millones de kilogramos del BSG (Bachmann et al., 2022; Ravindran et al., 2018), debido a su gran cantidad y disponibilidad durante todo el año, se han realizado investigaciones para poderle dar un uso adecuado al BSG, las cuales han ido en crecimiento los últimos años (Figura 5), debido a su diversidad de aplicaciones, pero en cuestiones de generación de biocombustibles han sido pocos los estudios debido a que al ser un material lignocelulósico, es necesario llevar a cabo pretratamientos al mismo para poder aprovechar correctamente el

material, lo cual ha conllevado a procesos con poca producción, razón por la cual no se ha contemplado la generación de biocombustibles a partir del aprovechamiento del BSG con el fin de contribuir al desarrollo sostenible dentro de la industria de la elaboración de cerveza.

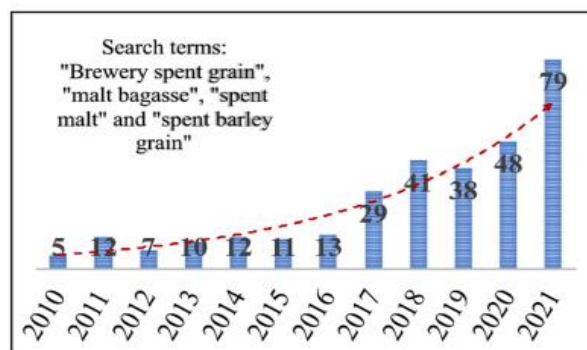


Figura 5. Número de artículos publicados con el término grano gastado de cerveza en la base de datos de ScienceDirect. Reproducido de: (Bachmann et al., 2022)

Por lo anterior, este trabajo pretende contribuir a la investigación acerca de fuentes de energía renovable a partir de biomasa, empleando un pretratamiento combinado alcalino - enzimático en el material lignocelulósico, con el fin de obtener un hidrolizado, debido a que el primero degrada la lignina y el segundo la hemicelulosa y celulosa, para posteriormente aprovechar el material hidrolizado empleando un método biológico como la fermentación con el fin de obtener hidrógeno y butanol. El aporte científico del presente trabajo en el uso del BSG para obtener hidrógeno y butanol por medio de fermentación oscura y fermentación ABE, así como el pretratamiento combinado alcalino – enzimático, buscando incrementar la cantidad de monosacáridos y disacáridos presentes, para beneficiar el proceso de fermentación.

CAPÍTULO 3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.1 Estrategia Experimental

La metodología experimental que se desarrolló en este trabajo consiste en la caracterización fisicoquímica del BSG para conocer las condiciones iniciales, luego se realizó un pretratamiento alcalino del BSG con hidróxido de sodio (NaOH) empleando 4 diferentes concentraciones (0.2, 0.5, 1 y 5 %p/v) y dos relaciones sólido/líquido (5 y 10 %p/p) y se determinó la concentración de azúcares reductores y los carbohidratos generados además de análisis de microscopía electrónica de barrido, espectroscopía FTIR, . La muestra con mejores resultados de los análisis anteriores (A4 descrita en la Tabla 1) se trató mediante una hidrólisis enzimática con las enzimas Viscozyme L, Ultraflo L y la mezcla de ambas en el intervalo de pH 4.5 a 5.5. Las condiciones con mayor concentración de AR a las 24 h fueron empleadas en el hidrolizado de la fermentación ABE para producir hidrógeno y butanol en un reactor en lote y en lote con renovación parcial del medio a pH inicial de 5.5 y con la cepa *Clostridium beijerinckii*.

En otro experimento, se realizó el estudio únicamente de la fermentación oscura empleando la microbiota nativa del BSG (sin secado y tamizado). Las condiciones experimentales de la fermentación oscura fueron a un pH inicial de 6.5. La figura 6 presenta el esquema de las estrategias experimentales.

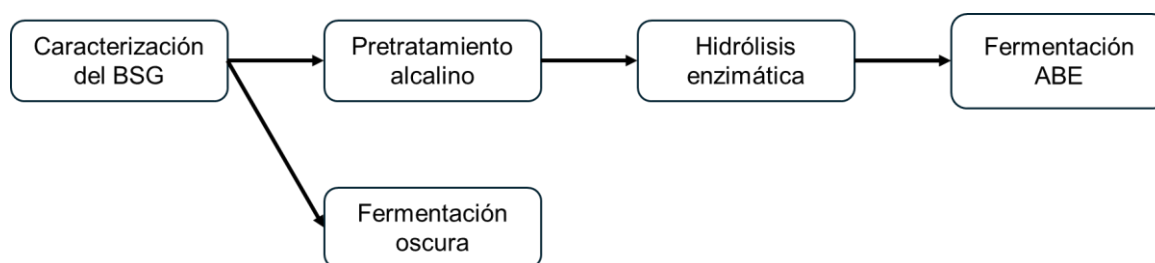


Figura 6. Diagrama general del método empleado para la producción de hidrógeno y butanol

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Obtención del BSG

La muestra del grano gastado de cerveza (BSG) se obtuvo de una empresa de cerveza de la Zona Metropolitana de Monterrey, México y se almacenó a 4 °C para evitar degradación y cambios en su composición.

3.2.2 Enzimas y buffer

3.2.2.1 Viscozyme L

La enzima comercial Viscozyme L (V2010-50MI) de Sigma Aldrich, es un complejo multienzimático derivado de *Aspergillus aculeatus*, contiene actividad hemicelulolítica principalmente: hemicelulosa y xilanasas. Sin embargo, también presenta actividades de arabinasa, celulasa y β -glucanasa (Sørensen et al., 2003).

3.2.2.2 Ultraflo L

La enzima comercial Ultraflo L (Novozymes) es un complejo multienzimático derivado de *Aspergillus niger*, contiene actividad hemicelulolítica principalmente: xilanasas y β -glucanasa (Sørensen et al., 2003).

3.2.2.3 Cálculo del grado de sinergismo enzimático

El sinergismo enzimático se puede calcular mediante la ecuación modificada de Andersen et al., (Andersen et al., 2008) (Ec. 1) en la cual se calcula un grado de sinergismo y se involucra la formación de producto (p.ej., suma de todos los azúcares solubles) o a las velocidades de hidrólisis generales. De esta manera, si el cociente de la ecuación 1 es mayor a 1 se determina que existe sinergismo, de lo contrario se determina que se trata de antagonismo o que no existe sinergismo

$$GS = \frac{(AR)_{Mezcla\ de\ enzimas}}{\alpha(AR)_{Enzima\ 1} + \beta(AR)_{Enzima\ 2}} \quad (1)$$

donde α y β corresponden a las fracciones de la enzima 1 y la enzima 2 (respectivamente) en la mezcla enzimática. AR es la concentración de azúcares reductores obtenidos (g/L).

3.2.2.4 Buffer de citrato

Se utilizó un buffer de citratos para todos los tratamientos de hidrólisis enzimática, el cual se preparó disolviendo 10.5 g de ácido cítrico y 3 g de NaOH en un volumen de 1000 mL de agua destilada, dicha solución tuvo un pH de 4.4. El buffer fue ajustado al pH necesario en las sacarificaciones empleando soluciones amortiguadoras con NaOH 5 M y/o HCl 5 M.

3.2.3 Ceba microbiana

3.2.3.1 *Clostridium beijerinckii* DSM 6422

Para los ensayos fermentativos se utilizó la cepa bacteriana *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 que fue adquirida de la Colección de microorganismos del Laboratorio DSM, Leibniz-Alemania. La cepa de *Clostridium beijerinckii* DSM 6422, que en lo consecutivo llamaremos *C. beijerinckii*, se cultivó en medio anaerobio empleando un cultivo Reinforce Clostridia Media (RCM) a 37°C. Es decir, se colocó 10 %v/v del microorganismo con una jeringa y se vertió a un frasco previamente burbujeado con nitrógeno (N₂) y con 72 mL del medio de RCM, para tener un volumen final de 80 mL, posteriormente se dejó en incubación (MaxQ 4000 Thermo Scientific) por 48 h a 150 rpm.

3.2.4 Caracterización fisicoquímica del BSG

3.2.4.1 Humedad y sólidos

Se determinó el contenido de humedad y sólidos totales en una estufa Heratherm (Thermo Scientific, USA), llevando a peso constante crisoles de porcelana, posteriormente se colocó 10 g del BSG en cada crisol (P_{mh}). Se sometió a calentamiento a 105 °C por un periodo mínimo de 12 h, después del calentamiento se colocaron los crisoles en un desecador por 20 min para pesar, y después volver a colocarlos en el desecador durante 20 min y pesar nuevamente (P_1) con el fin de no tener diferencia mayor que 0.0005 g, y así determinar el contenido de humedad y sólidos totales (ST) empleando las siguientes ecuaciones:

$$\% Humedad = \frac{P_{mh} - P_1}{P_{mh}} * 100 \quad (2)$$

$$\% ST = 100 - \% Humedad \quad (3)$$

Para determinar los sólidos totales volátiles (STV), se utilizó la muestra previamente secada y se colocó en la mufla a 550 °C durante 2 h. Posteriormente, se retiró el crisol de la mufla y se colocó en la estufa a 105 °C por 20 min. Transcurrido ese tiempo, los crisoles se llevaron a un desecador para bajarles la temperatura y pesarlos, hasta obtener peso constante (P_2). El contenido de STV se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% STV = \frac{P_1 - P_2}{P_{mh}} * 100 \quad (4)$$

3.2.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología superficial del BSG con y sin pretratamiento alcalino se analizó mediante SEM utilizando un equipo JEOL JSM-6510LV. Para poder analizar la morfología de las muestras, estas fueron secadas a 60 °C durante 24 h y posteriormente se molieron y tamizaron. Para el análisis las muestras fueron recubiertas con oro. Las micrografías se obtuvieron operando el microscopio a un voltaje de aceleración de 20 kV, con un aumento de 300x, para comparar los cambios en la estructura de la superficie del material.

Por otro lado, se empleó el equipo JEOL 5900-LV para analizar las muestras del BSG después de llevar a cabo la sacarificación con la mezcla de enzimas, para esto la mezcla se secó a 60 °C durante 24 h y posteriormente se molió y tamizó. Las micrografías se obtuvieron operando el microscopio a un voltaje de aceleración de 20 kV, con un aumento de 100x.

3.2.4.3 Espectroscopía FTIR

Los cambios en los grupos funcionales de la biomasa lignocelulósica se evaluaron mediante FTIR utilizando un espectrómetro Shimadzu modelo IRTracer-100. Las muestras fueron preparadas tal como se menciona en el punto anterior. Los

espectros fueron registrados en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} .

3.2.4.4 Composición de las fibras

Para conocer la composición de hemicelulosa, celulosa y lignina del BSG, se empleó el método Van Soest (Van Soest et al., 1991), en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de los Alimentos en la Facultad de Agronomía de la UANL, para el cual lo primero que se realizó fue secar a 60°C una muestra del material, luego se molió y tamizó, para tener un tamaño de partícula menor a 2 mm y homogéneo. Posteriormente, se pesó y colocó en bolsas (FibreBag) aproximadamente 0.5 g del BSG seco, y se colocó la muestra a tratamiento con una solución de detergente neutro, para remover compuestos solubles. El residuo obtenido corresponde a la fracción fibra detergente neutra (FDN), que incluye hemicelulosa, celulosa y lignina. Posteriormente, el material que siguió en la bolsa se trató con una solución de detergente ácido, para solubilizar la hemicelulosa, obteniendo la fracción de fibra detergente ácida (FDA), compuesta por celulosa y lignina. Finalmente, la fracción FDA se trató con ácido sulfúrico concentrado, para eliminar la celulosa y obtener sólo la lignina.

3.3 Pretratamientos alcalino y enzimático de BSG

Como parte inicial del pretratamiento se acondicionó/preparó el BSG realizando el secado a 105 °C durante 48 h empleando la estufa modelo HERATHERM marca Thermo Scientific. Posteriormente al secado, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente por 20 min, para enseguida moler el BSG en la licuadora Waring Commercial Blender con la finalidad de obtener un tamaño de partícula inferior a 0.84 mm empleando tamiz de latón y acero alza aprobados por ASTM-AASHO, para su posterior uso en el pretratamiento alcalino y sacarificación.

3.3.1 Pretratamiento alcalino

El pretratamiento alcalino del BSG, se llevó a cabo comparando cuatro concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH), las cuales fueron 0.2, 0.5, 1 y 5 %p/v y dos relaciones de carga sólida, 5 y 10 %p/p, para lo cual la biomasa previamente tamizada se colocó en matraces Erlenmeyer de 125 mL y en cada uno se agregó el volumen de solución alcalina requerida para alcanzar las relaciones de carga sólida antes mencionadas (véase Tabla 1). Posteriormente, los matraces fueron cubiertos con un paño estéril y se colocaron en la autoclave para llevar a cabo el tratamiento a 120 °C durante 30 min, de acuerdo con lo mencionado por Fernández-Delgado et al.(2019).

Después del pretratamiento el contenido del matraz fue colocado en capsulas para centrifugar, con el fin de separar la fase líquida de la sólida. La fase líquida fue caracterizada para conocer la cantidad de azúcares reductores (AR) por el método DNS (Miller, 1959) y carbohidratos totales (CHT) por el método fenol-sulfúrico (DuBois et al., 1956). La fase sólida fue colocada en una charola y secada a 60 °C por 48 h, para extraer una muestra pequeña para caracterizarla mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), espectrofotometría de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y conocer la composición de la fibra por el método Van Soest (ver Figura 7). El material sólido restante de la condición con mejor respuesta fue empleado para la parte de la hidrólisis enzimática.

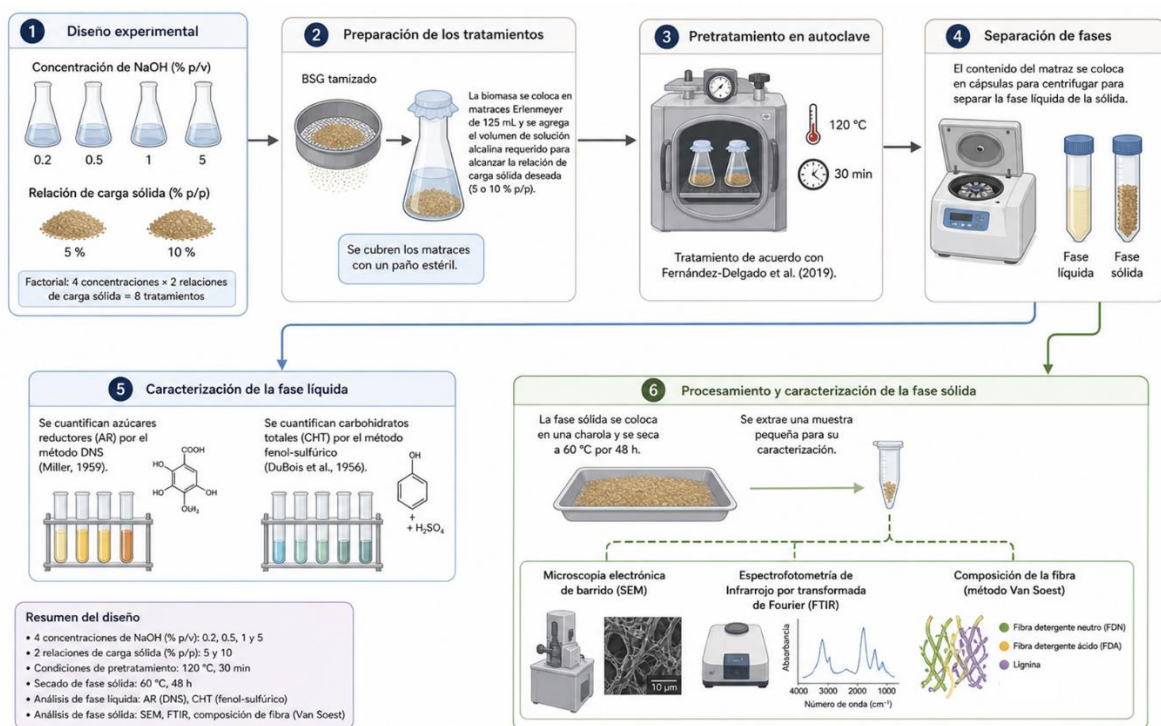


Figura 7. Diagrama de la metodología empleada para llevar a cabo el pretratamiento alcalino del BSG. Generado con apoyo de ChatGPT.

3.3.2 Sacarificación

3.3.2.1 Sacarificación empleando Viscozyme L

Para la hidrólisis del BSG, se utilizó el sustrato pretratado en medio alcalino (0.5 % p/v y relación carga sólida 10 %p/p) secado a 60 °C en una estufa por 24 h, con el fin de retirar la humedad que pudiera tener. Posteriormente, se colocó el BSG en matraces de 250 mL, y se añadió el buffer de citrato 50 mM (pH 4.4) en una relación sólido/líquido 1:10 (Galindo Hernández, 2017). Se estudió la influencia del pH en el intervalo de 4.5 a 5.5, ya que es donde se presenta mejor actividad enzimática por parte de la enzima Viscozyme L (Sørensen et al., 2003), para ello se realizó el ajuste del pH, previo a la adición del volumen de enzima correspondiente y enseguida se procedió con la incubación a 37°C en un equipo Thermo Scientific modelo MaxQ 4000 (Figura 8). Para conocer la cantidad de enzima Viscozyme L utilizada en cada experimento se relacionó la actividad enzimática del biocatalizador (100 FBUG/g), la densidad (1.2 g/mL) y la cantidad de sólidos totales (ST) del sólido pretratado alcalinamente (Rosset et al., 2012), resultando que la dosis adecuada de enzima es

de 0.146 mL/g BSG seco. Finalmente, para cada experimento se midieron los AR liberados a cuatro diferentes tiempos 0, 2, 4 y 24 h.



Figura 8. Diagrama de la metodología empleada para la hidrólisis enzimática del BSG.

3.3.2.2 Sacarificación empleando Ultraflo L

Como parte del trabajo, también se estudió la hidrólisis enzimática con Ultraflo L. La cantidad de BSG y las condiciones experimentales son las mismas que se describen en la sección 3.2.3.1, pero la relación de enzima/sustrato fue de 10% p/p de acuerdo con Sørensen et al. (2003). De igual manera, la concentración de AR se evaluó a 0, 2, 4 y 24 h.

3.2.3.3 Sacarificación empleando mezcla de enzimas

Se realizó la hidrólisis enzimática de la muestra expuesta al pretratamiento alcalino, pero mezclando las enzimas Viscozyme L y Ultraflo L en proporción 16:9. El pH inicial se ajustó 4.5, y a partir de los resultados se calculó el grado de sinergismo (GS) del proceso de sacarificación por medio de la ecuación 1.

La Tabla 1 presenta la nomenclatura de muestras y las condiciones experimentales evaluadas. La muestra BSG corresponde al material sin tratamiento mientras que A1 a A8 representan las combinaciones de cuatro concentraciones de NaOH (0.2, 0.5, 1 y 5% p/v) y dos relaciones sólido / líquido (5 y 10 % p/p). A partir de esos ensayos se seleccionó A4 para los ensayos de sacarificación con las enzimas Viscozyme L (A4S-EV), Ultraflo L (A4S-EU) y la mezcla de ambas (A4S-Mix) y las muestras control corresponden a muestras sin tratamiento alcalino sometidas a hidrólisis enzimática (Control-EV y Control-EU).

Tabla 1 Nomenclatura y condiciones experimentales de las muestras de BSG secas y tamizadas durante el pretratamiento alcalino a 121°C y la hidrólisis enzimática a 37°C, 150 rpm y pH de 4.5

Muestra	Pretratamiento alcalino		Tratamiento enzimático
	Relación sólido/líquido (%p/p)	Concentración NaOH (%p/v)	
BSG	NA	NA	NA
A1	5	0.2	N/A
A2	10	0.2	N/A
A3	5	0.5	N/A
A4	10	0.5	N/A
A5	5	1	N/A
A6	10	1	N/A
A7	5	5	N/A
A8	10	5	N/A
Control-EV	NA	NA	Viscozyme L
Control-EU	NA	NA	Ultraflo L
A4S-EV	10	0.5	Viscozyme L
A4S-EU	10	0.5	Ultraflo L
A4S-Mix	10	0.5	Viscozyme L + Ultraflo L

3.3.3 Caracterización del tratamiento químico y enzimático

3.3.3.1 pH

La medición del pH fue realizada in situ, colocando el electrodo del potenciómetro directo en la solución y se midió y registró el valor de pH. Para la calibración de los potenciómetros utilizados se emplearon soluciones buffer de pH 4, 7 y 10, cabe mencionar que los equipos utilizados ya realizaban la corrección por temperatura.

3.3.3.2 Carbohidratos totales

Para determinar los carbohidratos totales se empleó el método fenol-sulfúrico también conocido como método de Dubois (1956).

Procedimiento:

1. Se tomó una alícuota de la muestra a analizar y se diluyó en agua destilada, esto con el fin de que la medición entre en el rango de la curva que va de 0 a 100 mg/L.
2. Posteriormente se tomó 1 mL de la muestra anteriormente preparada y se colocó en un tubo de ensayo.
3. Enseguida se agregó al tubo 0.5 mL de fenol al 5% y luego se añadieron 3.5 mL de H₂SO₄ concentrado.
4. Después el tubo de ensayo fue limpiado y colocado en vórtex por 8 seg para homogenizar la muestra.
5. Luego la muestra es colocada en un baño de agua fría por 5 a 8 min para atemperar la muestra.
6. Finalmente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-vis modelo Lambda 365 a una longitud de onda de 490 nm, empleando un blanco preparado de la misma manera solo que con agua destilada

3.3.3.3 Azúcares reductores

Para cuantificar los azúcares reductores presentes en las muestras analizadas se empleó el método DNS (Miller, 1959), el cual se encuentra fundamentado en una reacción colorimétrica, esto se debe a que el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) al reaccionar con los azúcares cambia el color de amarillo a naranja oscuro en función de los mismo empleando calor. La solución DNS se preparó colocando en un matraz Erlenmeyer 1.6 g de NaOH disueltos en agua destilada, para posteriormente añadir 1 g de DNS con agitación y 30 g de tartrato de sodio y potasio al medio. Finalmente, cuando la solución está completamente disuelta, se traspasa a un matraz de aforación y se afora a 100 mL con agua destilada.

Procedimiento:

1. Se tomó una alícuota de la muestra a analizar y se diluyó en agua destilada, esto con el fin de que la medición entre en el rango de la curva que va de 0 a 1000 mg/L.
2. Posteriormente se tomó 1 mL de la muestra anteriormente preparada y se colocó en un tubo de ensayo.
3. Enseguida se agregó al tubo 1 mL de la solución DNS, se tapó y colocó a baño maría por 5 min.
4. Transcurrido los 5 min la muestra es colocada en un baño de agua fría por 5 min para atemperar la muestra.
5. Después el tubo se secó y se colocó en el vórtex por 8 seg.
6. Finalmente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-vis modelo Lambda 365 a una longitud de onda de 540 nm, empleando un blanco preparado de la misma manera solo que con agua destilada.

3.3.3.4 Composición de las fibras

Para el análisis de la composición de hemicelulosa, celulosa y lignina, en el BSG pretratado alcalinamente se tomaron muestras y se realizó lo mencionado en la sección 3.2.4.6.

