



# Soluciones de base biológica para una economía sostenible y baja en carbono: el caso del *n*-butanol

**Ana Maria Zetty Arenas, PhD**

**Investigadora Postdoctoral en Ingeniería de Bioprocesos  
Instituto Flamenco de Investigaciones Tecnológicas (VITO), Bélgica**

*Cali, Colombia, 31 de agosto de 2022*

# Agenda

- Motivación por las energías renovables
- Biorrefinería de la caña de azúcar
- El caso de la producción de *n*-butanol 2G
- Ejemplos de bioeconomía sostenible utilizando CO<sub>2</sub>
- Comentarios finales



# ¿Dónde está nuestro trabajo en la Agenda Global?

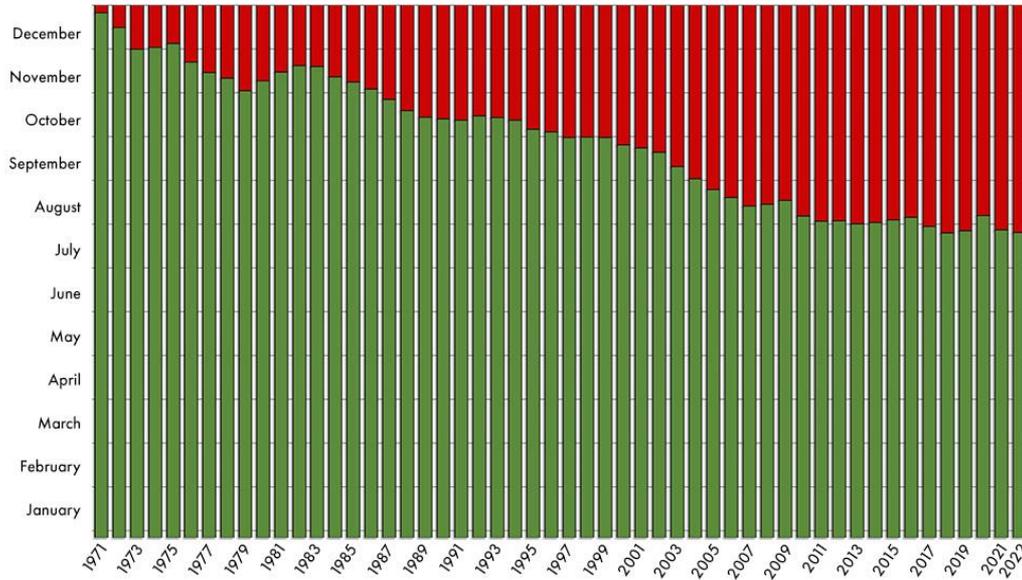


1 Earth

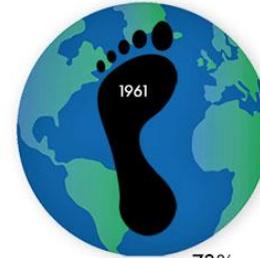
## Earth Overshoot Day 1971 - 2022



1.75 Earths



### Busting our Biocapacity Budget



# Recursos fósiles X Recursos renovables



## Energía mundial

Recursos fósiles (31,4% petróleo crudo, 29% carbón mineral y 21,3% gas natural)

Recursos no renovables

Impactos ambientales (GEI)

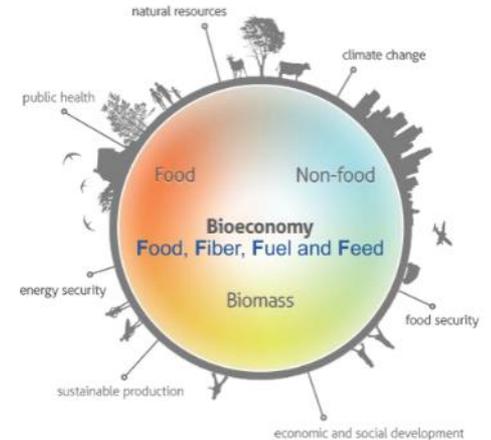
Alta fluctuación de precios



*TRANSICIÓN  
HACIA  
UN SISTEMA  
DE ENERGÍA  
BAJO EN  
CARBONO*

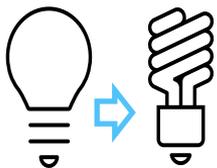


Combustibles ecológicos →  
Biotecnología



# Descarbonización de la economía

Una combinación de tecnologías de descarbonización puede ayudar a la industria a reducir las emisiones, destacándose:



**Eficiencia energética**

Adaptar los equipos de producción para reducir el uso de energía por volumen producido



**Electrificación del calor**

Reemplazar el combustible fósil para calefacción con electricidad renovable



**CCS/CCU**

Capturar el CO<sub>2</sub> emitido y almacenarlo (CCS) o utilizarlo (CCU).

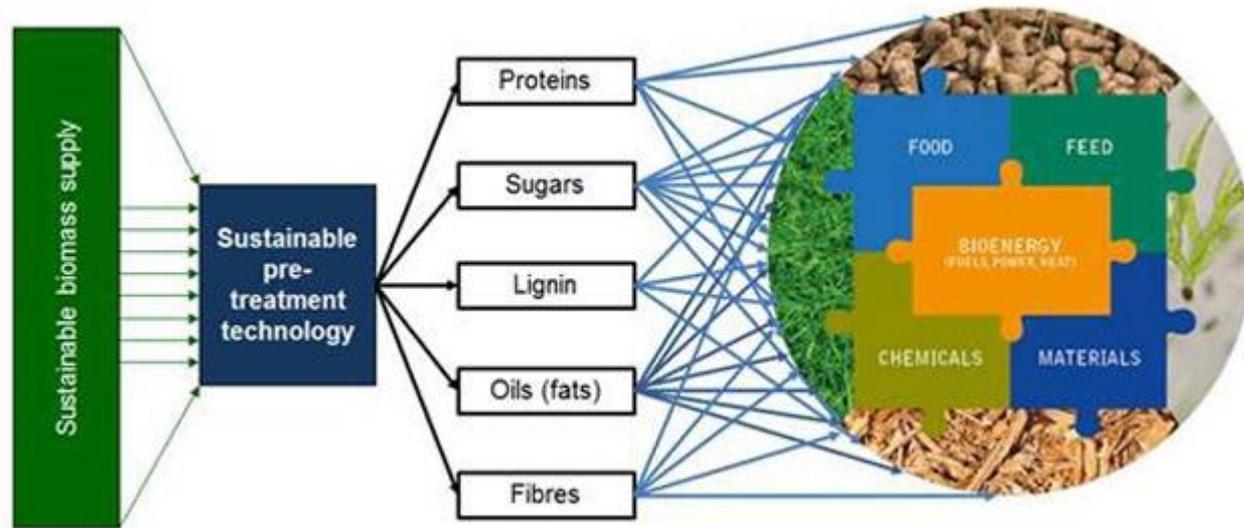


**Biomasa**

Reemplazar la materia prima o el combustible con biomasa producida de manera sostenible para reducir las emisiones de CO<sub>2</sub>

# BIORREFINERÍAS: cerrando la brecha para una economía sostenible

La biorrefinación es el procesamiento sostenible de la biomasa en un espectro de productos de base biológica comercializables y bioenergía (IEA, tarea 42).



# Potencial bioenergético en ALC



América Latina y el Caribe presentan excelentes condiciones para producir bioenergía:

- ✓ Alrededor de **360 millones de hectáreas de tierra apta para la agricultura de secano están disponibles** para expandir la agricultura en ALC (FAO, 2012)
- ✓ **37% del total global y más de 3X el área** requerida para satisfacer las futuras necesidades mundiales de **alimentos**.
- ✓ El **20% de esta área**, adecuadamente gestionada y utilizando procesos eficientes puede **producir anualmente 24 EJ de biocombustibles líquidos**, equivalentes **millones de bpd de petróleo**, más que la producción actual de USA o Arabia Saudita.
- ✓ Estos biocombustibles evitarán la emisión de **1580 millones de ton. de CO<sub>2</sub>eq/año**.