3.4 Fermentación

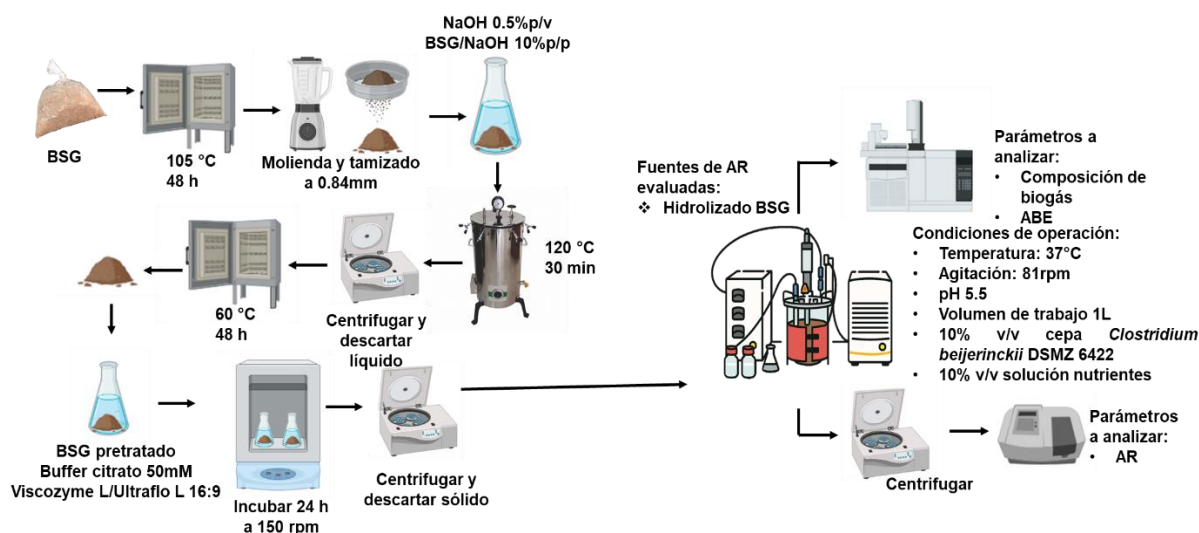
3.4.1 Medición de biogás

La producción de biogás obtenido en el proceso fermentativo fue medida empleando el método de desplazamiento de columna de agua (Reyna-Gómez et al., 2019), utilizando una probeta graduada de 600 mL.

3.4.2 Descripción del sistema experimental

Reactor en lote

Se realizó pruebas del proceso fermentativo en un fermentador Sartorius modelo Biostat A, con capacidad de 5 L, empleando como volumen de trabajo 1 L. El medio de fermentación se formuló con el hidrolizado obtenido del proceso de sacarificación mediante una mezcla de enzimas, que se diluyó hasta alcanzar una concentración inicial de 7.500 mg/L de AR. El hidrolizado diluido se suplementó con una solución mineral cuya composición en g/L es KH_2PO_4 (4.4), K_2HPO_4 (1), KCl, (1), NaCl (1), MgCl (0.5). Antes de la inoculación, el medio de cultivo se purgó con gas nitrógeno durante 10 minutos para establecer condiciones anaeróbicas. La temperatura dentro del reactor fue 37 °C, el pH inicial de 5.5 y la agitación mecánica fue de 81 rpm (véase Figura 9). Cabe mencionar que se dejó programado en el software que el pH pudiera oscilar en un intervalo de 6.0 a 5.0. Durante las pruebas de fermentación se realizaron mediciones de pH, AR, biogás, AGVs y solventes a diferentes tiempos (0, 4, 24, 48 y 72 h).



Reactor en lotes con renovación parcial del medio

Posteriormente, se replicaron las condiciones del experimento anterior con el que se obtuvieron mejores resultados, con la única variación del ajuste del pH entre ciclos (véase Tabla 2).

Tabla 2. Nomenclatura y condiciones de los experimentos por ciclos de 72 h realizados

Muestra	Concentración de AR (g/L)	Ajuste de pH entre ciclos
AR 7	7	No
AR 14	14	No
AR 14 5.5	14	Sí

3.4.3 Caracterización fisicoquímica del fermentado y subproductos

3.4.3.1 pH

El pH se monitoreó en todo el transcurso del proceso fermentativo por medio de un sensor de pH colocado dentro del reactor, y el software del equipo cuenta con un controlador de este, el ajuste del pH se realizó de manera automática por parte del software con soluciones de NaOH 1 N y H₂SO₄ 1 N.

3.4.3.2 Hidrógeno

Para la toma de muestra gaseosa se emplearon jeringas de 10 mL para extraer una muestra de la probeta graduada y almacenar el gas en tubos a vacío para su posterior análisis por cromatografía.

Los productos gaseosos de fermentación como hidrógeno y dióxido de carbono (CO₂) se analizaron por cromatografía de gases en un equipo Agilent Technologies® modelo 7820A con detector de conductividad térmica (TCD). Este análisis se realizó en condiciones isotérmicas (40°C) empleando el TCD y una columna capilar modelo CP7429, además la temperatura del inyector y del analizador fueron 230 °C.

3.4.3.3 Modelo de Gompertz

Los resultados de la producción acumulada de hidrógeno obtenido de los ensayos experimentales sin ciclos de alimentación fueron ajustados con la ecuación modificada de Gompertz (5) (Yumnam & Debnath, 2023), el cual refleja la fase de

adaptación inicial (λ), la tasa máxima de producción ($R_{\max}$) y el potencial máximo de producción ($H_{\max}$).

$$H_{H_2}(t) = H_{\max} \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{\max} e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (5)$$

Los valores de $H_{\max}$, $R_{\max}$ y λ se obtuvieron mediante un ajuste de mínimos cuadrados usando la función Solver de Excel.

3.4.3.4 Producción de Ácidos grasos volátiles (AGVs), acetona, butanol y etanol

Para la cuantificación de los productos líquidos de la fermentación se tomaron muestras con una jeringa de 10 mL colocada en una de las salidas del biorreactor y que tiene conexión hasta el fondo de este. La muestra fue filtrada con un filtro para jeringa y depositada en viales de 2 mL para su posterior análisis.

Los productos líquidos de la fermentación como los AGV's y los solventes se analizaron por cromatografía en un equipo Agilent Technologies® modelo 7820A con el detector de ionización de flama (FID) y argón como gas acarreador. Para el análisis se empleó una columna HP-INOWAX y se utilizó una rampa de 10°C/min desde 70 a 180 °C. La temperatura del inyector y del analizador se mantuvo en 250 °C (Cruz-López et al., 2022).

3.5 Producción de hidrógeno con microbiota nativa

3.5.1 Medición de biogás

El volumen de biogás producido durante la fermentación fue determinado mediante el método de desplazamiento de agua usando una solución salina saturada y probetas graduadas de 1000 mL.

3.5.2 Descripción del sistema experimental

El BSG fue empleado tal como se recibe la muestra, es decir, en estado fresco para la fermentación con su microbiota nativa. La fermentación fue llevada a cabo en biorreactores de 1 L, con un volumen de trabajo de 600 mL. Los reactores se alimentaron con BSG, ajustando el contenido de ST al 10 %p/v con agua, los cuales se operaron en dos ciclos de 3 días cada uno, al terminar el primero, se extrajo del sistema la fracción líquida y se reemplazó por un medio de nutrientes con la siguiente composición por litro: urea 1.02 g, CaCl_2 0.41 g y KH_2PO_4 0.11 g. En cada ciclo el pH inicial se ajustó a 6.5 con una solución de NaOH 5 N o HCl 5 N y la temperatura se mantuvo constante en 37 °C durante todo el experimento (ver Figura 10). Se tomaron muestras del gas y del líquido de forma periódica.

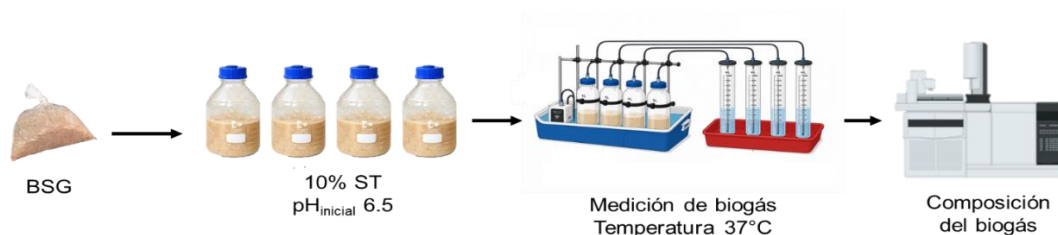


Figura 10. Diagrama del método para realizar la fermentación con la microbiota nativa del BSG.

3.5.3 Caracterización fisicoquímica de fermentado y subproductos

3.5.3.1 pH

El pH fue medido in situ, como se describe en la sección 3.3.3.1.

3.5.3.2 Hidrógeno

La composición del biogás se determinó usando un cromatógrafo de gas (SRI 8610C, Instruments, Torrance, CA, EUA) equipado con un detector de conductividad térmica y dos columnas (6' x 1/8" columna empacada de silica gel y

6' x 1/8"columna empacada molecular sieve 13 x). La temperatura del inyector y detector fueron 90 °C y 150 °C, respectivamente. Se empleó como gas acarreador nitrógeno con un flujo de 20 mL/min (Alvarez-Guzmán et al., 2025).

3.5.3.3 Producción de metabolitos

Las muestras líquidas se centrifugaron a 15000 rpm por 5 min. Luego se filtró el líquido empleando filtros de membrana de 0.45 µm, para cuantificar metabolitos como lactato, acetato, formiato, succinato y butirato. Las concentraciones de estos ácidos orgánicos fueron determinadas usando un sistema de HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector de matriz de diodos con una longitud de onda de detección de 210 nm, un detector de índice de refracción y una columna AMINEX HPX-87 H. Se utilizó una solución 0.005 M de H₂SO₄ como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min con una temperatura de la columna de 50 °C (Alvarez-Guzmán et al., 2025).

3.6 Rendimiento y productividad

En los sistemas de fermentación, la eficiencia del proceso es un factor determinante para su viabilidad. La capacidad de un microorganismo para transformar sustratos en productos de interés depende no solo de sus características metabólicas, sino también de las condiciones operativas bajo las cuales se desarrolla el cultivo. En este contexto, el análisis del rendimiento y la productividad permite evaluar el desempeño del sistema. El rendimiento se relaciona con la conversión del sustrato en productos deseados, mientras que la productividad mide la rapidez con la que estos productos son generados en el tiempo.

En cuestión de rendimiento para el caso del hidrógeno se obtuvo mediante la siguiente ecuación para el caso de las fermentaciones con hidrolizado

$$Rendimiento_{H_2} = \frac{mL \text{ de } H_2 \text{ producidos}}{g \text{ AR consumidos}} \quad (6)$$

Para el caso de las fermentaciones con la microbiota natural también se calculó de la siguiente manera

$$Rendimiento_{H_2} = \frac{mL \text{ de } H_2 \text{ producidos}}{g \text{ biomasa empleada}} \quad (7)$$

Por otro lado, el rendimiento para el butanol fue obtenido con la siguiente ecuación

$$Rendimiento_{Butanol} = \frac{g \text{ de butanol producidos}}{g \text{ AR consumidos}} \quad (8)$$

Asimismo, para la productividad del hidrógeno se realizó el siguiente cálculo

$$Productividad_{H_2} = \frac{mL \text{ de } H_2 \text{ producidos}}{L * h} \quad (9)$$

De manera similar, la productividad del butanol fue determinada de la siguiente manera

$$Productividad_{Butanol} = \frac{g \text{ de butanol producidos}}{L * h} \quad (10)$$

3.7 Análisis molecular e identificación de especies

3.7.1 Extracción de ADN

Como parte del objetivo de identificar las especies de bacterias presentes en los reactores que produjeron hidrógeno y butanol, se realizó la extracción de ácidos nucleicos a las muestras. Con el fin de conocer la variación de estos en el proceso fermentativo fueron analizadas a diferentes tiempos del mismo ensayo. Para la realización de la extracción de ADN se partió de 600 µL de muestra y se realizó la extracción siguiendo los pasos del kit DNeasy PowerSoil de QIAGEN, que consiste en realizar la lisis celular empleando métodos mecánicos y químicos. Durante la lisis celular se procede a la destrucción de las estructuras formadas por lípidos y proteínas permitiendo la liberación de ácidos nucleicos del núcleo celular. En presencia de ciertas sales los ácidos nucleicos quedan unidos por adsorción, el ADN genómico es capturado en una membrana de sílica colocada en una columna de centrifugado (Reyna Gómez, 2021). Posteriormente el ADN se lava y finalmente se eluye de la membrana (ver Figura 11).

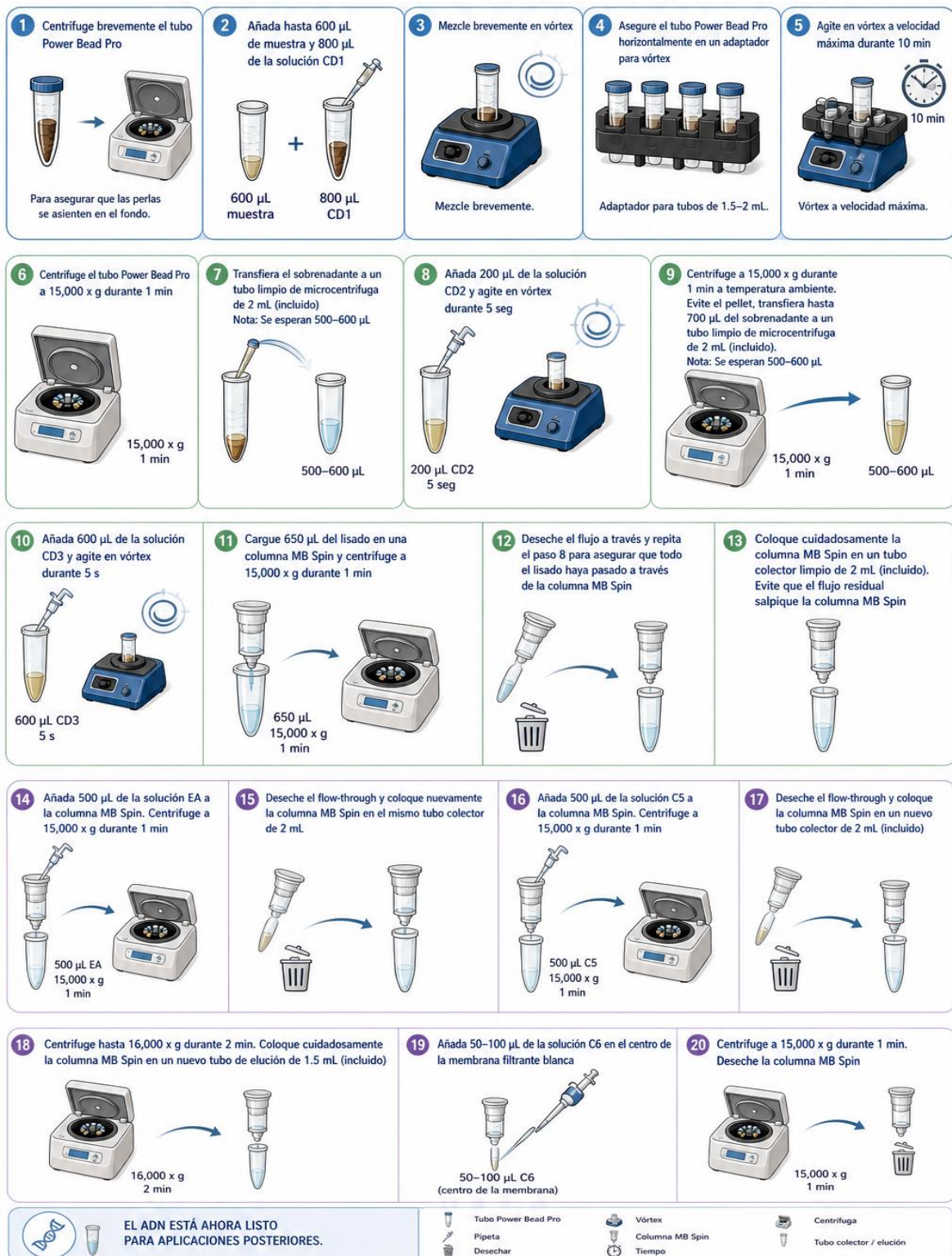


Figura 11. Diagrama de la metodología empleada para llevar a cabo la extracción de ADN. Generado con apoyo de ChatGPT.

3.7.2 Secuenciación del gen ARNr 16S y procesamiento de datos

Para la identificación de las especies presentes en las muestras analizadas se obtuvieron por secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S V1-V3 el cual es específico para bacterias, utilizando dos primers (forward primer 27Fmood y reverse primer 519R), el análisis fue realizado por el Integrated Microbiome Resource, Halifax, Canadá. Las secuencias de nucleótidos se analizaron utilizando el paquete de software DADA2 v3.22 implementado en R v4.5.3 para eliminar los datos de baja calidad e identificar variantes de secuencia de amplicones (ASV). Se utilizó SILVA v138 para la asignación taxonómica.

3.7.3 Tinción de Gram

Se realizó una tinción de Gram con el fin de observar la morfología y verificar la pureza del microorganismo empleado en el proceso de fermentación. Para ello, se colocó una muestra del cultivo sobre un portaobjetos limpio, se dejó secar al aire y posteriormente se fijó mediante calor. Enseguida, se aplicó cristal violeta durante 1 min, se enjuagó con agua destilada y se añadió lugol durante 1 min. Posteriormente, se realizó la decoloración con alcohol durante 15 a 20 seg y se enjuagó nuevamente. Finalmente, se aplicó safranina durante 1 min, seguido de un último lavado y secado. La observación se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Caracterización fisicoquímica del BSG

La Tabla 3 presenta el contenido de humedad y las fracciones fibrosas del BSG de la toma de muestra. Los datos indicaron un contenido de humedad del 80.13 ± 0.42 %, y la composición química en base seca consistió en un 44.82 ± 0.21 % de hemicelulosa, un 16.75 ± 0.01 % de celulosa y un 9.17 ± 0.02 % de lignina. En comparación con informes anteriores, este contenido de humedad se encuentra dentro del intervalo característico de 77.32 a 83.50 % para el BSG recién generado del proceso de elaboración de cerveza, que se origina como residuo del macerado de grano malteado (es decir, la mezcla de grano molido con agua caliente para extraer azúcares fermentables) (Lynch et al., 2016). Del mismo modo, la composición lignocelulósica del BSG (celulosa 16.75 ± 0.01 %, hemicelulosa 44.82 ± 0.21 % y lignina 9.17 ± 0.02 %), concuerda con las tendencias descritas en estudios de otras regiones del mundo, tal y como lo documentan Mitri et al. (2022) y Lojananan et al. (2024).

En otros estudios se ha descrito una mayor variabilidad en la composición química del BSG, con contenidos de lignina que oscilan entre el 17.13 % y el 26.50 %, de hemicelulosa entre el 17.11 % y el 41.91 %, y de celulosa entre el 19.78 % y el 37.17 %. Estas discrepancias pueden atribuirse a factores como el período de cosecha, el cultivar de cebada, las condiciones de maceración y malteado, y los suplementos añadidos durante la producción de cerveza (Silbir & Goksungur, 2019; Wilkinson et al., 2014). En consecuencia, la eficiencia de la extracción de azúcares durante la elaboración de la cerveza influye en la composición del BSG residual, en particular en sus fracciones de hemicelulosa y celulosa (Mussatto, 2014).

El alto contenido de hemicelulosa (44.82 ± 0.21 %) en el BSG utilizado en este estudio indica un potencial sustancial para la liberación de azúcares fermentables, ya que esta fracción puede hidrolizarse para producir xilosa y otros azúcares derivados de la hemicelulosa. Sin embargo, la lignina actúa como una barrera estructural que restringe el acceso de las enzimas hidrolíticas a los polisacáridos (Lynch et al., 2016). Por lo tanto, el pretratamiento alcalino es esencial para

promover la despolimerización parcial de la lignina, mejorar la accesibilidad a la celulosa y la hemicelulosa y, de ese modo, mejorar la eficiencia de la sacarificación enzimática.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del BSG.

Humedad	Celulosa*	Hemicelulosa*	Lignina*	Otros*	Referencias
(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
80.13 ± 0.42	16.75 ± 0.01	44.82 ± 0.21	9.17 ± 0.02	29.26	Este trabajo
-	26.50	41.91	26.50	42.66	(Amensisa et al., 2024)
-	20.86 ± 0.60	24.49 ± 0.91	11.99 ± 0.40	57.34	(Lojananan et al., 2024)
83.5±0.23	19.78 ±0.82	17.11±1.86	19.65±0.25	43.46	(Belardi et al., 2023)
80.0	16.25	28.35	7.27	48.13	(Mitri et al., 2022)
77.32	37.17	26.80	17.13	18.90	(Coronado et al., 2020)

*Nota: Los porcentajes son en base seca.

4.2 Pretratamiento alcalino

4.2.1 Carbohidratos totales

Se determinó el contenido de CHT en los dos grupos de hidrolizados alcalinos (obtenidos con relaciones sólido/líquido del 5 % y del 10 % p/p) en función de la concentración de NaOH. El análisis de varianza (ANOVA) puso de manifiesto que tanto la relación sólido/líquido como la concentración de NaOH influían de manera significativa en la liberación total de carbohidratos ($p < 0.001$). Entre los factores evaluados, la concentración de NaOH fue la variable dominante, ya que explicaba aproximadamente el 89 % de la variabilidad, mientras que la relación sólido/líquido contribuía en torno al 11 %. Como se muestra en la Figura 12a, el aumento de la concentración de NaOH dio lugar a un incremento de las concentraciones de CHT, que pasaron de 6,894 a 10,396 mg/L en ambas series experimentales. Este aumento se debe a la capacidad del medio alcalino para solubilizar los componentes lignocelulósicos del BSG, como la hemicelulosa y los oligómeros derivados. Por lo tanto, el contenido de CHT en la fase líquida aumentó. Además, el pretratamiento alcalino induce reacciones que rompen los enlaces éster entre la hemicelulosa y la lignina, lo que da lugar a la solubilización de la lignina y a una mayor exposición de la celulosa (Brodeur et al., 2011).

Sin embargo, elevar la relación sustrato/solución al 10 % p/p no dio lugar a un aumento sustancial de la concentración de CHT, ya que los incrementos observados en los experimentos A2, A4 y A6 no superaron el 13 % en comparación con A1, A3 y A5. A concentraciones de NaOH ≥ 1.0 % p/v, la elevada viscosidad de las mezclas impidió el análisis eficaz de las muestras.

4.2.2 Azúcares reductores

En la Figura 12b se muestran los rendimientos de AR obtenidos después de la exposición del pretratamiento alcalino de BSG en función de la relación sólido/líquido (5 y 10 % p/p) y de las concentraciones de NaOH (0.2, 0.5, 1.0 y 5.0 % p/v). En la presente investigación se observó el efecto de la concentración de NaOH sobre la producción de AR durante el pretratamiento alcalino de BSG. El análisis de varianza (ANOVA) reveló que tanto la relación sólido-líquido como la

concentración de NaOH afectaban significativamente a la liberación de azúcares reductores ($p < 0.05$). Sin embargo, se identificó la relación sólido/líquido como el factor dominante, ya que explicaba aproximadamente el 75.3 % de la variabilidad, mientras que la concentración de NaOH contribuía en torno al 24.7 %. El efecto significativo de la relación sólido/líquido puede estar relacionado con las diferencias en la disponibilidad de reactivos y los fenómenos de transferencia de masa durante el pretratamiento. Una mayor disponibilidad de líquido puede mejorar la penetración del álcali en la estructura de la biomasa, lo que favorece una ruptura más eficaz de la red lignocelulósica y, en consecuencia, potencia la liberación de azúcares. Cuando se seleccionó una relación sólido/líquido del 5 % p/p, las concentraciones más bajas de NaOH favorecieron una mayor liberación de azúcares reductores (A1, 620.7 ± 80.5 mg/L y A3, 934.6 ± 117.4 mg/L) en comparación con las concentraciones más altas (A5, 343.2 ± 66.2 mg/L y A7, 270.6 ± 3.1 mg/L). Este comportamiento concuerda con estudios previos (Babu et al., 2022; Macheiner et al., 2003), en los que la hidrólisis del BSG a concentraciones de NaOH inferiores al 1.0 % (p/v) promovió la solubilización no solo de monosacáridos y disacáridos, sino también de otros compuestos. Babu et al. (2022) explicaron que los medios alcalinos atacan la fibra de lignina en el BSG, lo que favorece la hidrólisis de la celulosa. Por otra parte, la evaluación del impacto de la relación sólido/líquido (5 y 10 % p/p) a diferentes concentraciones de NaOH (Figura 12a) reveló que elevar esta relación al 10 % p/p aumentaba la concentración de AR liberada en al menos un 50 % en los experimentos A2 (1162.7 ± 117.0 mg/L), A4 (1404.4 ± 218.9 mg/L) y A6 (1345.8 ± 3041 mg/L). Esta mejora puede atribuirse a la mayor cantidad de biomasa disponible para la degradación química. Además, se confirmó la tendencia observada anteriormente: el aumento de la concentración de NaOH (≥ 1.0 % p/v) no produjo un incremento sustancial en la liberación de AR. Es importante señalar que, dentro de este rango de concentraciones de NaOH, se observaron alteraciones en la densidad y la viscosidad de las mezclas. Estas alteraciones dificultaron la separación de la fase líquida de la fase sólida para su posterior procesamiento. Este fenómeno constituye una limitación operativa significativa, que podría comprometer la

eficiencia de la recuperación del hidrolizado y su manejo en los procesos posteriores.

Las concentraciones totales de carbohidratos fueron superiores a las de azúcares reductores en todas las condiciones de pretratamiento. La relación AR/CHT osciló entre el 3.4 % y el 15.8 %, lo que indica que solo una pequeña fracción de los carbohidratos solubilizados estaba presente en forma de azúcares reductores. Esto sugiere que la mayor parte de los carbohidratos liberados durante el pretratamiento alcalino permaneció en forma de oligosacáridos o polisacáridos parcialmente despolimerizados, en lugar de hidrolizarse completamente en azúcares monoméricos.

La mayor concentración de CHT se obtuvo con NaOH al 1.0 % y una relación sólidos/líquido del 5 %; sin embargo, la relación AR/CHT fue solo del 3,56 %, lo que indica una conversión limitada en azúcares reductores. Por el contrario, el tratamiento con NaOH al 0.5 % con una relación sólidos/líquido del 10 % alcanzó la relación AR/CHT más elevada (15.8 %), lo que sugiere un mayor grado de despolimerización de los carbohidratos. Por lo tanto, la solubilización de los carbohidratos y la generación de azúcares reductores no se correlacionaron directamente, lo que pone de relieve que la eficacia del pretratamiento dependía no solo de la cantidad de carbohidratos liberados, sino también del grado de descomposición de los polímeros.

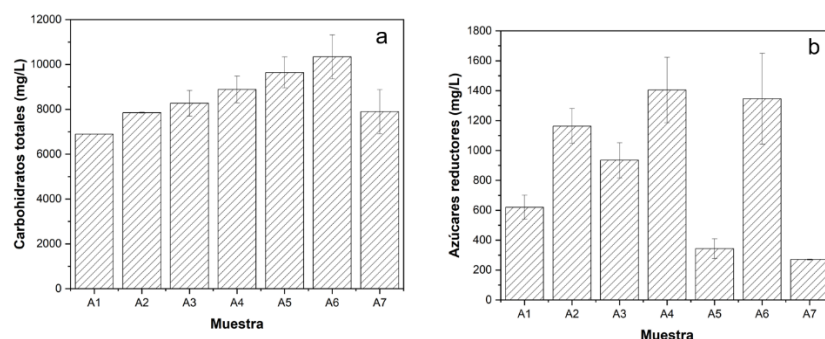


Figura 12. Efecto del pretratamiento alcalino en la liberación a) de CHT y b) de AR. Nota: La muestra A8 no fue analizada debido a su alta viscosidad, que impidió la separación de la fase líquida de la sólida.

4.2.3 Análisis morfológico

La Figura 13 muestra micrografías SEM de la fracción sólida del BSG sin tratar y tras el pretratamiento alcalino en las dos relaciones sólido/líquido analizadas (5 % y 10 % p/p). La micrografía del BSG sin tratar (Figura 13a) muestra una estructura compuesta principalmente por láminas lisas apiladas y recubiertas de material particulado disperso. Sin embargo, la morfología del BSG presenta una variación considerable entre las distintas muestras y estudios. Por ejemplo, Mussatto et al. (2006) lo describieron como compuesto por numerosos tejidos fibrosos o una estructura voluminosa en capas en la superficie del grano, mientras que Cheng et al. (2012) y Kan et al. (2018) caracterizaron la superficie como rugosa y porosa.

En el caso del BSG sometido a un pretratamiento alcalino, las muestras A1 y A3 (Figura 13 b, d) mostraron morfologías con poros irregulares de 7-14 μm , junto con un ligero aumento de la ruptura de las fibras. Según lo descrito por Liu et al. (2023), la inmersión de BSG en solución alcalina favorece la disolución de la biomasa soluble, lo que puede producir pequeñas cantidades de monosacáridos solubles (C. Liu et al., 2023). En comparación, las muestras A5 y A7 (expuestas a concentraciones más altas de NaOH) mostraron una superficie heterogénea con regiones densas adyacentes a estructuras fibrosas hinchadas de varios micrones de espesor (Figura 13f, h). Estas alteraciones morfológicas se deben a la eliminación gradual de la capa externa no celulósica, que incluye hemicelulosa, lignina y otras impurezas (Dos Santos et al., 2015).

En las muestras en las que se utilizó una relación sólido/líquido del 10 % p/p (A2, A4, A6 y A8), el pretratamiento alcalino provocó un efecto más marcado en el BSG, caracterizado por una mayor ruptura de la fibra (Figura 13 c, e, g, i). Estas alteraciones morfológicas se debieron a la solubilización de la lignina, la hemicelulosa y otros componentes no celulósicos, lo que favoreció la apertura estructural y mejoró la accesibilidad de la celulosa (Dos Santos et al., 2015). Sin embargo, las concentraciones elevadas de NaOH, aunque favorecen una mayor ruptura de la matriz, liberan al mismo tiempo compuestos solubles que aumentan la viscosidad de la suspensión y dificultan la manipulación del material pretratado,

como se describe en la sección 4.1.2. En consecuencia, la selección de la concentración de NaOH debe equilibrar la eficacia del pretratamiento con la manejabilidad del hidrolizado (Brodeur et al., 2011).

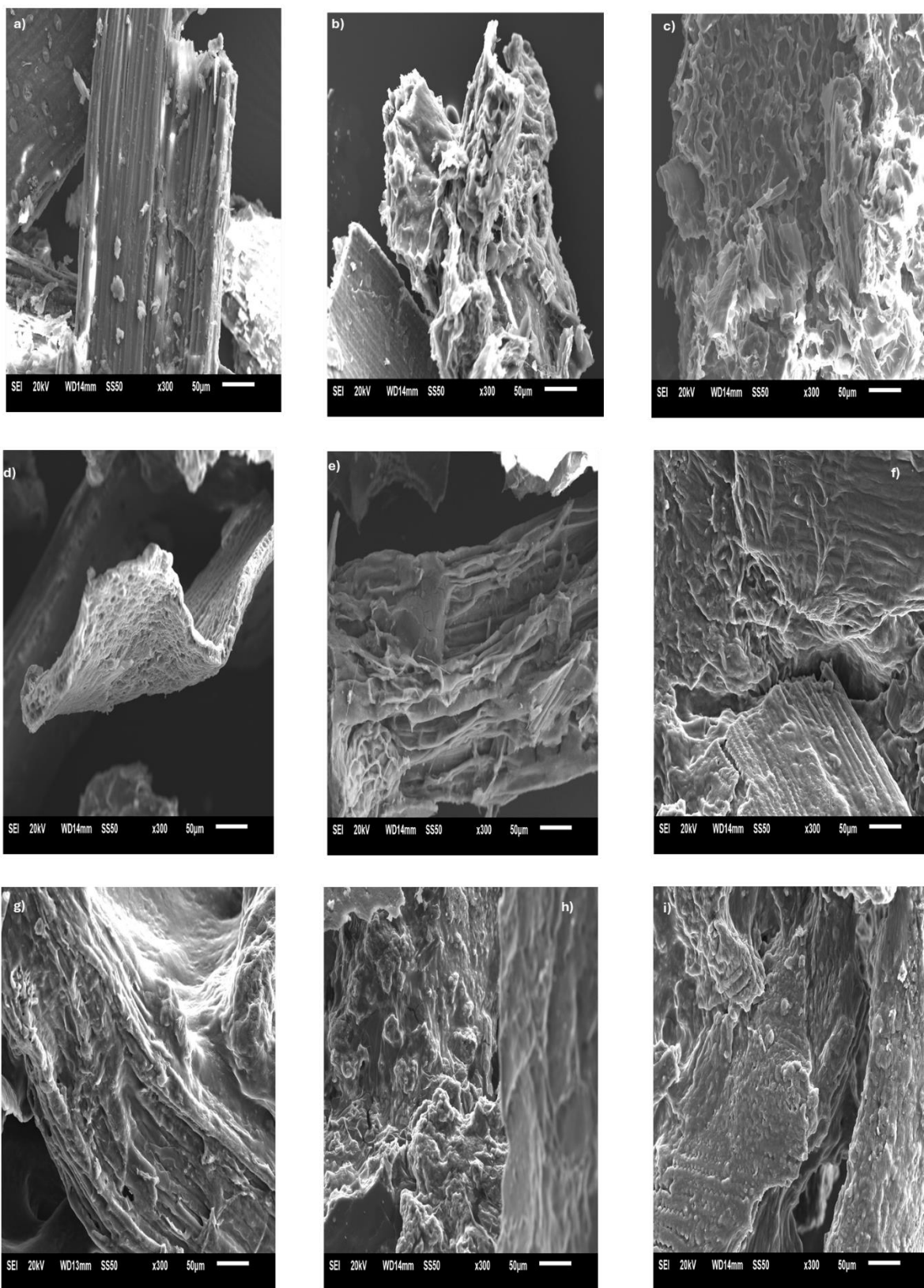


Figura 13. Imágenes SEM (300x) de las muestras a) BSG sin pretratar, b) A1, c) A2, d) A3, e) A4, f) A5, g) A6, h) A7 y i) A8.

4.2.4 Análisis por espectroscopia FTIR

La Figura 14 presenta los espectros FTIR de los dos grupos de muestras de BSG pretratadas con álcali y de la muestra de BSG sin pretratar, con relaciones sólido/líquido del 5 % y el 10 % p/v y concentraciones de NaOH del 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % y 5.0 % p/v. Se estudiaron las bandas características observables en la Figura 14a, la cual corresponde al BSG sin pretratar. Para la primera serie experimental (A1, A3, A5 y A7), la figura 14b muestra una banda a aproximadamente 3313 cm^{-1} , atribuida a las vibraciones de estiramiento O-H y N-H de los grupos hidroxilo y amina. La banda a 2920 cm^{-1} corresponde al estiramiento asimétrico (nCH) de los grupos $-\text{CH}_2$, observándose el estiramiento simétrico a 2850 cm^{-1} . La banda a 1739 cm^{-1} está asociada a las vibraciones de estiramiento C=O de los grupos éster y carboxílico en la lignina y la hemicelulosa. La intensidad de esta banda disminuyó al aumentar la concentración de NaOH, lo que indica la ruptura de estos enlaces durante el pretratamiento. De manera similar, la banda a 1638 cm^{-1} se relaciona con las vibraciones de estiramiento de C=O y los enlaces C=C aromáticos asociados a la lignina (Xu et al., 2025).

Además, la banda a 1590 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento C=C del anillo aromático, lo que (junto con la banda a 1739 cm^{-1}) indica la designificación. La banda a 1526 cm^{-1} se atribuye al estiramiento C=C dentro del anillo aromático de la lignina. La banda a 1458 cm^{-1} representa vibraciones de deformación asimétrica C-H del esqueleto aromático de la lignina. Las bandas a 1238 cm^{-1} y a 1033 cm^{-1} corresponden a estructuras de carbohidratos, concretamente a enlaces glicosídicos C-O-C. Las bandas a 1150 cm^{-1} y 895 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones de celulosa y hemicelulosa, siendo la banda a 895 cm^{-1} característica del enlace β -glicosídico. Estos resultados concuerdan con los hallazgos experimentales descritos en estudios previos sobre lignocelulosa (Belardi et al., 2023; Dos Santos et al., 2015; C. Liu et al., 2023; Pandey et al., 2015; Silbir & Goksungur, 2019; Vaz, 2016; Wagner et al., 2021).

En las series experimentales A2, A4, A6 y A8 (correspondientes a una relación sólido/líquido del 10 % p/p), los espectros FTIR confirmaron que el BSG está

compuesto por una matriz heterogénea que contiene múltiples grupos funcionales típicos de las estructuras lignocelulósicas, tal y como se ha descrito en el párrafo anterior. Sin embargo, la persistencia de picos característicos atribuibles a la hemicelulosa y la celulosa (junto con bandas atenuadas asociadas a la lignina) indica una solubilización parcial de la lignina y, en menor medida, de la hemicelulosa del BSG, lo que mejora la accesibilidad de la celulosa.

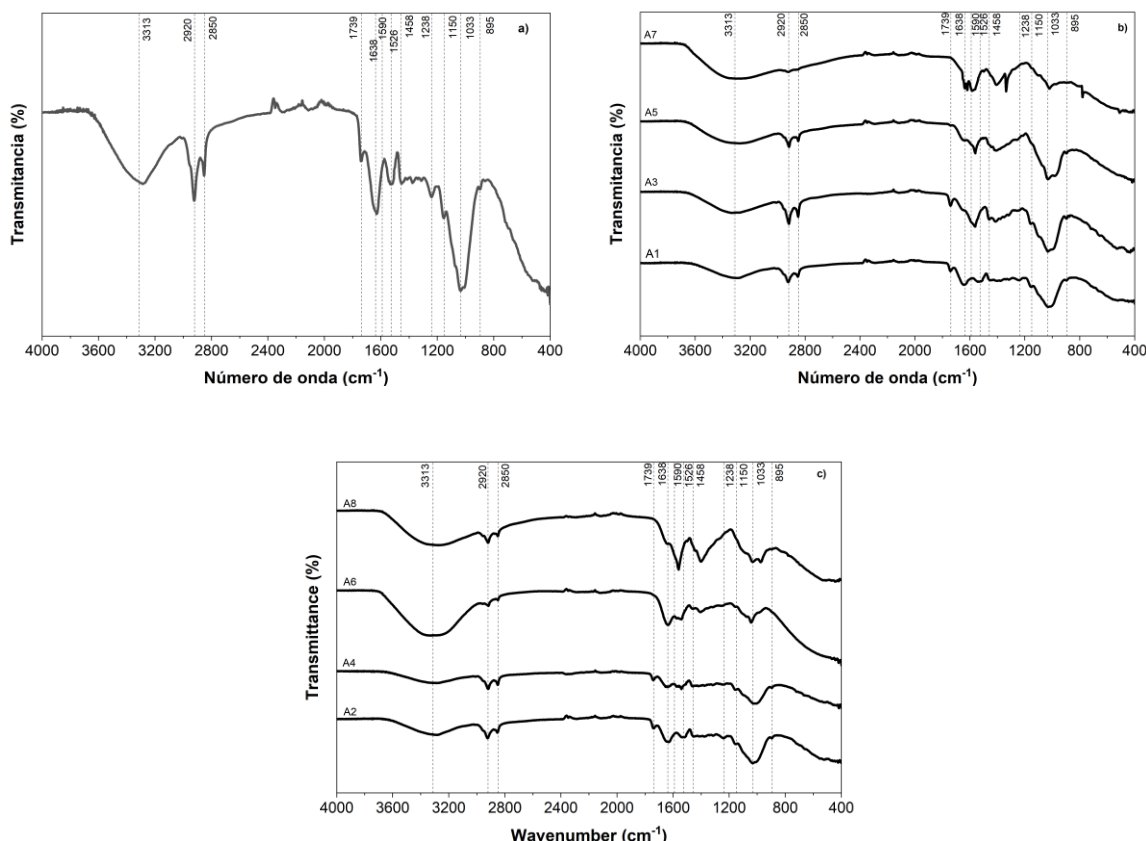


Figura 14. Espectro FTIR para el BSG a) sin pretratamiento, pretratado alcalinamente a una relación sólido/líquido (w/w) de b) 5 % y c) 10 %.

4.2.5 Composición lignocelulósica

La Figura 15 muestra la composición química (porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina) del BSG sin tratar y del BSG sometido a un pretratamiento alcalino (A2, A4, A6 y A8) con una relación sólidos/líquido del 10 % p/p. Los datos indicaron que el BSG sin tratar contenía un 16.75 ± 0.01 % de celulosa, un 44.82 ± 0.21 % de hemicelulosa y un 9.17 ± 0.02 % de lignina. Se observó una disminución progresiva de los porcentajes de lignina (≈ 5 %) y hemicelulosa (hasta un 50 %) al

aumentar la concentración de NaOH, lo que indica una solubilización parcial de estas fracciones durante el pretratamiento.

Concretamente, la hemicelulosa mostró la disminución más pronunciada, pasando de aproximadamente un 45 % en el BSG sin tratar a casi un 5 % en la muestra A8. Esta tendencia concuerda con los informes de la literatura que indican que la degradación de la lignina puede producirse a concentraciones de NaOH inferiores al 2 % en condiciones de temperatura ambiente (Cheng et al., 2012; Fernández-Delgado et al., 2019). Además, también se espera que un ligero aumento de la concentración de NaOH afecte a la solubilización de la hemicelulosa.

En consecuencia, la eliminación de la lignina y la hemicelulosa dio lugar a un aumento relativo del contenido de celulosa en las muestras tratadas. Es posible que este aumento no indique una producción de celulosa sino más bien la concentración relativa de esta fracción dentro de los sólidos residuales tras la solubilización de otros componentes de la matriz lignocelulósica.

Según Macheiner et al. (2003), la adición de bases alcalinas al BSG induce la hinchazón intercrystalina de la celulosa al romper los enlaces de hidrógeno entre moléculas de glucosa adyacentes dentro de la matriz celulósica, produciendo así un material con una densidad aparente notablemente reducida. Además, el álcali diluido solubiliza ciertas hemicelulosas (como los polisacáridos β -1,4-xilano y los galactoglucomananos), mientras que los galactomananos permanecen insolubles en estas condiciones.

Los resultados descritos en el párrafo anterior concuerdan con las observaciones de los análisis de AR, SEM y FTIR, que en conjunto demuestran la ruptura progresiva de la matriz lignocelulósica y la solubilización parcial de la hemicelulosa y la lignina durante el pretratamiento alcalino.

La lignina de la muestra A8 se solubilizó por completo, la hemicelulosa se redujo hasta aproximadamente un 5 % y el contenido de celulosa disminuyó. Si bien esto indica una mayor eficacia del pretratamiento alcalino a la hora de romper la matriz

lignocelulósica, la pérdida de celulosa podría dar lugar a un menor rendimiento del material y a una menor eficacia en la sacarificación enzimática posterior.

Es importante mencionar que la ruptura de la estructura lignocelulósica es un paso clave que mejora la eficiencia de la hidrólisis enzimática posterior. En consecuencia, la siguiente sección se centró exclusivamente en la muestra A4, que demostró un equilibrio óptimo entre la eliminación de lignina y hemicelulosa, al tiempo que se conservaba la fracción celulósica.

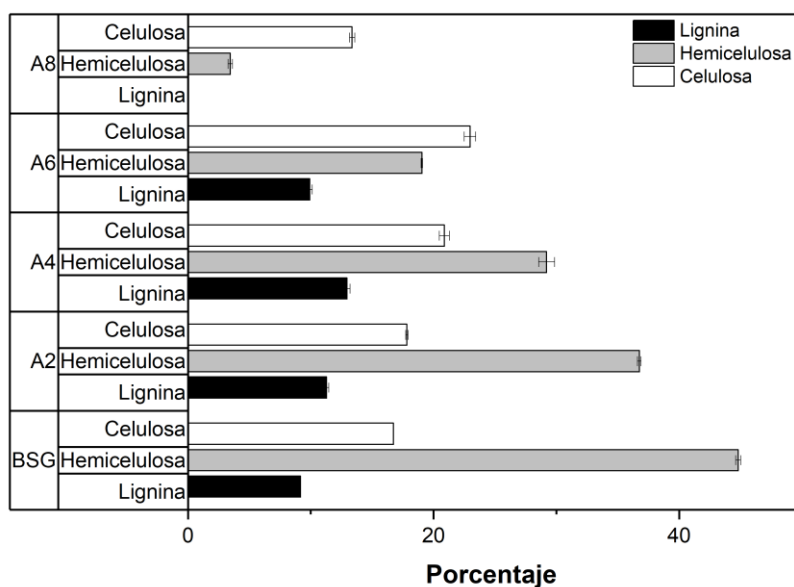


Figura 15. Composición química del BSG sin pretratar y sujeto a un pretratamiento alcalino a una relación sólido/líquido del 10 %w/w.

4.3 Hidrólisis enzimática

4.3.1 Efecto del pH

Las Figuras 16a y 16b muestran los resultados de la sacarificación de la BSG utilizando Viscozyme L y Ultraflo L a 37 °C en un rango de pH de 4.50 a 5.50. En el caso de Viscozyme L (Figura 16a), se determinó una concentración inicial de AR de 6,000 mg/L. Posteriormente, los niveles aumentaron a 18,500, 19,000 y 21,000 mg/L tras 24 h de hidrólisis enzimática a pH 5.50, 5.00 y 4.50, respectivamente. Los experimentos con Ultraflo L (Figura 16b) mostraron una tendencia similar en la liberación de AR, alcanzando aproximadamente 15,500, 17,500 y 24,000 mg/L tras 24 h a los mismos valores de pH. En ambos casos, el pH 4.50 produjo las concentraciones de AR más altas tras 24 h de hidrólisis enzimática, lo que evidencia una mayor actividad enzimática en condiciones ligeramente ácidas.

Al comparar el desempeño de ambas enzimas en condiciones similares, los datos mostraron que Ultraflo L produjo concentraciones de AR un 15 % superiores a las obtenidas con Viscozyme L. Este comportamiento puede atribuirse a diferencias en la composición enzimática y la afinidad por los compuestos lignocelulósicos presentes en el BSG. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Lojananan et al. (2024), quienes estudiaron la sacarificación del BSG en un rango de pH de 8 a 3 e informaron de que las enzimas lignocelulolíticas mostraban una mayor actividad a un pH moderadamente ácido.