# CAÑA DE AZÚCAR: una excelente materia prima para biocombustibles

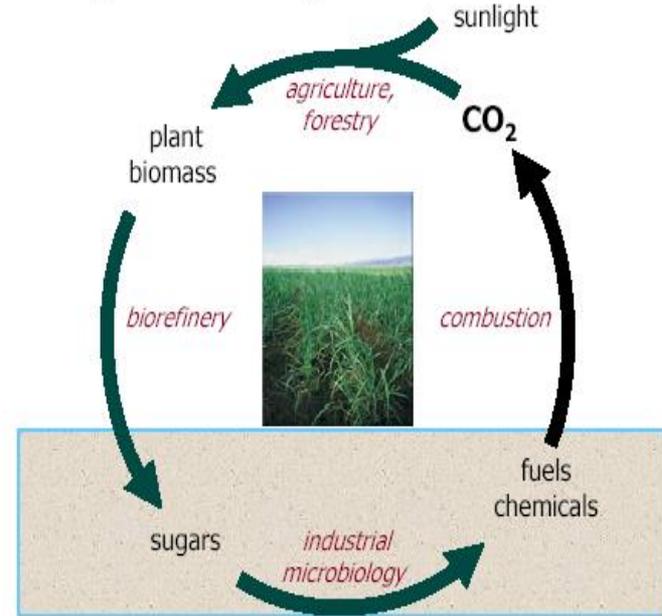
**LA CAÑA DE AZÚCAR, un cultivo tradicional en casi todos los países tropicales:**

- Uno de los **convertidores de energía solar a biomasa más eficientes**.
- Un **cultivo semipermanente**, plantado una vez y cosechado anualmente durante **5 a 6 años**.

En conjunto, **1 ton. de caña de azúcar** equivale a **1,2 barril de petróleo**, por lo tanto:

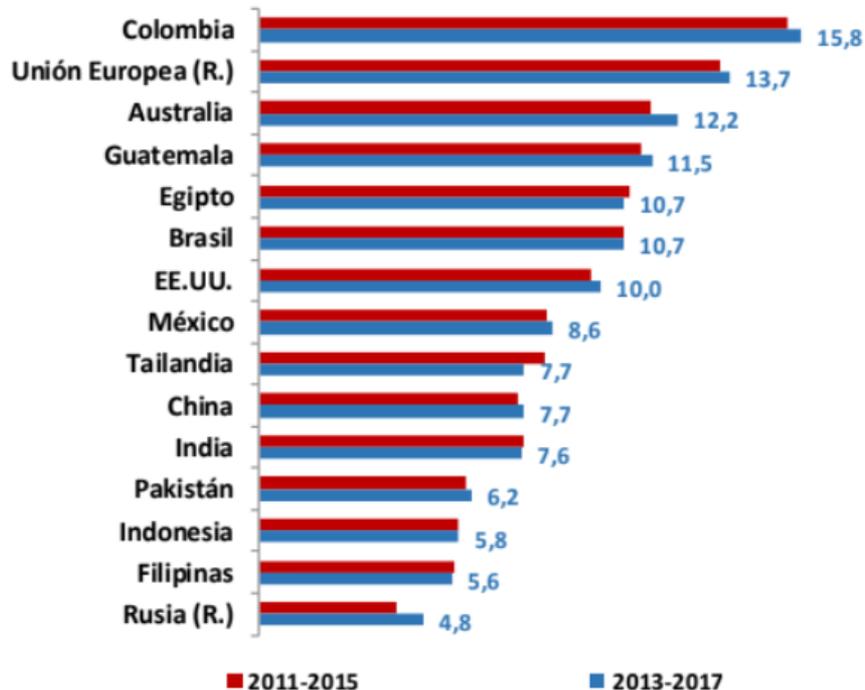
**Una hectárea de caña de azúcar produce más de 100 barriles de petróleo al año, durante muchos años...**

**Balancing the Carbon Cycle: Industrial Biotechnology**



# La agroindustria azucarera de Colombia es modelo mundial de productividad

Indicador de productividad mundial de azúcar. Principales países productores (toneladas de azúcar por hectárea)\*



En la mayoría de los países, **la caña de azúcar** se puede cosechar, en promedio, de **4 a 6 meses al año**.