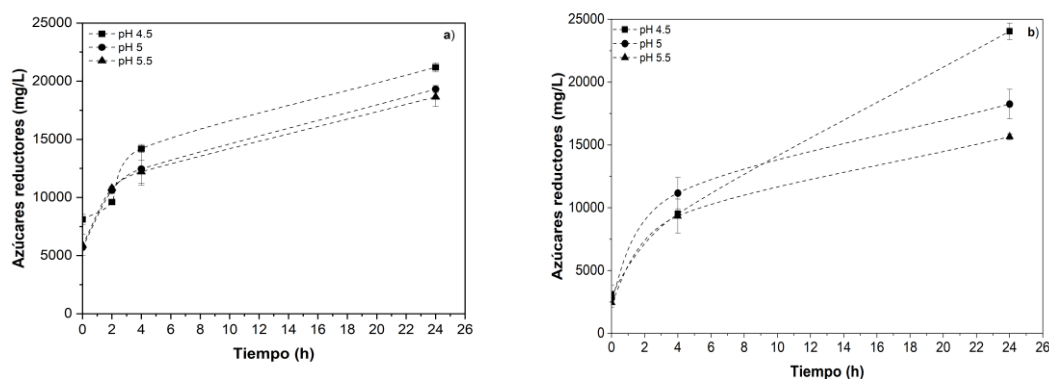


Figura 16. Hidrólisis enzimática del BSG a 37 °C, relación sólido/líquido 1:10, pH de 4.50, 5.00 y 5.50, usando las enzimas a) Viscozyme L y b) Ultraflo L

4.3.2 Efecto del pretratamiento alcalino

En la Figura 17 se muestra el efecto del pretratamiento alcalino con BSG sobre la concentración de AR durante la hidrólisis enzimática con las enzimas Viscozyme L (A4S-EV y Control-EV) y Ultraflo L (A4S-EU y Control-EU) a un pH de 4.50. Se monitorearon las concentraciones de AR durante 24 h.

Los datos indicaron que, con la muestra Control-EV, se liberaron $10,000 \pm 2,900$ mg/L de AR en las primeras 2 h, alcanzando una concentración final de $14,735 \pm 10$ mg/L tras 24 h. Además, la muestra A4S-EV mostró una liberación de AR comparable a la de la muestra Control-EV durante las primeras 4 h. Posteriormente, la producción de AR se aceleró, alcanzando $21,192 \pm 365$ mg/L tras 24 h. Estos resultados indican que la muestra A4S-EV pretratada produjo más de un 50 % más de AR en comparación con la muestra Control-EV, lo que confirma las ventajas del pretratamiento con NaOH sobre el BSG sin tratamiento.

Por otra parte, se observó un comportamiento similar con la enzima Ultraflo L, en el que la muestra A4S-EU pretratada liberó $24,048 \pm 660$ mg/l de AR tras 24 h, mientras que la muestra Control-EU sin tratar solo alcanzó los $17,746 \pm 637$ mg/l.

Estos resultados confirman el efecto positivo del pretratamiento alcalino en la sacarificación del BSG. Además, respaldan la hipótesis de que el pretratamiento con NaOH modifica la matriz lignocelulósica al promover una mayor porosidad y accesibilidad de las fibras celulósicas dentro de la estructura, más que a través de la eliminación de la lignina, tal y como demuestran las imágenes de SEM. Estas modificaciones estructurales mejoran la accesibilidad del sustrato a la acción enzimática, lo que da lugar al aumento de la liberación de AR observado en las muestras pretratadas (C. Liu et al., 2023; Paz et al., 2019).

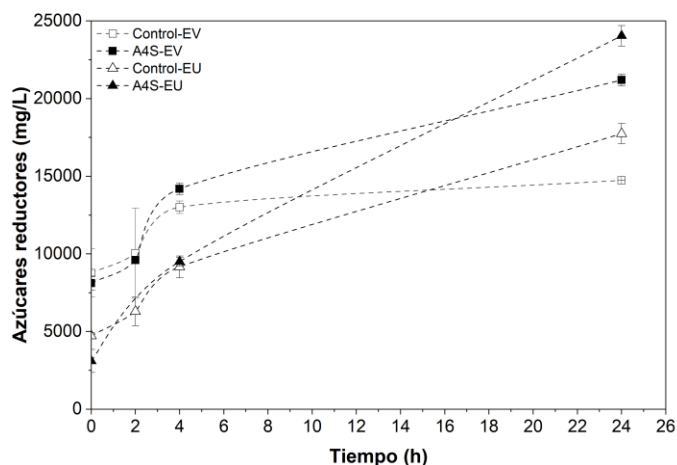


Figura 17. Concentración de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática con y sin pretratamiento alcalino (A4) usando las enzimas Viscozyme L (A4S-EV y Control-EV) y Ultraflo L (A4S-EU y Control-EU) a pH de 4.50

4.3.3 Hidrólisis enzimática con la mezcla de Viscozyme L y Ultraflo L

Para aumentar la liberación de AR en la hidrólisis enzimática de BSG pretratado alcalinamente (muestra A4), se combinaron las enzimas Viscozyme L y Ultraflo L. La Figura 18 muestra la concentración de AR durante la hidrólisis enzimática de la muestra A4 utilizando Viscozyme L (A4S-EV), Ultraflo L (A4S-EU) y su mezcla (A4S-Mix) a pH 4.50 y 37 °C. Como se muestra en esta figura, las concentraciones de AR alcanzaron los $35,000 \pm 942$ mg/L al final del ensayo, lo que representa una mejora del 47 % con respecto a los rendimientos de las muestras A4S-EV y A4S-EU. Esta mejora se debe a las actividades enzimáticas sinérgicas. Viscozyme L, un preparado multienzimático que incluye celulasas, xilanasa, hemicelulasas y β -glucanasas, se dirige a la degradación de la celulosa amorfa y la hemicelulosa, mientras que Ultraflo L, compuesto predominantemente por endo- β -1,3-glucanasas y xilanasa, hidroliza específicamente los β -glucanos y los arabinosilanos (Galindo Hernández, 2017; Sørensen et al., 2003).

La liberación de AR obtenidos en este estudio se comparó con los descritos para otros sustratos lignocelulósicos sometidos a diversos pretratamientos químicos seguidos de hidrólisis enzimática. Corchado-Lopo et al. (2021) informaron de la producción de 42 g/L de AR a partir de BSG pretratado con H_2SO_4 al 2 % v/v a 45 °C y posterior tratamiento enzimático con Viscozyme L. Otros ejemplos incluyen la

paja de trigo y el bagazo de caña de azúcar, que rindieron 40.20 g/L y 8.10 g/L de AR, respectivamente. En estos casos, la eficiencia de la hidrólisis enzimática se atribuyó principalmente a la naturaleza del sistema enzimático empleado, en particular al uso de celulasas de *Trichoderma reesei* en comparación con una mezcla de enzimas β -glucosidasa y endoglucanasa (Cheng et al., 2012).

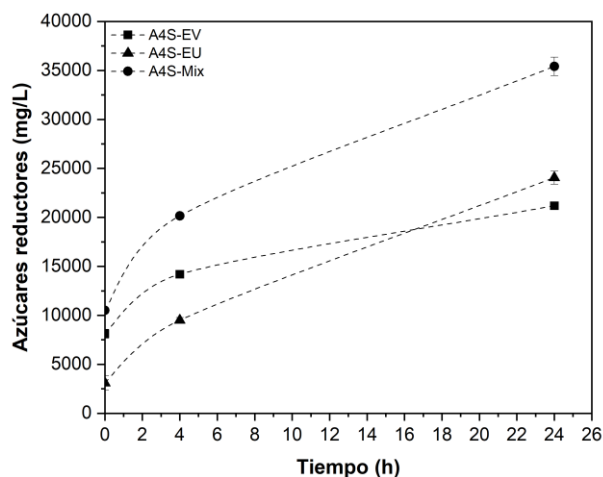


Figura 18. Concentración de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de la muestra A4 usando Viscozyme L (A4S-EV), Ultraflo L (A4S-EU) y su mezcla (A4S-Mix) a pH de 4.50 y 37 °C

Por último, para describir la acción cooperativa entre las enzimas durante el proceso de sacarificación, se determinó el sinergismo o antagonismo enzimático utilizando el hidrolizado BSG y la mezcla enzimática (A4S-Mix). El sinergismo se calcula como la relación entre AR liberado con la mezcla enzimática y la suma del AR liberado durante la hidrólisis individual con cada enzima. Según Van Dyk y Pletschke (2012), los valores de sinergismo superiores a 1 indican interacciones cooperativas entre las enzimas (Andersen et al., 2008; Galindo Hernández, 2017; J. Li et al., 2014; Van Dyk & Pletschke, 2012). A partir de los resultados mostrados en la Figura 18, se obtuvo un índice de sinergia de 1.60, lo que confirma la compatibilidad funcional entre las dos enzimas durante la sacarificación de la BSG.

4.3.4 Análisis morfológico posterior a la hidrólisis enzimática con la mezcla de las enzimas Viscozyme L y Ultraflo L

La Figura 19 muestra micrografía SEM de la fracción sólida del BSG posterior al proceso de sacarificación con la mezcla de las enzimas Viscozyme L y Ultraflo L, como se puede observar existe un tamaño de partícula bastante heterogéneo con formas irregulares y angulares, la estructura es principalmente lisa con forma de láminas superpuestas, y en algunos puntos exhibe rugosidad y pequeñas cavidades las cuales se deben a la acción de las enzimas sobre las fracciones de celulosa y hemicelulosa previamente expuestas por el pretratamiento alcalino.

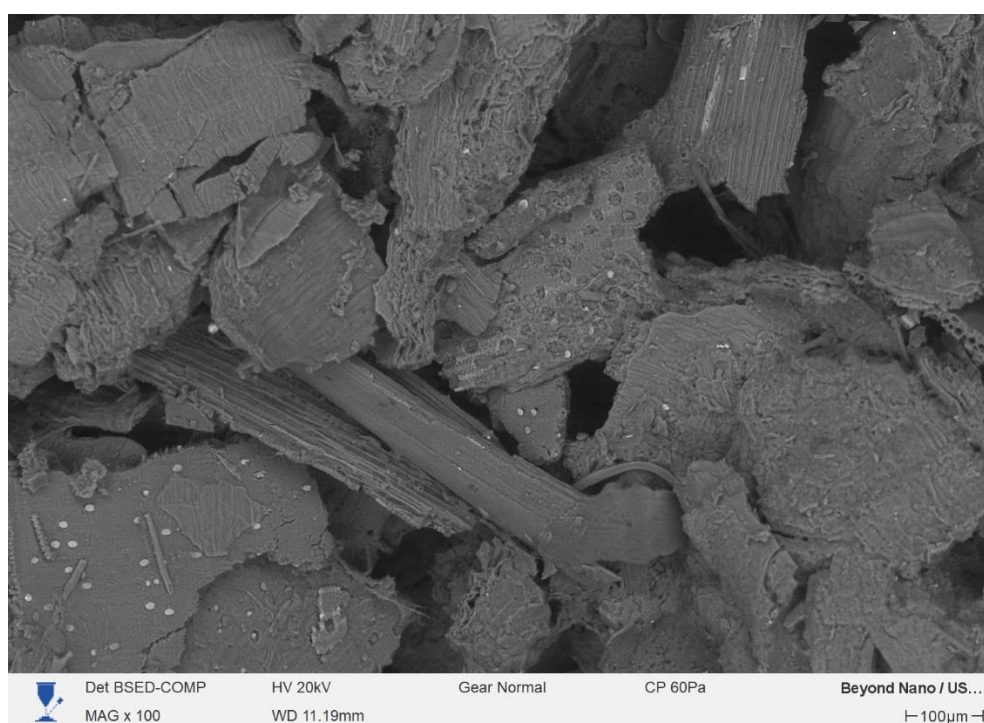


Figura 19. Imagen SEM a 100x del BSG expuesto al proceso de hidrólisis enzimática

4.4 Fermentación en lote del material hidrolizado para la producción de H₂ y ABE

4.4.1 Microorganismo

En cuanto al microorganismo empleado en la fermentación el *Clostridium beijerinckii* DSM 6422, se pudo corroborar mediante la tinción de Gram positiva (véase Figura 20) su presencia en los frascos de crecimiento tiene la forma característica de bacilos cortos y rectos, un color entre púrpura/rosado, algunas en pares o cadenas cortas y una morfología relativamente uniforme. Por otro lado, a partir de la secuenciación de la extracción de ADN, se confirmó que el 89.02 % de la abundancia relativa corresponde a la especie *Clostridium beijerinckii*, el restante se dividió en 9.57 % en una especie de *Clostridium* que no pudo ser asignada (podría ser incluso la misma especie) y el restante 1.42 % fue para otras especies, demostrando así que el cultivo se encuentra en condiciones favorables para el proceso de fermentación y que ha sido crecido adecuadamente.



Figura 20. Imagen microscópica del *Clostridium beijerinckii*

4.4.2 Variación del pH y consumo de AR

El hidrolizado obtenido de la sacarificación del BSG se utilizó posteriormente en un proceso de fermentación con *C. beijerinckii*. Este proceso constó de dos fases metabólicas principales: la fase acidogénica, caracterizada por la producción de ácidos orgánicos y gases (H₂ y CO₂ principalmente), y la fase solventogénica, caracterizada por la producción de disolventes como el butanol.

La Figura 21 muestra la evolución de la concentración de AR y del pH durante la fermentación del hidrolizado de BSG con *C. beijerinckii*. Los resultados indicaron que la concentración de AR disminuyó en un 85 % durante las primeras 24 h y, a partir de entonces, se mantuvo relativamente constante hasta la conclusión del experimento. Este patrón concuerda con el perfil de pH observado en el sistema de fermentación. Inicialmente, los valores de pH aumentaron hasta 5.50 durante el proceso de aclimatación microbiana y el consumo de compuestos que contienen nitrógeno, como aminoácidos y proteínas. Posteriormente, el pH descendió a 5.10 a las 72 h, lo que concuerda con la producción de ácidos orgánicos durante la fase acidogénica que precede a la fase solventogénica, tal y como se ha descrito habitualmente para la fermentación de *C. beijerinckii* (Cruz-Méndez et al., 2022).

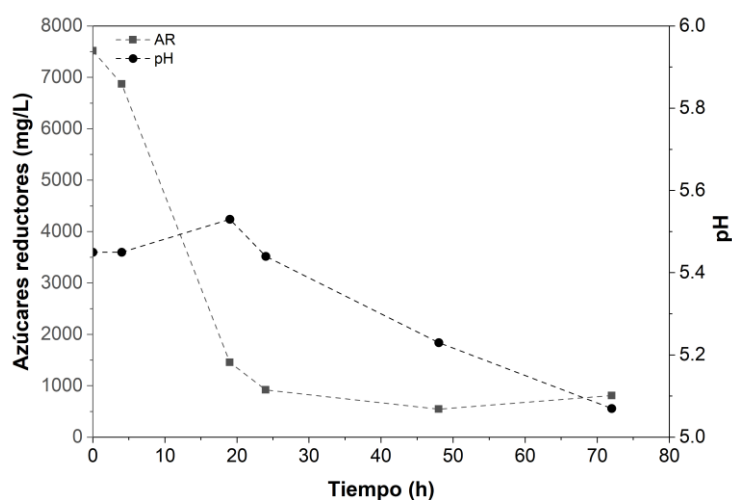


Figura 21. Consumo de AR y variación del pH en la fermentación con hidrolizado de BSG a pH inicial de 5.50, en un reactor de 1 L a 37 °C

4.4.3 Producción de hidrógeno

La producción de H₂ y butanol se muestra en la Figura 22. El volumen acumulado de H₂ producido durante la fermentación del hidrolizado de BSG alcanzó los 558 ± 10 mL y los 953 ± 18 mL a las 24 h y a las 48 h, respectivamente. La mayor producción de butanol se produjo tras 24 h, alcanzando los 0.6 g/L a las 72 h. Estos resultados superaron los comunicados por Pecina-Chacón et al. (2023), quienes obtuvieron 250 ml de H₂ acumulado y 0.3 g/L de butanol en 40 h utilizando BSG pretratado únicamente con una solución de NaOH al 0.5 % p/v en condiciones de

fermentación muy similares a las utilizadas en este estudio. Por lo tanto, el tratamiento enzimático potenció la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa en monosacáridos solubles que *C. beijerinckii* utilizó para la producción de H_2 .

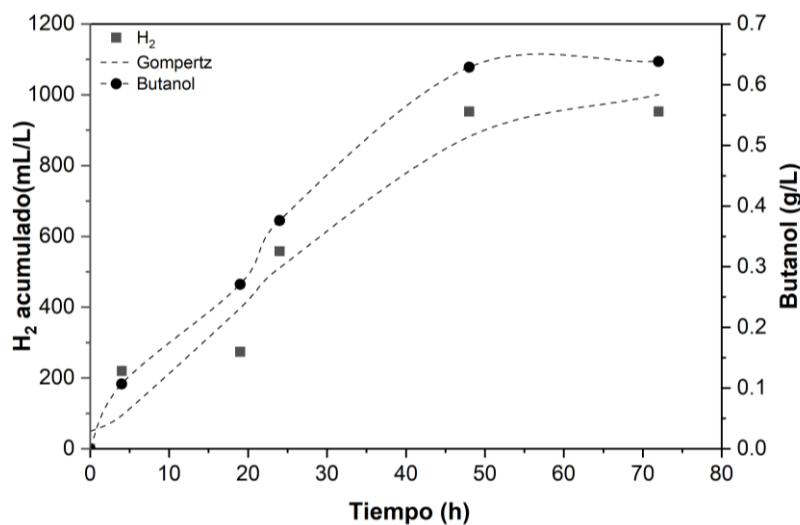


Figura 22. Producción secuencial de hidrógeno y butanol en la fermentación con hidrolizado de BSG a pH inicial de 5.50, en un reactor de 1 L a 37 °C

4.4.4 Modelo de Gompertz

La cinética de la producción de H_2 se modeló utilizando la ecuación de Gompertz modificada (5). El ajuste del modelo arrojó los siguientes parámetros: $H_{\max} = 1,039$ mL de H_2 , $R_{\max} = 23.2$ mL/L·h, fase de latencia (λ) de 1.96 h y coeficiente de correlación $R^2 = 0.94$. La breve fase de latencia podría indicar una rápida aclimatación de *C. beijerinckii* al hidrolizado de BSG, atribuible a la presencia de nutrientes y mono/disacáridos que aceleran el inicio del metabolismo fermentativo (Figura 21). Además, las mezclas de carbohidratos complejos en el hidrolizado (glucosa, xilosa, arabinosa y otros derivados hemicelulósicos) prolongaron la fase acidogénica, promoviendo una producción sostenida de H_2 (Figura 21). El $R_{\max}$ de 23.2 mL de H_2 /L·h indica tasas de producción sostenidas pero moderadas, probablemente atribuibles a la adaptación del microorganismo a sustratos complejos o a la presencia de inhibidores residuales del pretratamiento enzimático alcalino.

4.4.5 Producción de metabolitos y solventes

En la fase acidogénica, los principales productos de la reacción fueron los AGVs descritos en la sección 2.3.1, y las concentraciones de ácido butírico superaron a las de los ácidos acético y propiónico a partir de las 24 h de fermentación. Se observaron concentraciones de AGVs a las 72 h siendo estas de 1928 ± 72 mg/L, 181 ± 99 mg/L, y 49 ± 9 mg/L de ácido butírico, ácido acético y ácido propiónico, respectivamente. La mayor acumulación de ácido butírico sugiere que la fermentación se orientó predominantemente hacia la vía metabólica del butirato, característica de los procesos fermentativos productores de hidrógeno. Esto pudo deberse a una mejora del hidrolizado de BSG (Figura 23a).

Sin embargo, la considerable concentración residual de ácido butírico al final de la fermentación sugiere que su reasimilación durante la solventogénesis fue incompleta. Dado que el butirato es un precursor importante para la biosíntesis del butanol en *C. beijerinckii*, la acumulación de este ácido, junto con la concentración relativamente baja de butanol obtenida, indica que las condiciones de solventogénesis no estaban totalmente optimizadas. Una mayor optimización de los parámetros operativos, como el pH, la disponibilidad de nutrientes y el tiempo de fermentación, podría mejorar la reasimilación del butirato y aumentar la producción de butanol.

En cuanto a la producción de solventes, se alcanzaron concentraciones máximas de 638 ± 52 mg/L de butanol, 430 ± 50 mg/L de etanol y 4 ± 1 mg/L de acetona (Figura 23b). Esta producción relativamente baja puede atribuirse a la disponibilidad limitada de sustrato (inicialmente 7,500 mg/L) y al aumento del pH observado durante las primeras horas de fermentación. No obstante, la evolución de la producción de solventes en el tiempo reveló un aumento del butanol entre las 48 y las 60 h, lo que indica que *C. beijerinckii* se adaptó con éxito al medio complejo y pasó a la vía de producción de solventes, pero no en su totalidad debido a que no hubo reasimilación total. Este cambio metabólico se correlaciona con la disminución gradual del pH y la acumulación previa de ácidos orgánicos durante la acidogénesis, condiciones que se sabe que inducen la fase de producción de solventes en las

especies de *Clostridium* (Guo et al., 2022). En general, estos resultados sugieren que *C. beijerinckii* se adaptó al hidrolizado de BSG y redirigió parcialmente su metabolismo hacia la producción de solventes.

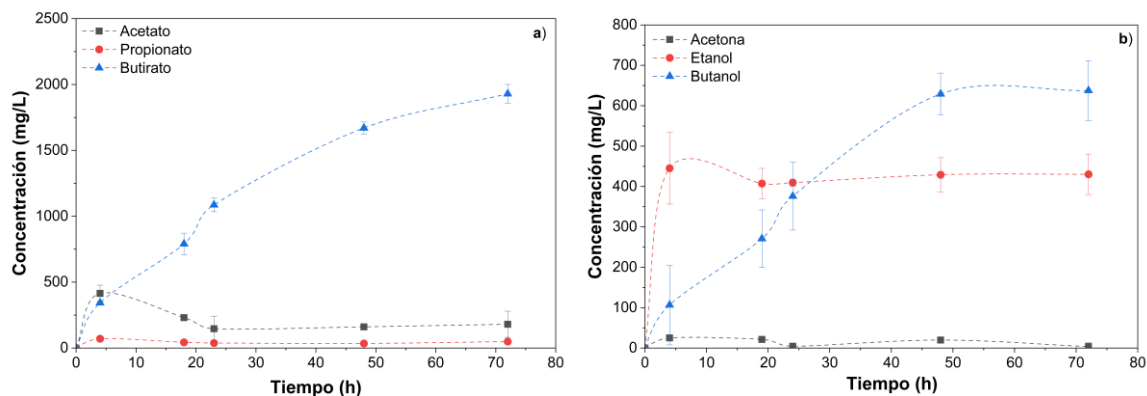


Figura 23. Productos de la fermentación a) AGVs y b) solventes

4.4.6 Identificación microbiana

La Figura 24 muestra la clasificación taxonómica y abundancia relativas de las bacterias presentes en el reactor en lote durante el proceso de fermentación. La especie de *Clostridium beijerinckii* fue la que se encontró en mayor abundancia en todos los puntos analizados, siendo el tiempo 0 donde menor abundancia se obtuvo teniendo 59.52 %, en ese mismo tiempo cabe mencionar que se presentó un 23.81 % de especies que no fueron identificadas taxonómicamente y el 16.67 % fue representado por la especie *Candidatus Nitrocosmicus oleophilus*, esta bacteria es aerobia y como en los subsecuentes tiempos no está presente podemos asegurar que el reactor opero en condiciones anaerobias. Al tiempo inicial de nuestra fermentación el 40.48 % de las especies eran ajenas a la cepa de *C. beijerinckii*. Posteriormente los demás tiempos se puede observar como la abundancia es principalmente dominada por nuestro microorganismo, el único punto donde este disminuye del 80 % es a las 48 h, pero fue debido a que las especies no pudieron ser identificadas taxonómicamente.

Como se puede observar los resultados previamente reportados de producción de hidrógeno y butanol son consistentes con la identificación microbiana debido a que como se mencionó la especie que predominó fue *Clostridium beijerinckii*, la cual

tiene la capacidad de hacer el cambio de la fase acidogénica (producción de H₂ y AGVs) a la fase solventogénica (producción de acetona-butanol-etanol).

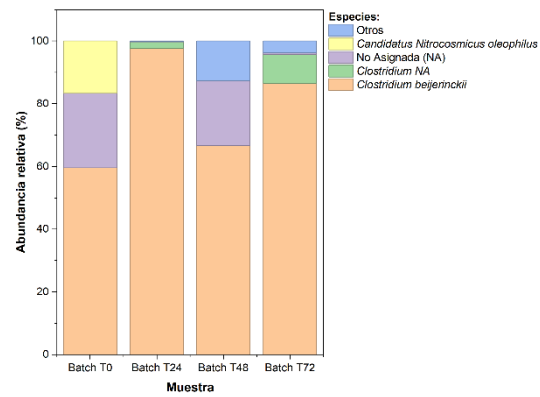


Figura 24. Especies presentes en el reactor en lote.

4.5 Fermentación en lotes con renovación parcial del material hidrolizado para la producción de H₂ y ABE

4.5.1 Efecto de la concentración de AR

- Variación del pH y consumo de AR

En la Figura 25a se presenta el conjunto de experimentos del reactor en lotes con renovación parcial del medio (AR 7 y AR 14), donde la concentración inicial de AR fue 7 y 14 g/L para cada reactor y el pH inicial se ajustó a 5.50 en el primer ciclo y los demás parámetros de control fueron los mismo de la sección anterior. Para el caso del AR 7 se observó la acidificación acelerada del sustrato en las primeras horas hasta un valor de 5.0, donde se mantuvo las siguientes 24 h como parte de la fase de aclimatación microbiana (*C. beijerinckii*). Como parte de la evolución de las rutas metabólicas, el pH del sustrato aumentó a 5.2 y al término del primer ciclo el pH alcanzo un valor de 5.4. Para el segundo ciclo, el comportamiento del pH en el reactor es muy similar al primero, pero el intervalo de pH fue de 5.4 a 5.2. Para el caso del AR 14, el sustrato mantuvo el pH a 5.5 en las primeras 12 horas y posterior a la aclimatación de *C. beijerinckii*, el pH incrementó hasta a pH 5.8 para posteriormente acidificarse hasta 5.1 como consecuencia de la actividad microbiana. Para el ciclo 2, el comportamiento del AR 14 inició en pH de 5.0 (75 h), pero entre 100 y 150 h la solución de BSG pasó de pH de 5.1 a 5.4, coincidiendo con lo observado AR 7. Sedlar et al. (2018) sugiere este comportamiento a la reutilización de los ácidos, para formar solventes. Para el ciclo 3. La tendencia, del pH fue muy similar al ciclo 2, pero la fermentación tuvo lugar en el intervalo de 5.5 a 5.3 pasando por un mínimo en 5.0, lo cual indica un cambio en el metabolismo posiblemente por las bacterias productoras de hidrogeno asociadas a poblaciones nativas remanentes en el BSG. Por último, llegan a una fase donde el valor de pH ya no varía, es decir, se mantiene casi constante.

Respecto a los resultados de AR, es evidente que la concentración inicial influyó en el desarrollo de las rutas metabólicas del proceso fermentativo, donde el reactor AR 7 fue más sensible al describir comportamientos que no se han reportado anteriormente y donde el 85% del consumo tuvo lugar las primeras 24 h en cada

ciclo como se presenta en la figura 25b. Los ciclos subsecuentes para AR 7 y AR 14 también revelan el consumo de los azúcares, pero el cambio no fue tan drástico como al inicio del proceso fermentativo, pero seguían con la misma tendencia entre ciclos.

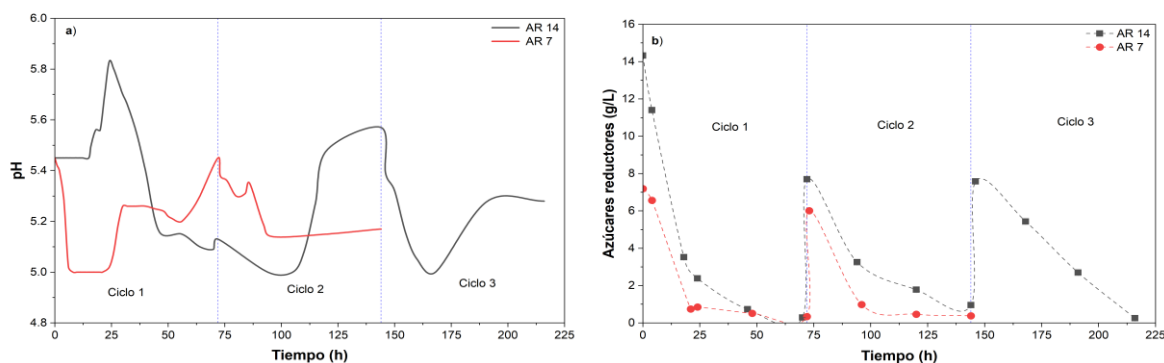


Figura 25. Proceso fermentativo a diferentes concentraciones de AR a) variación del pH y b) consumo de AR

- Producción de hidrógeno

Como se puede observar en la Figura 26, se presentan los resultados de producción de H_2 para los biorreactores AR 7 y AR 14. Para el primer ciclo de AR 7, el volumen de H_2 generado fue $1,336 \pm 39$ mL/L a las 72 h a pesar de la rápida acidificación del sustrato (véase figura 25a). Sin embargo, el volumen producido fue mayor al obtenido en el experimento en lote mostrado en la sección 4.1.4.2. Para el segundo ciclo se presentó un cambio en la producción de H_2 transcurridas 120 h, dado que la actividad microbiana se frenó debido al consumo de más del 90% de AR (véase figura 25b). Por su parte, en el primer ciclo el biorreactor AR 14 mostró la misma tendencia que AR 7 y un volumen de producción de H_2 muy próximo $1,387 \pm 94$ mL/L. Para el segundo ciclo el volumen de hidrógeno producido fue de 2412 ± 156 mL/L y para el tercer ciclo $3,895 \pm 207$ mL/L. Esta diferencia en el desempeño del biorreactor AR 14, se atribuyen a la mayor disponibilidad de AR además de los resultados de pH y AR (figuras 25a y 25b), se puede apreciar que los cambios de pH fueron menos abruptos y el consumo de AR fue menos abrupto respecto al biorreactor AR 7 que mostró un consumo más pronunciado.

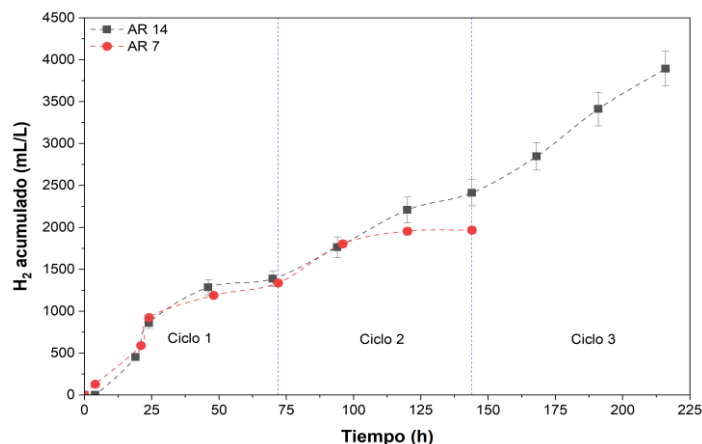


Figura 26. Producción acumulada de hidrógeno en el proceso fermentativo a diferentes concentraciones de AR

- Producción de metabolitos

La Figura 27, muestra la evolución de los AGVs durante la fermentación para ambos casos de estudio, logrando observar que en los dos experimentos las principales rutas metabólicas fueron la del ácido butírico, ácido acético y en menor medida el ácido propiónico. Para el primer ciclo del biorreactor AR 14 (véase Figura 27a), la concentración de ácido acético estuvo en el intervalo de 0.28 ± 0.07 a 0.48 ± 0.04 g/L, el ácido butírico alcanzó los 2.2 ± 0.07 g/L además de trazas de ácido propiónico ($<0.04 \pm 0.01$ g/L) a las 70 h. Para el segundo ciclo, la concentración de ácido acético se mantuvo en el intervalo de 0.49 ± 0.01 a 0.26 ± 0.04 g/L, el ácido butírico osciló en el intervalo de 1.40 ± 0.07 a 2.80 ± 0.04 g/L en sinergia con trazas de ácido propiónico ($<0.08 \pm 0.08$ g/L) a las 141 h. Para el 3 ciclo, la concentración de los principales metabolitos osciló en el intervalo de 0.57 ± 0.03 a 0.47 ± 0.01 g/L para ácido acético, mientras que la concentración de ácido butírico incrementó ligeramente en el intervalo de 1.58 ± 0.04 a 2.30 ± 0.09 g/L. A partir de lo anterior, se confirma que *C beijerinckii* siguió las rutas metabólicas de la acidogénesis mencionadas en la sección 2.3.1, donde el ácido butírico es el principal subproducto de la producción de hidrógeno. Respecto a la ruta del ácido propiónico, no se observaron cambios importantes en la concentración en los tres ciclos y

posiblemente es parte de la simbiosis de *C beijerinckii* y las bacterias consumidoras de hidrógeno.

De igual manera, para el biorreactor AR 7 g/L (Figura 27b), las concentraciones de butirato fueron menores a 1.44 ± 0.01 g/L, lo cual refleja una menor actividad acidogénica asociada a la menor carga orgánica inicial. El acetato presentó un comportamiento relativamente constante. La menor acumulación total de AGVs en esta condición coincide con la mayor estabilidad del pH observada previamente y con el mayor rendimiento específico de hidrógeno.

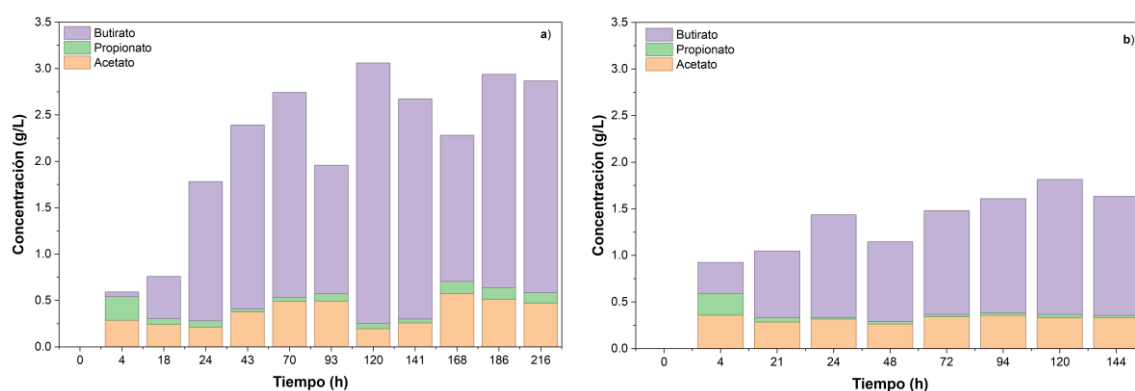


Figura 27. Concentración de AGVs durante el proceso fermentativo con una concentración de AR a) AR 14 y b) AR 7.

- Producción de butanol

La producción acumulada de butanol para los biorreactores AR 14 y AR 7, se muestra en la Figura 28, notándose que la concentración de AR influyó en la acumulación de butanol. Para el biorreactor AR 14, se tiene las concentraciones de ácido butírico y pH para que la cepa de *C beijerinckii* pueda realizar el cambio de fase (cambio metabólico) durante la fermentación la producción de solventes descritas en la sección 2.3.2.1. De acuerdo con los resultados el butanol presentó un incremento progresivo desde el ciclo 1, alcanzando 1.14 ± 0.03 g/L, en los ciclos subsiguientes se incrementó la producción en 25%. Lo que muestra que se presentó una eficaz reasimilación por parte de la bacteria para favorecer la ruta de solventogénesis y por consecuencia una baja producción de butanol. De acuerdo con Li et al. (2011) este resultado puede deberse a que *C beijerinckii* no esta

aclimatada a los azúcares liberados por la hidrólisis del BSG (mezcla de glucosa y xilosa). En sistemas con mezclas de fuentes de carbono, la presencia de glucosa desencadena el fenómeno de represión por catabolito de carbono, inhibiendo temporalmente el transporte y la metabolización de pentosas como la xilosa debido a la mayor afinidad enzimática del microorganismo por la glucosa. Asimismo, otros factores a los que se puede atribuir este fenómeno es la acumulación de macromoléculas inhibitoras y la deficiencia de nutrientes. De igual manera, el experimento AR 7 su mejor producción de butanol fue en el primer ciclo teniendo una concentración de 0.38 ± 0.07 g/L. En ambos casos, se puede observar que la concentración de butanol permanece constante, cuando el pH se mantuvo constante debido a la débil actividad microbiana, lo cual se ha visto reportado por Sedlar et al. (2018) y Branska et al. (2018).

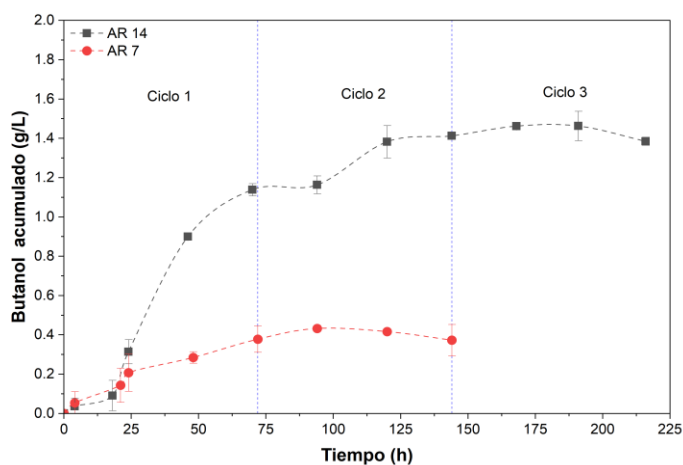


Figura 28. Producción acumulada de butanol en los ciclos del proceso fermentativo, pH inicial 5.5, $V=1$ L, $T=37^{\circ}\text{C}$, agitación 81 rpm, cepa de *C.beijerinckii*.

- Identificación microbiana

La Figura 29 muestra las diferentes especies que se presentaron en los reactores. Con lo que respecta al biorreactor AR 14 (Figura 29a), el primer ciclo (correspondiendo a las primeras 72 h), la especie predominante fue nuestro microorganismo el *C. beijerinckii*, en el tiempo 0 h se observa la presencia de otras especies, lo cual es normal debido a la manipulación del hidrolizado (aunado a la no esterilización de este) y del biorreactor, pero a las 24 h se muestra que esas

especies que se presentaban ya no tienen tanta presencia. Por otro lado, a las 72 h se presenta una disminución del *C. beijerinckii* lo cual se puede deber a que el microorganismo dejó de crecer en ese tiempo debido a la falta de azúcares, y en el siguiente punto (96 h) se muestra una disminución de la misma especie debido a la realimentación con hidrolizado, y en ese mismo punto se observa un incremento de especies del género *Clostridium* que no pudieron ser identificadas, así como especies del mismo género *C. aurantibutyricum* y *C. carboxidivorans*. A partir de lo anterior, se observó que a los diferentes tiempos y variaciones de pH la especie predominante fue del género *Clostridium*.

La especie *C. aurantibutyricum* es una bacteria anaerobia, fermentadora de carbohidratos, productora de ácido butírico y ácido acético, y en muy poca cantidad solventes como butanol, etanol e isopropanol (Jensen et al., 2024; Schoch et al., 2022). La especie *C. carboxidivorans* es una bacteria mesófila anaerobia obligada, puede crecer autotróficamente en CO₂, CO y H₂ y sintetizar directamente etanol y butanol a través de la ruta de Wood-Ljungdahl, la cual es una vía reductiva de acetil-CoA que permite la asimilación de sustratos gaseosos en intermediarios metabólicos clave, como el acetato y el acetil-CoA, que sirven como precursores para la producción de butanol (Antonicelli et al., 2023; Emmanuel et al., 2026; Lanzillo et al., 2025). Por lo cual, si bien la presencia de ambos microorganismos podría deberse a errores en el análisis de la secuencia, los resultados previamente observados de un incremento del ácido butírico a la par de la disminución del pH harían una correlación con la presencia de especies ajenas al microorganismo que se inoculó (Jensen et al., 2024).

La Figura 29b muestra los cambios en la comunidad microbiana del biorreactor AR 7, a tiempo de 0 h, existe la presencia de bacterias aerobias debido de igual manera a la manipulación del hidrolizado y del biorreactor, a las 24 h se puede observar un cambio drástico en la abundancia siendo la especie dominante *C. aurantibutyricum*, quien durante sus rutas metabólicas anaeróbicas, degrada sustratos como azúcares para generar ácidos como ácido butírico y solventes, liberando de forma natural grandes cantidades de gas hidrógeno (y dióxido de carbono) como subproducto del

metabolismo (Jensen et al., 2024; Schoch et al., 2022). Por otro lado, al finalizar ese ciclo (72 h) se observa que las especies identificadas ya no cambiaron y un alto porcentaje (mayor a 90 %) son del género *Clostridium* (y por ello el aprovechamiento de los azúcares y producción de hidrógeno), no necesariamente son formadoras de ácido butírico y por ende, no se observó un incremento en la producción de butanol. Sin embargo, la simbiosis con bacterias del género *Caproiciproducens* tienen sentido al favorecer su crecimiento puesto que son capaces de consumir xilosa, mantener constante el pH y los AGVs, pero tiene la peculiaridad como su nombre lo muestra de producir ácido caproico mediante la vía de β -oxidación inversa (RBO) y la vía de biosíntesis de ácidos grasos (FAB) (Jin et al., 2025; J. Tang et al., 2022).

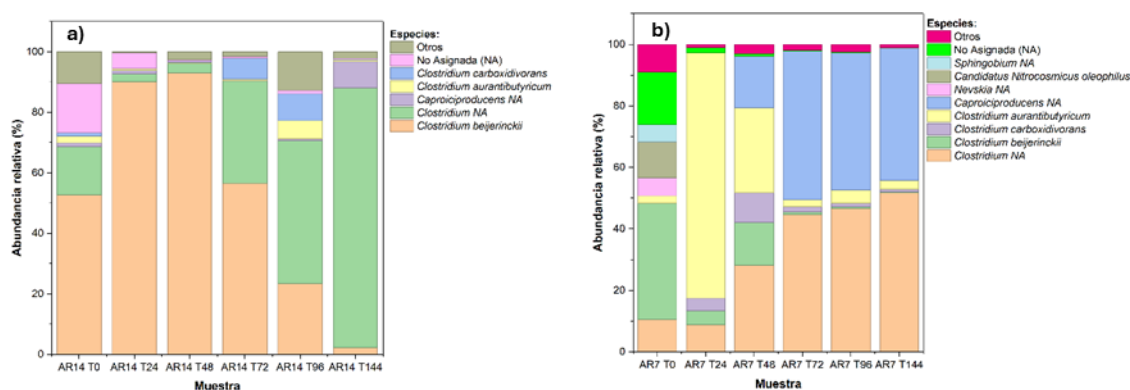


Figura 29. Especies presentes en los reactores a) AR 14 y b) AR 7

4.5.2 Efecto del ajuste de pH

- Variación del pH y consumo de AR

En esta etapa del proceso fermentativo se estudió el efecto de alimentar el sustrato a pH inicial al inicio de cada ciclo a 5.5 (AR 14 5.5) y se comparó con el biorreactor AR 14. En la Figura 30a, se observa que en el primer ciclo se presentó un comportamiento diferente para ambas condiciones, dado que el biorreactor AR 14 5.5 experimentó una rápida caída del pH en las primeras 8 h y se mantuvo constante la mayor parte del ciclo, a diferencia del experimento AR 14, donde se observó una caída más gradual del pH sin llegar a valores tan bajos. Ambos fenómenos han sido

reportados en literatura por ejemplo Branska et al. (2018) y Sedlar et al. (2018) mostraron esa caída rápida del pH, la cual está asociada a la formación de ácidos.

El ajuste del pH al iniciar el segundo ciclo (AR 14 5.5), muestra un efecto sobre la adaptación de *C beijerinckii*, porque a pesar de que el hidrolizado introducido se ajustó el pH hasta 5.5, la mezcla al interior del biorreactor se acidificó hasta 5.0 en las primeras horas de la reacción (75 - 80 h), como era la condición previa a la alimentación del sustrato, posteriormente la adaptación de las especies *Clostridium* se traduce en un incremento en el pH hasta 5.6 (≈ 100 h), y se mantuvo ahí hasta finalizar el ciclo. Este comportamiento fue muy parecido a lo observado en el reactor AR 14, con la única diferencia que AR 14 5.5 se mantuvo más tiempo en un valor constante de pH=5.6 respecto a AR 14 (115 h).

Por último, el tercer ciclo tuvo un comportamiento similar en ambas condiciones lo cual puede deberse a que el microorganismo en ambos casos ya se encontraba en un valor de pH cercano a 5.5, en ambos experimentos y el final del ciclo presentó la misma tendencia de mantener un valor de pH constante de 5.3.

La evolución de AR se muestra en la Figura 30b para los biorreactores AR 14 y AR 14 5.5. Se observa que en el primer ciclo el consumo de azúcares fue muy rápido para ambos experimentos, en 24 h, ya se había consumido aproximadamente el 85% de los hidrolizados y en los ciclos subsecuentes cuando se realizó ajuste de pH los AR se consumieron en mayor medida en las primeras 24 h de iniciado cada ciclo, y para las horas posteriores se consumió casi el 100%. Por otra parte, para el segundo y tercer ciclo de AR 14, la velocidad de transformación de AR fue constante dado que las velocidades de reacción de las rutas metabólicas fueron menos sensibles al ajuste de pH del hidrolizado (5.50) al inicio de ciclo.

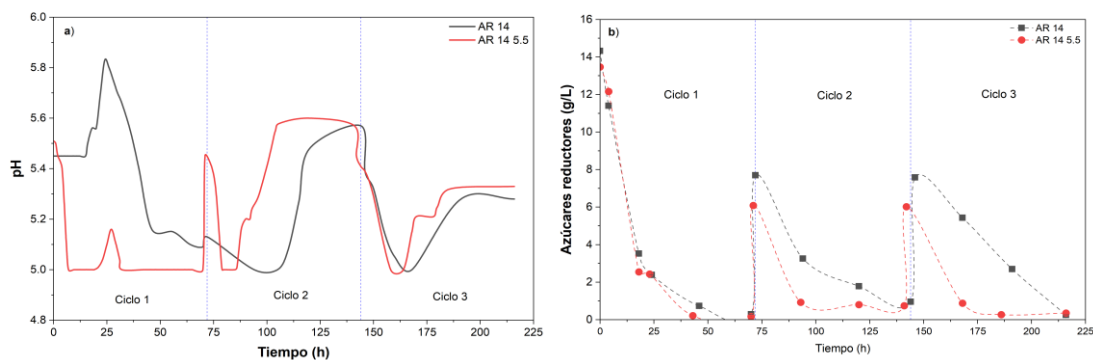


Figura 30. Proceso fermentativo con y sin ajuste del pH entre ciclos a) variación del pH y b) consumo de AR

- Producción de hidrógeno

En la Figura 31 se presenta los resultados de volumen de H_2 acumulado entre el AR 14 y AR 14 5.5. En la figura antes mencionada se puede notar que el primer ciclo no muestra mucha diferencia en ambas producciones que se encuentran en el intervalo de $1,387 \pm 94$ a $1,084 \pm 88$ mL/L, pero para el segundo ciclo, la producción del biorreactor AR 14 se vio incrementado a las 144 h en un 38% y en el tercer ciclo la producción de este mismo biorreactor fue de $3,895 \pm 208$ mL/L. Por su parte el biorreactor AR 14 5.5 produjo $1,747 \pm 145$ (2 ciclo) y $2,062 \pm 185$ mL/L (tercer ciclo), lo cual representa una disminución del 53% del volumen de H_2 producido con el biorreactor AR 14. Como se ha mencionado, la diferencia radicó en los ciclos subsecuentes a la inicial, lo cual confirma que el control de pH influye en la regulación metabólica del sistema principalmente *C beijerinckii*, por lo que alimentar el hidrolizado con el pH final del tratamiento enzimático (5.15) permitió un mejor amortiguamiento por parte de las rutas metabólicas durante la fermentación oscura favorece una mayor producción acumulada de hidrógeno. El efecto que se ha demostrado en literatura es que el pH regula el metabolismo de las bacterias productoras de hidrógeno y oscila entre la acidogénesis y la solventogénesis, variaciones drásticas en el pH pueden afectar a la conformación y la actividad de la hidrogenasa, lo que afecta la velocidad de producción de hidrógeno (Gupta et al., 2024; Rawoof et al., 2021). De acuerdo con Zagrodnik et al. (2015) la variación en el pH influye directamente en la velocidad de producción de hidrógeno ya que disminuye la fase lag.

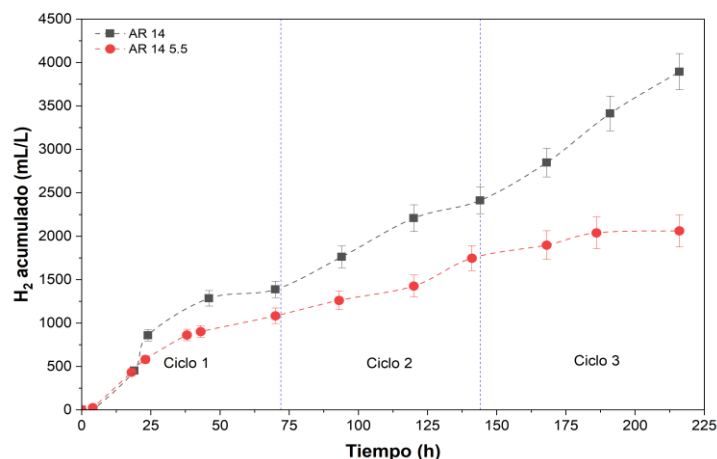


Figura 31. Hidrógeno acumulado en el proceso fermentativo por ciclos, a temperatura de 37 °C y concentración de AR de 14 g/L con pH inicial de 5.5

- Producción de metabolitos

Como se mencionó en el punto producción de metabolitos de la sección 4.1.5.1, durante el proceso fermentativo el biorreactor AR 14, *C beijerinckii* favoreció la ruta metabólica de la acidogénesis. Predominando la generación del ácido acético y ácido butírico en los tres ciclos. En la Figura 32 se compara la evolución de los AGVs con el biorreactor AR 14 5.5, quien obtuvo concentraciones de ácido butírico de 0 a 1.43 ± 0.03 g/L en el primer ciclo (72 h), 2.07 ± 0.03 g/L durante el ciclo 2 (144 h) para disminuir ligeramente de 2.07 ± 0.03 a 1.86 ± 0.05 g/L en el tercer ciclo (216 h). En el caso del ácido acético la concentración osciló en el intervalo de 0.40 a 0.14 g/L durante los 3 ciclos y trazas de ácido propiónico. A partir de lo anterior se puede demostrar que en el biorreactor AR 14, es evidente el decremento de la concentración de ácido butírico cuando se llevó a cabo el cambio del hidrolizado por nuevo líquido hidrolizado (72 h y 144 h). En cambio, en el biorreactor AR 14 5.5, no se observó tan marcado este comportamiento, posiblemente debido a la caída abrupta del pH lo cual esperaríamos que beneficiara la producción de butanol, pero como se podrá ver más adelante no tuvo ese efecto. Por otro lado, cuando el pH se mantuvo constante superior a 5.5 la concentración se mantiene constante.

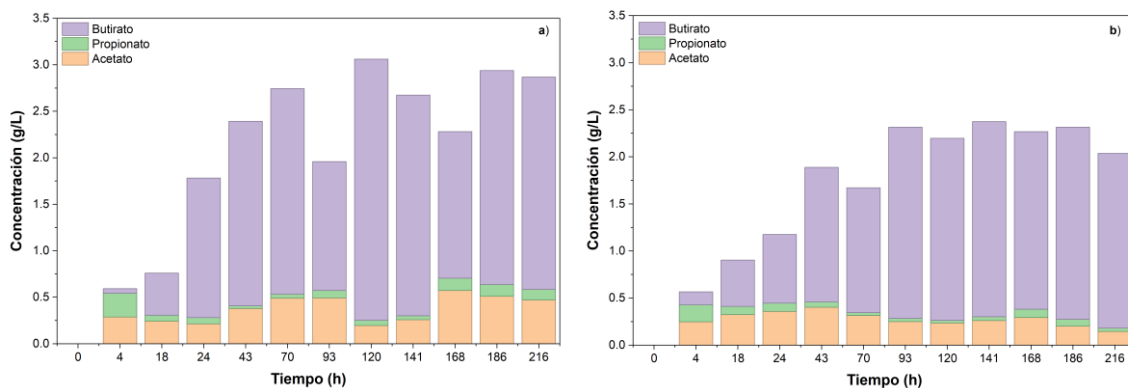


Figura 32. Concentración de AGVs durante el proceso fermentativo con una concentración de AR de 14 g/L a) AR 14 y b) AR 14 5.5

- Producción de butanol

En la Figura 33 se muestra la producción acumulada de butanol en las fermentaciones de BSG en AR 14 y AR 14 5.5, en este último biorreactor podemos observar que la producción de butanol en las primeras horas de la fermentación se vio favorecida debido a la caída rápida del pH en el sistema, desafortunadamente al mantenerse en un valor de pH 5.0 por un largo periodo *C beijerinckii* no transitó hacia la producción del butanol quien estuvo presente en concentraciones de 0.53 ± 0.02 g/L, y por consecuencia se vio afectado esta etapa de la fermentación. Con este resultado se muestra que el descenso natural del pH favorece la cinética microbiana de producción de butanol entre ciclos, porque bajo esta condición la producción es aproximadamente el doble en el primer ciclo.

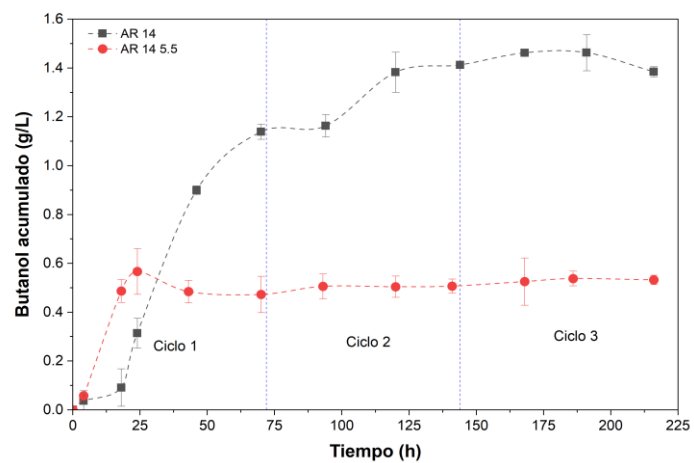


Figura 33. Producción acumulada de butanol en los ciclos del proceso fermentativo a una concentración de AR de 14 g/L, con y sin ajuste del pH entre ciclos a 5.5

4.6 Productividad y rendimiento

La Tabla 4 muestra la productividad y el rendimiento de hidrógeno obtenidos en los experimentos realizados en lote y en ciclos, dichos valores fueron obtenidos a partir de las ecuaciones 6 y 8. Para el biorreactor en lote se obtuvo una productividad de hidrógeno de 13 mL H₂/L·h y un rendimiento de 142.1 mL H₂/g AR, lo cual evidencia que en esta condición el biorreactor tuvo una baja producción, pero mostró ser un proceso más sostenido en el tiempo.

Para el biorreactor AR 7, el mejor desempeño se observó en el ciclo 1, con una productividad de 18.56 mL H₂/ L·h y un rendimiento de 195.01 mL H₂/g AR. Sin embargo, en el ciclo 2 se registró una disminución en ambos parámetros, lo cual se puede deber a cambios en la comunidad microbiana, particularmente al surgimiento de especies del género *Caproiciproducens*, las cuales desvían el flujo metabólico hacia la cadena de elongación (producción de ácidos grasos de cadena media como el caproato), compitiendo por el sustrato soluble y consumiendo equivalentes reductores que de otro modo se habrían destinado a la formación de biohidrógeno

Para el biorreactor AR 14, la productividad mostró variaciones entre ciclos, observándose el máximo valor fue el ciclo 3 (20.59 mL H₂/ L·h), mientras que el rendimiento también alcanzó su valor más alto en ese mismo ciclo (202.38 mL H₂/g AR). En contraste, el ciclo 2 presentó la menor productividad (13.85 mL H₂/L·h). La productividad global obtenida en esta condición fue de 18.03 mL H₂/L·h, con un rendimiento promedio de 138.60 mL H₂/g AR.

Al comparar la productividad entre los biorreactores AR 14 y AR 14 5.5 se reveló que el primer biorreactor obtuvo productividad global de 18.03 mL H₂/L·h y rendimiento global de 138.60 mL H₂/ g AR, mientras que el segundo obtuvo una productividad global de 9.55 mL H₂/L·h y rendimiento global de 84.81 mL H₂/ g AR.

Tabla 4. Productividad y rendimiento del hidrógeno para los procesos fermentativos en lote y en lotes con renovación parcial del medio

Biorreactor	Variable de control	Ciclo	Productividad (mL H₂/L*h)	Rendimiento (mL H₂/ g AR)
Lote	AR= 7.5 g/L pH°=5.5	NA	13.00	142.10
AR 7	AR= 7 g/L pH°=5.5 (solo 1er ciclo)	1	18.56	195.01
		2	8.78	112.16
		Total	13.67	157.62
AR 14	AR =14 g/L pH°=5.5 (solo 1er ciclo)	1	19.82	98.87
		2	13.85	151.97
		3	20.59	202.38
		Total	18.03	138.60
AR 14 5.5	AR =14 g/L pH°=5.5	1	15.48	81.46
		2	9.34	124.03
		3	4.21	55.68
		Total	9.55	84.81

La Tabla 5 muestra la productividad y el rendimiento de butanol obtenidos en los experimentos realizados en lote y en ciclos, dichos valores fueron obtenidos a partir de las ecuaciones 9 y 10. En cuanto a la producción de butanol a partir del hidrolizado de BSG en el biorreactor en lote, se alcanzó una productividad de 9 mg/L·h, con un rendimiento de 0.09 g/g AR, son valores bajos, pero muestran que el microorganismo fue capaz de adaptarse a las condiciones del medio y cambiar la ruta acidogénica a solventogénica.

Como es posible observar para AR 7, AR 14, el primer ciclo en ambos casos tiene los máximos valores en productividad y rendimiento, siendo para este último biorreactor los mayores valores de 0.016 g/ L·h y 0.081 g/g AR consumido. demuestra lo expuesto por Li et al. (2011), donde menciona que emplear el método lote alimentado para producir butanol puede presentar problemas de falta de nutrientes, presencia de bacterias inactivas o muertas y estrés metabólico, además de remarcar que en el primer de los ciclos es cuando se obtienen la mejor productividad y rendimiento con respecto al butanol. Por otra parte, ver que la productividad y rendimiento disminuye conforme transcurren los ciclos pero ver que los AR se siguen consumiendo es indicativo que las rutas metabólicas han

cambiado, la cual podría ser la acidogénica debido al incremento en el rendimiento en el hidrógeno.

Para el caso del biorreactor AR 14 5.5, se observó un efecto negativo del ajuste del pH al inicio de la reacción. Dado que la productividad y rendimiento de este biorreactor fue 80% menor respecto a AR 14.

Tabla 5. Productividad y rendimiento del butanol para el proceso fermentativo en lote y en lote con renovación parcial del medio

Biorreactor	Variable de control	Ciclo	AR consumidos (g/L)	Butanol (g/L)	Productividad butanol (g/L*h)	Rendimiento butanol (g/ g AR)
Lote	AR= 7.5 g/L pH°=5.5	NA	6.70	0.64	0.009	0.095
AR 7	AR= 7 g/L pH°=5.5 (solo 1er ciclo)	1	6.85	0.38	0.005	0.055
		2	5.03	0.05	0.002	0.011
		Total	11.88	0.43	0.004	0.036
AR 14	AR =14 g/L pH°=5.5 (solo 1er ciclo)	1	14.03	1.15	0.016	0.081
		2	6.74	0.27	0.004	0.041
		3	7.33	0.05	0.001	0.007
		Total	28.10	1.46	0.008	0.052
AR 14 5.5	AR =14 g/L pH°=5.5	1	13.30	0.47	0.007	0.035
		2	5.35	0.03	0.000	0.006
		3	5.67	0.03	0.000	0.005
		Total	24.32	0.53	0.002	0.022

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES DE LA ESTANCIA

5.1 Fermentación con la microbiota nativa del BSG

- Producción de H₂

La producción de H₂ se muestra en la Figura 34. El volumen acumulado de H₂ producido durante la fermentación del BSG fue de $2,976 \pm 139$ mL de H₂/L para el primer lote, en el segundo lote la producción fue de 474 ± 44 mL de H₂/L, dando un total de $3,450 \pm 152$ mL de H₂/L, estos resultados superan el reportado por Sarkar et al. (2021) donde reportan una producción de 1712 mL/L a 35 °C y pH de 9.0, donde solamente se secó el BSG y se añadió lodo anaerobio; el reportado por Campos-Flores et al.(2026) empleando mezcla de BSG (previamente secado) con cáscaras de frutas donde reporto una producción de 350 mL/L a 37 °C y pH de 5.5 y al reportado por Tandon et al. (2018) que empleó salvado de arroz a 37 °C y pH de 6.0 y obtuvo 545 mL/L. Por otro lado, no se encuentra tan lejano al obtenido por Soares et al. (2024) a partir de hidrolizado de BSG a pH de 7.5 y 35 °C, secado y posteriormente pretratado con ácido, logrando obtener 4,160 mL/L.

Lo anterior demuestra una alternativa a los procedimientos de valorización del BSG comunes, ya que en la mayoría de ellos mencionan la necesidad de un pretratamiento, o secar la muestra de BSG, pero con el empleo de su microbiota nativa se mostró una alternativa o bien, un posible paso previo a los métodos convencionales.

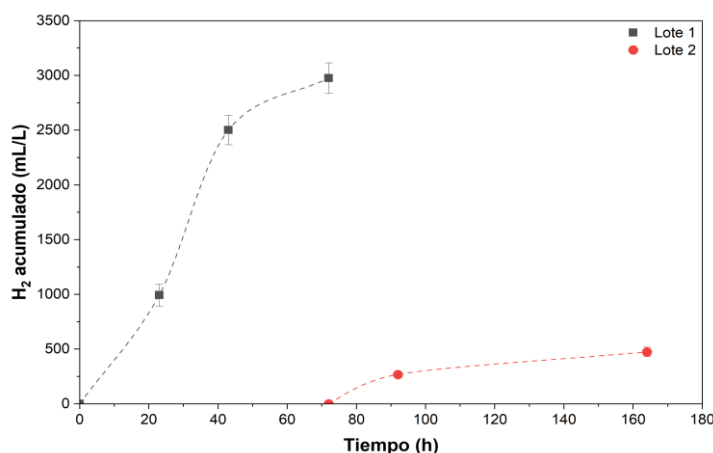


Figura 34. Producción de hidrógeno empleando la microbiota nativa del BSG

- Ajuste al modelo de Gompertz

La cinética de la producción de H_2 se modeló utilizando la ecuación de Gompertz modificada (5). El ajuste del modelo arrojó los siguientes parámetros: $H_{\max} = 3,021$ mL de H_2 , $R_{\max} = 98.4$ mL/h, fase de latencia (λ) de 12.9 h para el lote 1, para el lote 2, los parámetros fueron: $H_{\max} = 474$ mL de H_2 , $R_{\max} = 67.0$ mL/h, fase de latencia (λ) de 15.9 h. Estos resultados muestran que el lote 1, correspondiente al biorreactor que contenía BSG al 10 % ST, presentó una mayor producción acumulada de hidrógeno y una mayor velocidad máxima de producción en comparación con el lote 2. De igual manera, la menor fase de latencia fue obtenida en el lote 1, lo cual indica una adaptación más rápida de los microorganismos debido a una mayor cantidad de azúcares aprovechables. En contraste, el lote 2 mostró una disminución considerable en la producción de H_2 y un incremento en el tiempo de adaptación microbiana. Esto puede deberse a que el lote 2 se encuentra diseñado simplemente para consumir la hemicelulosa presente, en este punto ya no se encontraba glucosa que pudieran consumir los microorganismos, solo existía la presencia de xilosa (siendo menor a 1 g/L).

- Productividad y rendimiento

La Tabla 6 presenta los valores obtenidos de productividad y rendimiento durante la fermentación del BSG empleando su microbiota nativa a 37 °C pH inicial de 6.5 en cada lote, como se puede observar desde los resultados de la producción de hidrógeno, el lote 1 es el que destacó de igual manera en términos de productividad y rendimiento, logrando valores de 41.33 mL/L·h y 29.76 mL/g BSG seco, los cuales son mínimo seis veces más grandes que los obtenidos en el lote 2, lo cual era de esperarse debido a que en ese lote solo existía xilosa como fuente de azúcar (aproximadamente 0.040 g/L). El rendimiento global del sistema fue de 34.50 mL H_2 /g de BSG seco, valor que integra la producción total acumulada en ambos lotes.

Tabla 6. Productividad y rendimiento para el reactor operado en lotes del proceso fermentativo del BSG empleando su microbiota nativa

Muestra	Productividad (mL/L·h)	Rendimiento (mL/g BSG seco)
Lote 1	41.33	29.76
Lote 2	5.16	4.74

- Producción de metabolitos

La fermentación llevada a cabo originó la formación de AGVs debido a la fase acidogénica, donde se puede observar en la Figura 35 que al inicio se encontraba solo el ácido fórmico (0.31 ± 0.04 g/L), y al final del lote 1, este ácido disminuyó y el sistema siguió la ruta hacia la formación de ácido acético y ácido butírico (2.13 ± 0.47 y 2.99 ± 0.69 g/L, respectivamente). Para el lote 2, la formación de los ácidos antes mencionados se vio incrementada logrando una producción de 2.52 ± 0.11 g/L de ácido acético y 3.55 ± 0.08 g/L de ácido butírico. La mayor acumulación de ácido butírico sugiere que la fermentación se orientó predominantemente hacia la vía metabólica del butirato, característica de los procesos fermentativos productores de hidrógeno.

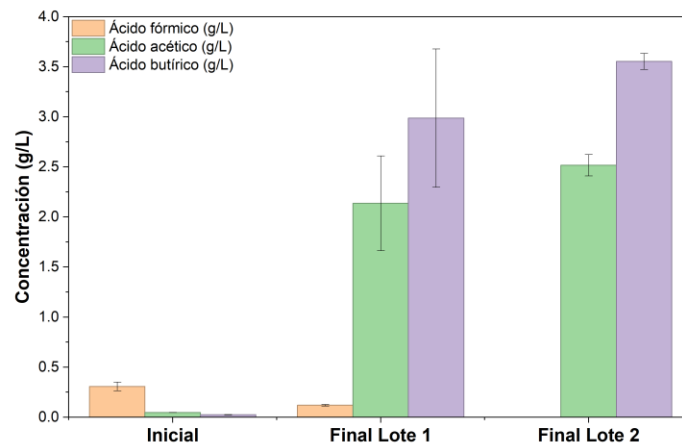


Figura 35. Producción de AGVs durante la fermentación

- Identificación microbiana

La Figura 36 muestra las especies presentes en el BSG antes del proceso fermentativo (inicial) y después de terminar cada lote, donde se muestra que de manera general más del 70 % corresponden a especies del género *Clostridium*. Verificando con la literatura, existen pocos estudios que caracterizan el BSG taxonómicamente antes de llevar a cabo un proceso de secado, o un pretratamiento, por lo que solo se pudo comparar con lo reportado por Aradwad et al. (2026) y Bianco et al. (2024), donde mencionan solo los filos que se encuentran en el BSG, donde encontramos similitudes con nuestros análisis ya que presentamos los filos de *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, *Crenarchaeota*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, entre otras. Al inicio se presenta en el BSG un 76.16 % de la presencia de especies de *Clostridium* que no pudieron ser asignadas, las cuales también predominan al final del lote 1 con un 61.57 %, además de otras especies del mismo género, como *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. aurantibutyricum* y *C. guangxiense* (con un total del 23.37 %). La especie *C. saccharoperbutylacetonicum* es una especie bastante conocida en procesos de fermentación ABE, debido a que puede emplear glucosa, xilosa, sacarosa, entre otros carbohidratos para obtener solventes, y en la fase acidogénica es capaz de obtener H₂, CO₂ y AGVs (Alberto García Mogollón et al., 2023; Baur et al., 2022). Por otro lado, *C. guangxiense*, está más relacionada a la degradación de biomasa para producir H₂, CO₂ y AGVs (D. Li et al., 2023; Noguer et al., 2022; Zagrodnik & Sobociński, 2024). La especie *C. aurantibutyricum* como se había mencionado anteriormente es productora de AGVs, H₂, CO₂ y solventes. Por lo tanto, la presencia de estas especies tiene relación con la alta producción de H₂ característica de sistemas con la especie *C. guangxiense* y la formación de AGVs presentada, que es propia de las especies del género *Clostridium*.

Ahora bien, al final del lote 2 se presenta una comunidad diferente a la obtenida al final del lote 1, en este sentido se presentan las especies del género *Clostridium*: *C. sporogenes* (38.87 %), *C. no asignada* (18.38 %), *C. saccharoperbutylacetonicum* (12.64 %), *C. butyricum* (9.69 %), entre otras. Con respecto al lote 1, en este se observó la poca presencia de *C. guangxiense*, lo cual pudo influenciar la baja

liberación de H₂, por otro lado, aparecieron especies como *C. sporogenes* y *C. butyricum*, las cuales están asociadas a la producción de AGVs (Bilecen Şen & Ertürkmen, 2025; Du et al., 2024; Y. Zhang et al., 2024).

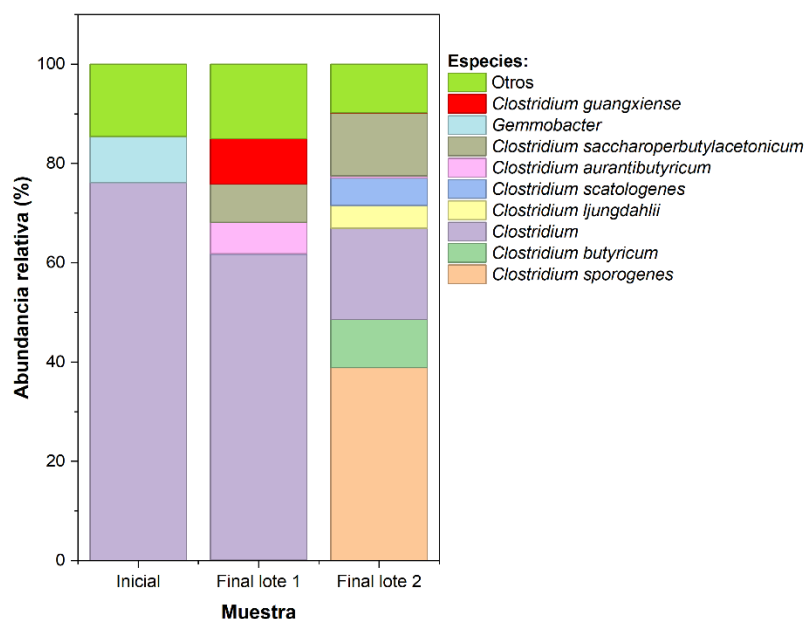


Figura 36. Especies presentes en el BSG antes y al final de cada lote de fermentación

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El pretratamiento alcalino con 0.5 %p/v de NaOH a 120 °C por 30 min con una relación sólido/líquido del 10 %p/p., permitió modificar la estructura lignocelulósica del BSG, favoreciendo la hidrólisis parcial del mismo y la liberación de carbohidratos y azúcares reductores, logrando obtener $8,886 \pm 360$ mg/L de CHT y 1404.4 ± 218.9 mg/L de AR.

Del tratamiento enzimático se concluye que la mezcla de las enzimas Viscozyme L y Ultraflo L a pH 4.50 favoreció la hidrólisis del BSG pretratado alcalinamente, logrando incrementar la concentración de AR hasta $35,000 \pm 942$ mg/L, con un grado de sinergismo de 1.60 y obteniendo un rendimiento de 0.35 g AR/g BSG seco.

Fue posible la producción simultanea de hidrógeno en butanol durante la fermentación de los hidrolizados de BSG en reactor en lote empleando *C. beijerinckii*, y obteniendo rendimientos de 142 mL H₂/ g AR y 0.095 g_{butanol} /g AR.

En reactores operados en lotes con renovación parcial del medio (AR 14), se logró aumentar la productividad total en cuanto a la producción de hidrógeno en un 40 %, mientras que en el butanol no hubo cambios.

Los análisis de secuenciación revelan la adaptación de *C. beijerinckii* con el hidrolizado de BSG en el proceso fermentativo, sin embargo, en la configuración del reactor en lote con renovación parcial del medio se requiere alimentar el reactor a tiempo más cortos (48 h) para mantener el crecimiento de *C. beijerinckii* e inhibir el crecimiento de otros géneros como *C. aurantibutyricum* y *C. carboxidivorans* que no favorecen la producción de butanol, así como asegurar las condiciones de esterilidad y anaerobiosis entre los recambios de medio, ya que no fueron realizados durante esta etapa, solo al inicio de operación del reactor se aseguro el burbujeo con gas nitrógeno.

Por último, la fermentación realizada empleando la microbiota nativa del BSG demostró que este residuo lignocelulósico no solo funciona como fuente de carbono fermentable, sino también como reservorio de microorganismos con capacidad

fermentativa. Los resultados obtenidos evidenciaron la producción de hidrógeno (3.4 L H₂/L) y la presencia de bacterias anaerobias afiliadas principalmente al género *Clostridium*, asociadas con procesos acidogénicos y solventogénicos.

La actividad fermentativa observada indica que la microbiota nativa del BSG posee el potencial metabólico necesario para llevar a cabo procesos de conversión biológica, reduciendo la necesidad de inoculación externa y logrando aprovecharse como una etapa previa a los pretratamientos comúnmente realizados cuando se intenta valorizar este residuo.

Recomendaciones

En cuanto al pretratamiento alcalino se recomienda para futuras investigaciones medir la concentración de posibles inhibidores que se han reportado en la literatura como el hidroximetilfurfural (HMF) y en caso de estar presente en concentraciones elevadas, se recomienda emplear una etapa intermedia de detoxificación del material sólido previo al proceso de sacarificación.

Con lo que respecta al proceso de hidrólisis enzimática se recomienda buscar enzimas con mayor actividad enzimática orientada a la transformación de celulosa en azúcares fermentables, como las Cellic, o bien, estudiar las mismas enzimas empleadas en este trabajo (Viscozyme L y Ultraflo L) con diferentes relaciones entre ellas, para incrementar el grado de sinergismo en el proceso.

Por otro lado, en el proceso fermentativo existen diversas opciones que podrían emplear los futuros investigadores en este tema, tanto el empleo de otra cepa bacteriana como por ejemplo *Clostridium acetobutylicum*, o bien, con el mismo microorganismo *Clostridium beijerinckii* DSM 6422, pero bajo otras condiciones de pH, con el fin de tener una mayor caída de este. Por otro lado, en cuanto al sistema operado en lote con renovación parcial del medio existen parámetros que podrían ser de interés medirlos como la densidad óptica, además de hacer más pruebas para conocer el momento adecuado para realizar la alimentación del ciclo subsecuente, así como colocar más inóculo. Asimismo, es de suma importancia mejorar las condiciones de esterilidad y anaerobiosis al manejar el reactor, ya que ambas condiciones fueron casi nulas en el proceso, se recomienda esterilizar el hidrolizado, el reactor, colocar filtros de membrana a la entrada de gases y líquidos, agregar indicadores redox (como la resazurina), mejorar el sistema de inyección del microorganismo y de la toma de muestras líquidas.

Por último, los resultados obtenidos permitieron plantear como alternativa la valorización directa del BSG empleando su microbiota nativo, previo a etapas de secado y pretratamiento. Este enfoque representa un área con información limitada para este tipo de sustrato bajo las condiciones evaluadas en la presente

investigación, abriendo oportunidades para futuros estudios orientados al aprovechamiento del BSG.

Asimismo, se recomienda evaluar el potencial de la microbiota nativa tanto en sistemas fermentativos individuales como en procesos de codigestión con otros residuos orgánicos, con el objetivo de mejorar el rendimiento y la estabilidad del proceso. El aprovechamiento directo del BSG podría representar una estrategia atractiva para reducir costos operacionales y simplificar etapas de procesamiento en aplicaciones a mayor escala.

Productos obtenidos



SMBB SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA



Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
Del 28 de Septiembre al 3 de Octubre 2025
OAXACA 2025

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería
Otorga la presente
CONSTANCIA

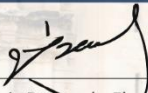
Carlos Moreno Almaguer, Suárez Vázquez Santiago Iván, Valdez Vazquez Idania, Reyna Gómez Lirio María, Cruz López Arquímedes,

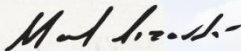
Por la presentación del **TRABAJO LIBRE EN CARTEL** en el área
V. Bioenergía y biocombustibles, titulado:

HIDROLIZADO DE GRANO GASTADO DE CERVEZA PARA LA PRODUCCIÓN SECUENCIAL DE HIDRÓGENO Y BUTANOL EMPLEANDO CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII DSMZ 6422

en el **XXI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**
del 28 de Septiembre al 03 de Octubre del 2025, Oaxaca, Oaxaca, México.


Dr. Francisco José Fernández Perrino
Presidente del Comité Organizador


Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Presidente de la SMBB

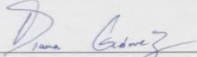

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez
Presidente del Comité Científico

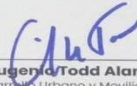
SAN PEDRO GARZA GARCÍA

El **Municipio de San Pedro Garza García N.L.**
otorga la presente constancia a:

Carlos Moreno Almaguer

Por su destacada participación en el Simposio de Investigaciones Ambientales, realizado en el marco del Mes del Medio Ambiente.


Dra. Diana Carolina Gómez García
Directora de Medio Ambiente
Secretaría de Desarrollo Urbano y Movilidad


Ing. Gabriel Eugenio Todd Alanís
Secretario de Desarrollo Urbano y Movilidad

San Pedro Garza García, a 5 de junio del 2026



Referencias bibliográficas consultadas

Aguado García, J. (2020). Selección de alternativas de detoxificación de material lignocelulósico para la producción de biocombustibles oxigenados.

Aguiar, S., Enríquez Estrella, M., & Uvidia Cabadiana, H. (2022). Residuos agroindustriales: su impacto, manejo y aprovechamiento. *AXIOMA*, 1(27), 5–11. <https://doi.org/10.26621/ra.v1i27.803>

Alberto García Mogollón, C., Carlos Quintero Díaz, J., & Omar Gil Posada, J. (2023). Production of acetone, butanol, and ethanol by electro-fermentation with *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Bioelectrochemistry*, 152, 108414. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108414>

Albuquerque, M. M., Sartor, G. de B., Martinez-Burgos, W. J., Scapini, T., Edwiges, T., Soccol, C. R., & Medeiros, A. B. P. (2024). Biohydrogen Produced via Dark Fermentation: A Review. *Methane*, 3(3), 500–532. <https://doi.org/10.3390/methane3030029>

Alvarez-Guzmán, C. L., Rodríguez-Hipólito, F., Chávez-Reyes, Y., & Valdez-Vazquez, I. (2025). Lignocellulosic biomass mixtures improve hydrogen production by promoting microbial complementation in a consolidated bioprocess. *Journal of Cleaner Production*, 489, 144691. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2025.144691>

Amensisa, Y. E., Demsash, H. D., & Tefera, M. E. (2024). Extraction and Characterization of Cellulose from Coffee Husk and Brewery's Spent Grain Fibers Using Alkali-Hydrogen Peroxide Treatment Method. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2024. <https://doi.org/10.1155/2024/5101871>

Andersen, N., Johansen, K. S., Michelsen, M., Stenby, E. H., Krogh, K. B. R. M., & Olsson, L. (2008). Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4), 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.018>

Antonicelli, G., Ricci, L., Tarraran, L., Fraterrigo Garofalo, S., Re, A., Vasile, N. S., Verga, F., Pirri, C. F., Menin, B., & Agostino, V. (2023). Expanding the product

portfolio of carbon dioxide and hydrogen-based gas fermentation with an evolved strain of *Clostridium carboxidivorans*. *Bioresource Technology*, 387, 129689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129689>

Aradwad, P., Ramakrishnan, D. K., Rauh, C., Abdelfattah, A., & Sturm, B. (2026). Storage-driven microbial and quality dynamics of brewer's spent grain for food valorization. *Applied Food Research*, 6(1), 102144. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2026.102144>

Babu, R., Jackowski, M., Capannelli, G., Comite, A., & Trusek, A. (2022). Acid and Alkali Pre-treatment Studies on Brewer's Spent Grains (BSG). *Chemical Engineering Transactions*, 92, 451–456. <https://doi.org/10.3303/CET2292076>

Bachmann, S. A. L., Calvete, T., & Féris, L. A. (2022). Potential applications of brewery spent grain: Critical an overview. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1), 106951. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106951>

Bajpai, P. (2016). *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6>

Barampouti, E. M., Mai, S., Malamis, D., Moustakas, K., & Loizidou, M. (2019). Liquid biofuels from the organic fraction of municipal solid waste: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 110, 298–314. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.005>

Baur, S. T., Markussen, S., Di Bartolomeo, F., Poehlein, A., Baker, A., Jenkinson, E. R., Daniel, R., Wentzel, A., & Dürre, P. (2022). Increased Butyrate Production in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* from Lignocellulose-Derived Sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(7). <https://doi.org/10.1128/aem.02419-21>

Belardi, I., Marrocchi, A., Alfeo, V., Sileoni, V., De Francesco, G., Paolantoni, M., & Marconi, O. (2023). Sequential Extraction and Attenuated Total Reflection–Fourier Transform Infrared Spectroscopy Monitoring in the Biorefining of Brewer's Spent Grain. *Molecules*, 28(24). <https://doi.org/10.3390/molecules28247992>

- Bhatia, L., Sarangi, P. K., Singh, A. K., Prakash, A., & Shadangi, K. P. (2022). Lignocellulosic waste biomass for biohydrogen production: future challenges and bio-economic perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 16(3), 838–858. <https://doi.org/10.1002/bbb.2329>
- Bianco, A., Zara, G., Garau, M., Castaldi, P., Atzori, A. S., Deroma, M. A., Coronas, R., & Budroni, M. (2024). Microbial community assembly and chemical dynamics of raw brewers' spent grain during inoculated and spontaneous solid-state fermentation. *Waste Management*, 174, 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.12.021>
- Bilecen Şen, D., & Ertürkmen, P. (2025). Anti-clostridial effects and technological properties of nisin against *Clostridium sporogenes* in nitrite-reduced heat-treated Turkish-type dry fermented sausage (sucuk). *Meat Science*, 221, 109720. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2024.109720>
- Blanco Londoño, S. A. (2013). Producción de biohidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos-Revisión crítica.
- Branska, B., Koppova, K., Husakova, M., & Patakova, P. (2024). Application of fed-batch strategy to fully eliminate the negative effect of lignocellulose-derived inhibitors in ABE fermentation. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 17(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02520-6>
- Branska, B., Pechacova, Z., Kolek, J., Vasylykivska, M., & Patakova, P. (2018). Flow cytometry analysis of *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 populations exhibiting different phenotypes induced by changes in cultivation conditions. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1096-x>
- Bravo-Venegas, J., Prado-Acebo, I., Gullón, B., Lú-Chau, T. A., & Eibes, G. (2023). Avoiding acid crash: From apple pomace hydrolysate to butanol through acetone-butanol-ethanol fermentation in a zero-waste approach. *Waste Management*, 164, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.03.039>

Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Research*, 2011, 1–17. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>

Campos-Flores, R. C., Suárez-Vázquez, S. I., Trably, E., Bernet, N., & Cruz-López, A. (2026). White-rot fungi as a sustainable pretreatment approach to improve lignocellulosic biomass conversion for biohydrogen production. *Biomass and Bioenergy*, 210, 109040. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2026.109040>

Carbonero Zalduegui, P. (1975). *Bioquímica de las fermentaciones*.

Cheng, C. L., Che, P. Y., Chen, B. Y., Lee, W. J., Lin, C. Y., & Chang, J. S. (2012). Biobutanol production from agricultural waste by an acclimated mixed bacterial microflora. *Applied Energy*, 100, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.05.042>

Cisneros de la Cueva, S., Álvarez Guzman, C. L., Salmerón, I., Pérez Vega, S. B., & Santiago Adame, R. (2024). Producción de biocombustibles a partir de melaza de caña de azúcar usando *Serratia marcescens*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 40. <https://doi.org/10.20937/RICA.55013>

Corchado-Lopo, C., Martínez-Avila, O., Marti, E., Llimós, J., Busquets, A. M., Kucera, D., Obruca, S., Llenas, L., & Ponsá, S. (2021). Brewer's spent grain as a no-cost substrate for polyhydroxyalkanoates production: Assessment of pretreatment strategies and different bacterial strains. *New Biotechnology*, 62, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.01.009>

Coronado, M. A., Montero, G., Montes, D. G., Valdez-Salas, B., Ayala, J. R., García, C., Carrillo, M., León, J. A., & Moreno, A. (2020). Physicochemical Characterization and SEM-EDX Analysis of Brewer's Spent Grain from the Craft Brewery Industry. *Sustainability*, 12(18), 7744. <https://doi.org/10.3390/su12187744>

Cruz-Cardona, Y., Cadena-Chamorro, E., & Arango-Tobón, J. C. (2019). Procesamiento de la Cascarrilla de Cebada Cervecera por Vía Enzimática para la Obtención de Azúcares Fermentables. *Información Tecnológica*, 30(4), 41–50. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000400041>

Cruz-López, A., Cruz-Méndez, A., Suárez-Vázquez, S. I., Reyna-Gómez, L. M., Pecina-Chacón, D. E., & de León Gómez, H. (2022). Effect of Hydraulic Retention Time on Continuous Biohydrogen Production by the Codigestion of Brewery Wastewater and Cheese Whey. *BioEnergy Research*, 17(2), 1155–1166. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10399-0>

Cruz-Méndez, A., Suárez-Vázquez, S. I., Reyna-Gómez, L. M., & Cruz-López, A. (2022). Comparative study between compost and granular sludge inoculums as promising microbial consortia sources for biohydrogen production from food industry wastewater. *Biofuels*, 13(10), 1173–1182. <https://doi.org/10.1080/17597269.2022.2113955>

Dancker, P., Glas, K., & Gastl, M. (2025). Potential utilisation methods for brewer's spent grain: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 60(1). <https://doi.org/10.1093/ijfood/vvae022>

Decker, S. R., Sheehan, J., Dayton, D. C., Bozell, J. J., Adney, W. S., Aden, A., Hames, B., Thomas, S. R., Bain, R. L., Brunecky, R., Lin, C.-Y., Amore, A., Wei, H., Chen, X., Tucker, M. P., Czernik, S., Sluiter, A., Zhang, M., Magrini, K., & Himmel, M. E. (2017). Biomass Conversion. In *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology* (pp. 285–419). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52287-6_6

Di Matteo, P., Bortolami, M., Curulli, A., Feroci, M., Gullifa, G., Materazzi, S., Risoluti, R., & Petrucci, R. (2023). Phytochemical Characterization of Malt Spent Grain by Tandem Mass Spectrometry also Coupled with Liquid Chromatography: Bioactive Compounds from Brewery By-Products. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 28(1). <https://doi.org/10.31083/j.fbl2801003>

Díez-Antolínez, R., Hijosa-Valsero, M., Paniagua-García, A. I., & Gómez, X. (2016). Effect of nutrient supplementation on biobutanol production from cheese whey by ABE (Acetone-Butanol-Ethanol) fermentation. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 217–222. <https://doi.org/10.3303/CET1649037>

Dos Santos, D. M., De Lacerda Bukzem, A., Ascheri, D. P. R., Signini, R., & De Aquino, G. L. B. (2015). Microwave-assisted carboxymethylation of cellulose extracted from brewer's spent grain. *Carbohydrate Polymers*, 131, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.051>

Du, L., Wang, J., Qiu, X., Wang, Q., Peng, H., Huang, J., Yang, F., Liu, Z., & Qi, R. (2024). *Clostridium sporogenes* increases fat accumulation in mice by enhancing energy absorption and adipogenesis. *Microbiology Spectrum*, 12(8). <https://doi.org/10.1128/spectrum.04116-23>

DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Emmanuel, O., Okonkwo, C. C., Akinola, S. A., Atiyeh, H. K., & Ezeji, T. C. (2026). Metabolic synergy of species growth, solvent, and gas production in cocultures of *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium beijerinckii*. *Bioresource Technology Reports*, 102802. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2026.102802>

Fernández-Delgado, M., Plaza, P. E., Coca, M., García-Cubero, M. T., González-Benito, G., & Lucas, S. (2019). Comparison of mild alkaline and oxidative pretreatment methods for biobutanol production from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products*, 130, 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.087>

Galindo Hernández, K. L. (2017). Deslignificación y sacarificación con mezclas enzimáticas del bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de hidrógeno y metano.

Garske, A. L., Kapp, G., & McAuliffe, J. C. (2017). Industrial Enzymes and Biocatalysis. In *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology* (pp. 1571–1638). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52287-6_28

Głowacki, S., Salamon, A., Sojak, M., Tulej, W., Bryś, A., Hutsol, T., Salamon, M., Kukharets, S., & Janaszek-Mańkowska, M. (2022). The Use of Brewer's Spent Grain

after Beer Production for Energy Purposes. *Materials*, 15(10), 3703. <https://doi.org/10.3390/ma15103703>

Grangeiro, L. C., de Mello, B. S., Rodrigues, B. C. G., Rodrigues, C. V., Marin, D. F. C., de Carvalho Junior, R. P., Pires, L. O., Maintinguer, S. I., Sarti, A., & Dussán, K. J. (2023). Dark Fermentation and Principal Routes to Produce Hydrogen. In *Materials for Hydrogen Production, Conversion, and Storage* (pp. 181–223). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119829584.ch7>

Guerrero, K., Gallardo, R., González, E., Veliz, F., Conejeros, R., Gentina, J. C., & Aroca, G. (2022). Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using electro-fermentation in culture medium supplemented with butyrate and neutral red. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 97(6), 1526–1535. <https://doi.org/10.1002/jctb.7007>

Guo, Y., Liu, Y., Guan, M., Tang, H., Wang, Z., Lin, L., & Pang, H. (2022). Production of butanol from lignocellulosic biomass: recent advances, challenges, and prospects. *RSC Advances*, 12(29), 18848–18863. <https://doi.org/10.1039/D1RA09396G>

Gupta, S., Fernandes, A., Lopes, A., Grasa, L., & Salafranca, J. (2024). Microbes and Parameters Influencing Dark Fermentation for Hydrogen Production. *Applied Sciences*, 14(23), 10789. <https://doi.org/10.3390/app142310789>

Han, X., Yang, Z., Wang, M., Tjong, J., & Zheng, M. (2017). Clean combustion of n-butanol as a next generation biofuel for diesel engines. *Applied Energy*, 198, 347–359. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.059>

Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. In *Bioresource Technology* (Vol. 100, Number 1, pp. 10–18). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>

Ibrahim, M. F., Ramli, N., Kamal Bahrin, E., & Abd-Aziz, S. (2017). Cellulosic biobutanol by *Clostridia*: Challenges and improvements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1241–1254. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.184>

Ikechukwu, K. I., Mbagwu, S. N., Oranusi, E. F., Okolie, J. A., Ekeoma, M. O., Okoye, P. U., Arias–Lizárraga, D. M., & Sebastian, P. J. (2026). Analysis of material flows and economic assessment of Mexican agro-industrial wastes for bioenergy and biopolymer production. *Resources, Conservation and Recycling*, 226, 108702. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2025.108702>

INEGI. (2019). Conociendo la Industria de la cerveza. https://www.inegi.org.mx/tablerosestadisticos/industria_cerveza/.

Jain, R., Panwar, N. L., Jain, S. K., Gupta, T., Agarwal, C., & Meena, S. S. (2024). Bio-hydrogen production through dark fermentation: an overview. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(12), 12699–12724. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03282-7>

Jensen, R. O., Schulz, F., Roux, S., Klingeman, D. M., Mitchell, W. P., Udway, D., Moraïs, S., Reynoso, V., Winkler, J., Nagaraju, S., De Tissera, S., Shapiro, N., Ivanova, N., Reddy, T. B. K., Mizrahi, I., Utturkar, S. M., Bayer, E. A., Woyke, T., Mouncey, N. J., ... Brown, S. D. (2024). Phylogenomics and genetic analysis of solvent-producing *Clostridium* species. *Scientific Data*, 11(1), 432. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03210-6>

Jiayang Cheng, Y. sun. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *BioresourceTechnology*, 1–11.

Jin, X., Wang, H., Tian, H., Hu, Y., Peng, N., & Zhao, S. (2025). *Caproiciproducens* converts lactic acid into caproic acid during Chinese strong-flavor Baijiu brewing. *International Journal of Food Microbiology*, 426, 110931. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110931>

Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50(4), 484–524. <https://doi.org/10.1128/mr.50.4.484-524.1986>

Kan, X., Zhang, J., Tong, Y. W., & Wang, C. H. (2018). Overall evaluation of microwave-assisted alkali pretreatment for enhancement of biomethane production

from brewers' spent grain. *Energy Conversion and Management*, 158, 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.12.088>

Karimi, K., Tabatabaei, M., Sárvári Horváth, I., & Kumar, R. (2015). Recent trends in acetone, butanol, and ethanol (ABE) production. *Biofuel Research Journal*, 2(4), 301–308. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.4.4>

Kavalopoulos, M., Stoumpou, V., Christofi, A., Mai, S., Barampouti, E. M., Moustakas, K., Malamis, D., & Loizidou, M. (2021). Sustainable valorisation pathways mitigating environmental pollution from brewers' spent grains. *Environmental Pollution*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116069>

K.N, Y., T.M, M. U., S, K., Sachdeva, S., Thakur, S., S, A. K., & J, R. B. (2023). Lignocellulosic Biorefinery Technologies: A Perception into Recent Advances in Biomass Fractionation, Biorefineries, Economic Hurdles and Market Outlook. *Fermentation*, 9(3), 238. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030238>

Lanzillo, F., Pisacane, S., Raganati, F., Russo, M. E., Salatino, P., & Marzocchella, A. (2025). Kinetic modelling and metabolic shifts in *Clostridium carboxidivorans* during CO-driven continuous fermentation. *Chemical Engineering Science*, 317, 122049. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2025.122049>

Lee, J., & Lin, K.-Y. A. (2024). Bio-Butanol Production on Heterogeneous Catalysts: A Review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 157, 105421. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2024.105421>

Li, D., Ye, G., Zong, X., & Zou, W. (2023). Effect of Multiple Rounds of Enrichment on Metabolite Accumulation and Microbiota Composition of Pit Mud for Baijiu Fermentation. *Foods*, 12(8), 1594. <https://doi.org/10.3390/foods12081594>

Li, J., Zhou, P., Liu, H., Xiong, C., Lin, J., Xiao, W., Gong, Y., & Liu, Z. (2014). Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 155, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.113>

Li, S., Tasnady, D., Cruz, K., Nguyen, N., & Trejo, H. X. (2026). Lignocellulosic municipal waste valorization for energy recovery and circular bioeconomy. *Academia Green Energy*, 3(1). <https://doi.org/10.20935/AcadEnergy8106>

Li, S.-Y., Srivastava, R., Suib, S. L., Li, Y., & Parnas, R. S. (2011). Performance of batch, fed-batch, and continuous A–B–E fermentation with pH-control. *Bioresource Technology*, 102(5), 4241–4250. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.078>

Li, Y., Tang, W., Chen, Y., Liu, J., & Lee, C. F. (2019). Potential of acetone-butanol-ethanol (ABE) as a biofuel. *Fuel*, 242, 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.01.063>

Lin, Z., Cong, W., & Zhang, J. (2023). Biobutanol Production from Acetone–Butanol–Ethanol Fermentation: Developments and Prospects. *Fermentation*, 9(9), 847. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090847>

Liu, C., Ullah, A., Gao, X., & Shi, J. (2023). Synergistic Ball Milling–Enzymatic Pretreatment of Brewer’s Spent Grains to Improve Volatile Fatty Acid Production through Thermophilic Anaerobic Fermentation. *Processes*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/pr11061648>

Liu, J., Zhou, W., Fan, S., Qiu, B., Wang, Y., Xiao, Z., Tang, X., Wang, W., Jian, S., & Qin, Y. (2019). Coproduction of hydrogen and butanol by *Clostridium acetobutylicum* with the biofilm immobilized on porous particulate carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(23), 11617–11624. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.099>

Lobo Gomes, C., Bárbara de Almeida, J., De Souza Rodrigues, D., Galeano Suarez, C. A., & Cavalcanti Montano, I. D. (2023). Mass balance and water demand in the process of alkaline pretreatment of the main brewery residue. *Cadernos UniFOA*, 18(53), 1–13. <https://doi.org/10.47385/cadunifoa.v18.n53.4722>

LOBO GOMES, C., GONÇALVES, E., GALEANO SUAREZ, C. A., DE SOUSA RODRIGUES, D., & CAVALCANTI MONTANO, I. (2021). EFFECT OF REACTION TIME AND SODIUM HYDROXIDE CONCENTRATION ON DELIGNIFICATION AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BREWER’S SPENT GRAIN FROM WO

BRAZILIAN BREWERS. *Cellulose Chemistry and Technology*, 55(1–2), 101–112.
<https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2021.55.10>

Lojananan, N., Cheirsilp, B., Intasit, R., Billateh, A., Srinuanpan, S., Suyotha, W., & Boonsawang, P. (2024). Successive process for efficient biovalorization of Brewers' spent grain to lignocellulolytic enzymes and lactic acid production through simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 397, 130490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130490>

López-Linares, J. C., García-Cubero, M. T., Lucas, S., & Coca, M. (2020). Integral valorization of cellulosic and hemicellulosic sugars for biobutanol production: ABE fermentation of the whole slurry from microwave pretreated brewer's spent grain. *Biomass and Bioenergy*, 135, 105524. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105524>

López-Linares, J. C., García-Cubero, M. T., Lucas, S., González-Benito, G., & Coca, M. (2019). Microwave assisted hydrothermal as greener pretreatment of brewer's spent grains for biobutanol production. *Chemical Engineering Journal*, 368, 1045–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.032>

Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>

Macheiner, D., Adamitsch, B. F., Karner, F., & Hampel, W. A. (2003). Pretreatment and Hydrolysis of Brewer's Spent Grains. *Engineering in Life Sciences*, 3(10), 401–405. <https://doi.org/10.1002/elsc.200301831>

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.

Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock: Biología de los microorganismos*.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Ministerio de Agricultura, G. y P. (n.d.). BAGAZO DE CERVEZA: UN SUBPRODUCTO CON MÚLTIPLES APLICACIONES.

Mitri, S., Salameh, S. J., Khelfa, A., Leonard, E., Maroun, R. G., Louka, N., & Koubaa, M. (2022). Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review. In *Fermentation* (Vol. 8, Number 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020050>

Mokhtarani, B., Zanganeh, J., & Moghtaderi, B. (2025). A Review on Biohydrogen Production Through Dark Fermentation, Process Parameters and Simulation. *Energies*, 18(5), 1092. <https://doi.org/10.3390/en18051092>

Montoya-Rosales, J. de J., Chango-Cañola, A., Delgado-Espitia, P. J., Razo-Flores, E., & Carrillo-Reyes, J. (2026). Potential and trade-offs of native versus sludge-derived microbiota in dark fermentation of agro-industrial effluents. *International Journal of Hydrogen Energy*, 215, 153820. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2026.153820>

Morone, A., & Pandey, R. A. (2014). Lignocellulosic biobutanol production: Gridlocks and potential remedies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 37, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.009>

Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(7), 1264–1275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>

Mussatto, S. I., Dragone, G., Fernandes, M., Milagres, A. M. F., & Roberto, I. C. (2008). The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Cellulose*, 15(5), 711–721. <https://doi.org/10.1007/s10570-008-9215-7>

Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>

Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. F., & Roberto, I. C. (2008). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.006>

Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2005). Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), 2453–2460. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2276>

Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2006). Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(3), 268–274. <https://doi.org/10.1002/jctb.1374>

Noguer, M. C., Magdalena, J. A., Bernet, N., Escudié, R., & Trably, E. (2022). Enhanced Fermentative Hydrogen Production from Food Waste in Continuous Reactor after Butyric Acid Treatment. *Energies*, 15(11), 4048. <https://doi.org/10.3390/en15114048>

Pandey, Ashok., Negi, Sangeeta., Binod, Parameswaran., & Larroche, Christian. (2015). *Pretreatment of biomass : processes and technologies*. Elsevier.

Paz, A., Outeiriño, D., Pérez Guerra, N., & Domínguez, J. M. (2019). Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. *Bioresource Technology*, 275, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.082>

Pecina-Chacón, D. E., Suárez-Vázquez, S., Molina-Guerrero, C. E., & Cruz-López, A. (2023). Producción simultánea de hidrógeno y butanol a partir de grano gastado de cerveza. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 27: 4, 167, ISSN 0188-4786. <https://smbb.mx/revista-biotecnologia-2023-vol-27-no-4-2/>

Pérez-Denicia, E., Fernández-Luqueño, F., Vilariño-Ayala, D., Manuel Montaña-Zetina, L., & Alfonso Maldonado-López, L. (2017). Renewable energy sources for

electricity generation in Mexico: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 597–613. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.009>

Pierre, G., Sannier, F., Goude, R., Nouviaire, A., Maache-Rezzoug, Z., Rezzoug, S.-A., & Maugard, T. (2011). Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.06.004>

Pires, E. J., Ruiz, H. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2012). A New Approach on Brewer's Spent Grains Treatment and Potential Use as Lignocellulosic Yeast Cells Carriers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5994–5999. <https://doi.org/10.1021/jf300299m>

Plaza Lázaro, P. E. (2022). Obtención de biobutanol a partir del residuo sólido de la industria cervecera. Estudio de alternativas y optimización de variables de proceso.

Plaza, P. E., Coca, M., Lucas, S., Fernández-Delgado, M., López-Linares, J. C., & García-Cubero, M. T. (2020). Efficient use of brewer's spent grain hydrolysates in ABE fermentation by *Clostridium beijerinckii*. Effect of high solid loads in the enzymatic hydrolysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(9), 2393–2402. <https://doi.org/10.1002/jctb.6421>

Plaza, P. E., Gallego-Morales, L. J., Peñuela-Vásquez, M., Lucas, S., García-Cubero, M. T., & Coca, M. (2017). Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*. *Bioresource Technology*, 244, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.139>

Puligundla, P., & Mok, C. (2021). Recent advances in biotechnological valorization of brewers' spent grain. *Food Science and Biotechnology*, 30(3), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00900-4>

Punekar, N. S. (2018). pH Studies with Enzymes. In *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* (pp. 267–274). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_24

Raftopoulou, E. (2019). The Suitability of Brewers' Spent Grain (BSG) for 2nd Generation Bioethanol Production: A Combined Biochemical and Economic Assessment.

Rajagopalan, G., He, J., & Yang, K.-L. (2016). One-pot fermentation of agricultural residues to produce butanol and hydrogen by *Clostridium* strain BOH3. *Renewable Energy*, 85, 1127–1134. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.051>

Rajeswari, S., Rajeshkannan, R., & Saravanan, P. (2025). Analyzing the Research Trends in Biohydrogen Production Strategy: A Longitudinal Techno-Historical Study. *SCI Sustainability*, 1(1). <https://doi.org/10.1002/sst2.70006>

Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., & Jaiswal, A. K. (2018). A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. *Bioresource Technology*, 248, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.039>

Rawoof, S. A. A., Kumar, P. S., Vo, D.-V. N., & Subramanian, S. (2021). Sequential production of hydrogen and methane by anaerobic digestion of organic wastes: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(2), 1043–1063. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01122-6>

Reyna Gómez, L. (2021). PRODUCCIÓN DE H₂ A PARTIR DE LA CODIGESTIÓN DE CÁSCARAS DE FRUTAS Y LODOS DE UNA PLANTA TRATADORA DE AGUA RESIDUAL A ESCALA LABORATORIO.

Reyna-Gómez, L. M., Molina-Guerrero, C. E., Alfaro, J. M., Suárez Vázquez, S. I., Robledo-Olivo, A., & Cruz-López, A. (2019). Effect of Carbon/Nitrogen Ratio, Temperature, and Inoculum Source on Hydrogen Production from Dark Codigestion of Fruit Peels and Sewage Sludge. *Sustainability*, 11(7), 2139. <https://doi.org/10.3390/su11072139>

Rosset, M., Prudencio, S. H., & Beléia, A. D. P. (2012). Viscozyme L action on soy slurry affects carbohydrates and antioxidant properties of silken tofu. *Food Science and Technology International*, 18(6), 531–538. <https://doi.org/10.1177/1082013211433076>

Saldarriaga-Hernandez, S., Esparza-Vasquez, A., Villalvazo-García, D., García-Rodríguez, J. M., Zavala-Campos, M., González-Díaz, R. L., Amaya-Delgado, L., Tamayo, E., Benz, J. P., & Carrillo-Nieves, D. (2025). Fungal lignocellulolytic enzyme profiling: evaluating the potential for enhancing brewer's spent grains saccharification. *Environmental Technology & Innovation*, 39, 104224. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2025.104224>

Salud Justa Mx. (2024). Observatorio del uso de alcohol en México Indicadores epidemiológicos y económicos. https://saludjusta.mx/wp-content/uploads/IndicadoresAlcohol_2024.pdf

Sarkar, O., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2021). Influence of initial uncontrolled pH on acidogenic fermentation of brewery spent grains to biohydrogen and volatile fatty acids production: Optimization and scale-up. *Bioresource Technology*, 319, 124233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124233>

Satishkumar, P., Isloor, A. M., & Farnood, R. (2023). Continuous Production of Clean Hydrogen from Wastewater by Microbial Usage. In *Materials for Hydrogen Production, Conversion, and Storage* (pp. 277–318). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119829584.ch10>

Schoch, T., Höfele, F., Odeh, H., Winter, L.-M., Stöferle, S., Karl, M., Bengelsdorf, F., Poehlein, A., Daniel, R., & Dürre, P. (2022). Reclassification of *Clostridium aurantibutyricum* Hellinger 1944 and *Clostridium roseum* (ex McCoy and McClung 1935) Cato et al. 1988. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(10). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005589>

Sedlar, K., Koscova, P., Vasylykivska, M., Branska, B., Kolek, J., Kupkova, K., Patakova, P., & Provaznik, I. (2018). Transcription profiling of butanol producer *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 using RNA-Seq. *BMC Genomics*, 19(1), 415. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4805-8>

Sganzerla, W. G., Costa, J. M., Tena-Villares, M., Buller, L. S., Mussatto, S. I., & Forster-Carneiro, T. (2022). Dry Anaerobic Digestion of Brewer's Spent Grains toward a More Sustainable Brewery: Operational Performance, Kinetic Analysis, and

Bioenergy Potential. Fermentation, 9(1), 2.
<https://doi.org/10.3390/fermentation9010002>

Sharma, R. (2024). Agro-industrial waste to energy - Sustainable management. Sustainable Materials and Technologies, 41, e01117.
<https://doi.org/10.1016/j.susmat.2024.e01117>

Sharma, S., Basu, S., Shetti, N. P., & Aminabhavi, T. M. (2020). Waste-to-energy nexus for circular economy and environmental protection: Recent trends in hydrogen energy. Science of The Total Environment, 713, 136633.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136633>

Shuler, M., & Kargi, F. (2002). Bioprocess Engineering Basic Concepts (Second). Pearson College Division.

Sibono, L., Tronci, S., Hajrizaj, R., Christensen, K. V., Errico, M., & Grosso, M. (2023). Optimization and kinetic analysis of untreated brewers' spent grain saccharification process via enzymatic hydrolysis. Biochemical Engineering Journal, 198, 109044. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109044>

Silbir, S., & Goksungur, Y. (2019). Natural red pigment production by *monascus purpureus* in submerged fermentation systems using a food industry waste: Brewer's spent grain. Foods, 8(5). <https://doi.org/10.3390/foods8050161>

Singh, H., Tomar, S., Qureshi, K. A., Jaremko, M., & Rai, P. K. (2022). Recent Advances in Biomass Pretreatment Technologies for Biohydrogen Production. Energies, 15(3), 999. <https://doi.org/10.3390/en15030999>

Singh, O., & Chandel, A. (2018). Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy (O. V. Singh & A. K. Chandel, Eds.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6>

Singh, V., Singh, H., & Das, D. (2019). Optimization of the medium composition for the improvement of hydrogen and butanol production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923. International Journal of Hydrogen Energy, 44(49), 26905–26919. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.125>

Singh, V., Yadav, S., Sen, R., & Das, D. (2020). Concomitant hydrogen and butanol production via co-digestion of organic wastewater and nitrogenous residues. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(46), 24477–24490. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.282>

Sivagurunathan, P., & Lin, C.-Y. (2020). Biohydrogen Production From Beverage Wastewater Using Selectively Enriched Mixed Culture. *Waste and Biomass Valorization*, 11(3), 1049–1058. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00606-z>

Soares, J. F., Mayer, F. D., & Mazutti, M. A. (2024). Hydrogen production from Brewer's spent grain hydrolysate by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 352–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.06.076>

Sørensen, H. R., Meyer, A. S., & Pedersen, S. (2003). Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan. 1. Synergy between α -L-arabinofuranosidases, endo-1,4- β -xylanases, and β -xylosidase activities. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(6), 726–731. <https://doi.org/10.1002/bit.10519>

Stephen, J. L., & Periyasamy, B. (2018). Innovative developments in biofuels production from organic waste materials: A review. *Fuel*, 214, 623–633. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.042>

Su, C., Zhang, C., Wu, Y., Zhu, Q., Wen, J., Wang, Y., Zhao, J., Liu, Y., Qin, P., & Cai, D. (2022). Combination of pH adjusting and intermittent feeding can improve fermentative acetone-butanol-ethanol (ABE) production from steam exploded corn stover. *Renewable Energy*, 200, 592–600. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.10.008>

Tandon, M., Thakur, V., Tiwari, K. L., & Jadhav, S. K. (2018). *Enterobacter ludwigii* strain IF2SW-B4 isolated for bio-hydrogen production from rice bran and de-oiled rice bran. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.03.008>

Tang, J., Dai, K., Wang, Q.-T., Zheng, S.-J., Hong, S.-D., Jianxiong Zeng, R., & Zhang, F. (2022). Caproate production from xylose via the fatty acid biosynthesis pathway by genus *Caproiciproducens* dominated mixed culture fermentation.

Bioresource Technology, 351, 126978.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126978>

Tang, S., Liu, W., Huang, C., Lai, C., Fan, Y., & Yong, Q. (2019). Improving the enzymatic hydrolysis of larch by coupling water pre-extraction with alkaline hydrogen peroxide post-treatment and adding enzyme cocktail. *Bioresource Technology*, 285, 121322. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121322>

Terefe, G. (2022). Preservation techniques and their effect on nutritional values and microbial population of brewer's spent grain: a review. *CABI Agriculture and Bioscience*, 3(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s43170-022-00120-8>

Valdez-Vazquez, I., Pérez-Rangel, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., & Amaya-Delgado, L. (2015). Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. *Fuel*, 159, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.052>

Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. In *Biotechnology Advances* (Vol. 30, Number 6, pp. 1458–1480). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)

Vaz, S. (2016). Analytical techniques and methods for biomass. In *Analytical Techniques and Methods for Biomass*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41414-0>

Velázquez-Sánchez, H. I., Montes-Horcasitas, M. C., & Aguilar-López, R. (2014). Construcción de un modelo cinético fenomenológico para la producción de butanol usando *Clostridium beijerinckii*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13.

- Veza, I., Muhamad Said, M. F., & Latiff, Z. A. (2021). Recent advances in butanol production by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 144, 105919. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105919>
- Vilela, R., Saia, F. T., Gregoracci, G. B., Duarte, R., Andrade, P., van der Zaan, B., Langenhoff, A., & Damianovic, M. H. R. Z. (2019). Hydrogen production in reactors: The influence of organic loading rate, inoculum and support material. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(50), 27259–27271. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.180>
- 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. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-2-15>
- Wagner, E., Pería, M. E., Ortiz, G. E., Rojas, N. L., & Ghiringhelli, P. D. (2021). Valorization of brewer's spent grain by different strategies of structural destabilization and enzymatic saccharification. *Industrial Crops and Products*, 163. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113329>
- Wang, J., & Yin, Y. (2017). Biohydrogen Production from Organic Wastes. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4675-9>
- Wilke, C., Maiorella, B., Sciamanna, A., Tangnu, K., Wiley, D., & Wong, H. (1980). *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Theory and Applications*.
- Wilkinson, S., Smart, K. A., & Cook, D. J. (2014). Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 62, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.036>
- Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological Potential of Brewers Spent Grain and its Recent Applications. *Waste and Biomass Valorization*, 3(2), 213–232. <https://doi.org/10.1007/s12649-012-9108-8>
- Xu, T., Chen, M., Meng, X., Kuang, W., Zhang, S., Li, D., Leng, L., Li, H., & Zhan, H. (2025). Acid/alkali-assisted hydrothermal valorization of brewer's spent grain:

Insights from element distribution and product potential. *Journal of Cleaner Production*, 519, 145990. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2025.145990>

Young, T. (2026). Types of beer. <https://www.britannica.com/topic/beer/Types-of-beer>

Yumnam, P., & Debnath, P. (2023). A Review on Mathematical Modeling of Different Biological Methods of Hydrogen Production. *Hydrogen*, 4(4), 881–916. <https://doi.org/10.3390/hydrogen4040053>

Zacharie Merlin Ayissi, Bernard Nchare, Nazia Hossain, Severin Mbog, Stéphane Lontsi Kenfack, & Dieudonné Bitondo. (2024). Organoenergetic Investigation on the Potential of Industrial Brewers' Spent Grain Valorization for Biogas Production. *Advanced Energy Conversion Materials*, 246–258. <https://doi.org/10.37256/aecm.5220245114>

Zagrodnik, R., & Laniecki, M. (2015). The role of pH control on biohydrogen production by single stage hybrid dark- and photo-fermentation. *Bioresource Technology*, 194, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.028>

Zagrodnik, R., & Sobociński, D. (2024). Continuous dark-fermentative H₂ production using carbon components of lignocellulose hydrolysates: Insight into the difference between mixed and single substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.06.119>

Zeko-Pivač, A., Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Kulisic, B., Sakellaris, G., Hao, J., & Planinić, M. (2022). The Potential of Brewer's Spent Grain in the Circular Bioeconomy: State of the Art and Future Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.870744>

Zhang, C., Li, T., Su, G., & He, J. (2020). Enhanced direct fermentation from food waste to butanol and hydrogen by an amylolytic *Clostridium*. *Renewable Energy*, 153, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.151>

Zhang, C., Si, Z., Zhang, L., Wen, J., Su, C., Chen, H., Zhao, J., Cai, D., Zhang, X., & Qin, P. (2022). Reduction wastewater discharge in second-generation acetone-

butanol-ethanol (ABE) fermentation process by adsorptive removal of organic acids toward the broth recycling system. *Journal of Cleaner Production*, 337, 130573. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130573>

Zhang, Y., Bailey, T. S., Hittmeyer, P., Dubois, L. J., Theys, J., & Lambin, P. (2024). Multiplex genetic manipulations in *Clostridium butyricum* and *Clostridium sporogenes* to secrete recombinant antigen proteins for oral-spore vaccination. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02389-y>

Zhang, Y., Li, J., Meng, J., Sun, K., & Yan, H. (2021). A neutral red mediated electro-fermentation system of *Clostridium beijerinckii* for effective co-production of butanol and hydrogen. *Bioresource Technology*, 332, 125097. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125097>

Zhou, Q., Liu, Y., & Yuan, W. (2020). Kinetic modeling of butyric acid effects on butanol fermentation by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *New Biotechnology*, 55, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.10.004>