Sin embargo, **Colombia** tiene el privilegio de tener una de las mejores **condiciones agroclimáticas** del mundo para la producción de caña de azúcar que proporciona **cosechas durante todo el año**.

\* Se refiere a la cantidad de azúcares totales ajustado por edad de corte  
(R.): Remolacha

Fuente: LMC International ([www.lmc.co.uk](http://www.lmc.co.uk))

# Etanol de Primera Generación en Brasil – quizás el mayor impacto social positivo del sector industrial en las últimas décadas



2011/12: 8,5 millones de ha

- Etanol: 23 mil millones litros
- Azúcar: 36 Mt
- 250 plantas: sacarosa + etanol
- 168 plantas: exclusivo para etanol

**Uso de <1% de la tierra cultivable!**

1 tonelada de caña de azúcar (80 ton/ha) produce:

- 250 Kg de bagazo (~40% humedad)
- 120 Kg de azúcar
- 85 litros de etanol



70.000 cultivadores  
1,2 millones de puestos de trabajo  
Ingresos anuales: US\$ 48 mil millones  
Exportaciones: US 15 mil millones

Cantarella, 2015

# La paja de caña de azúcar y su enorme potencial en la bioenergía

Biomass and Bioenergy 144 (2021) 105896

Contents lists available at ScienceDirect

Biomass and Bioenergy

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/biombioe>



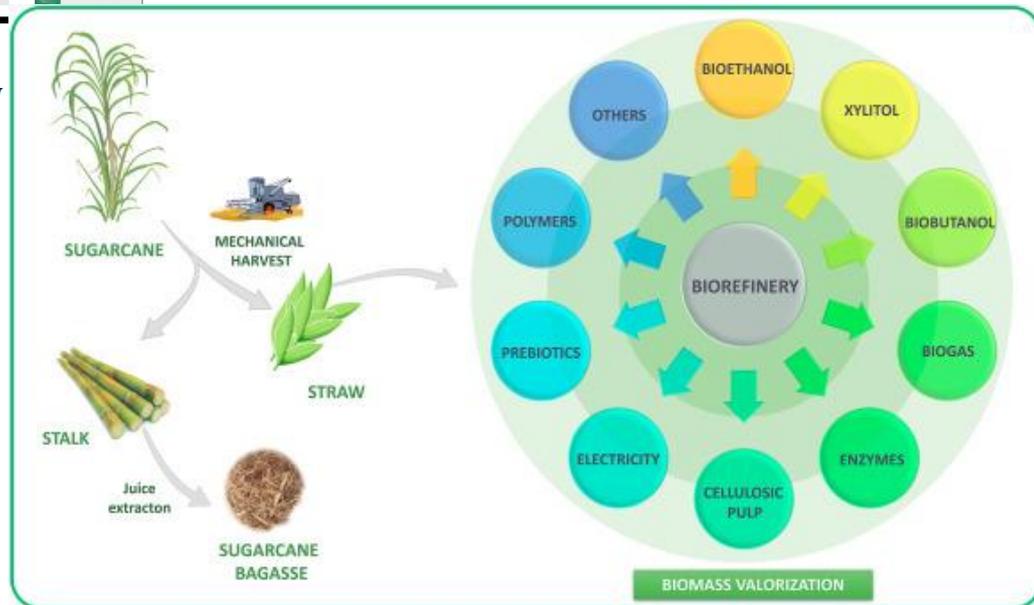
Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications

André Aguiar<sup>a,b</sup>, Thais Suzane Milessi<sup>a,c</sup>, Daniella Regina Mulinari<sup>d</sup>, Melina Savioli Lopes<sup>e</sup>, Sirlene Maria da Costa<sup>f</sup>, Rafael Garcia Candido<sup>g,\*</sup>

La **paja** de caña de azúcar (SCS) representa alrededor de **1/3 de la energía primaria total de la caña de azúcar**.

En Brasil su quema previa a la cosecha está **PROHIBIDA**.

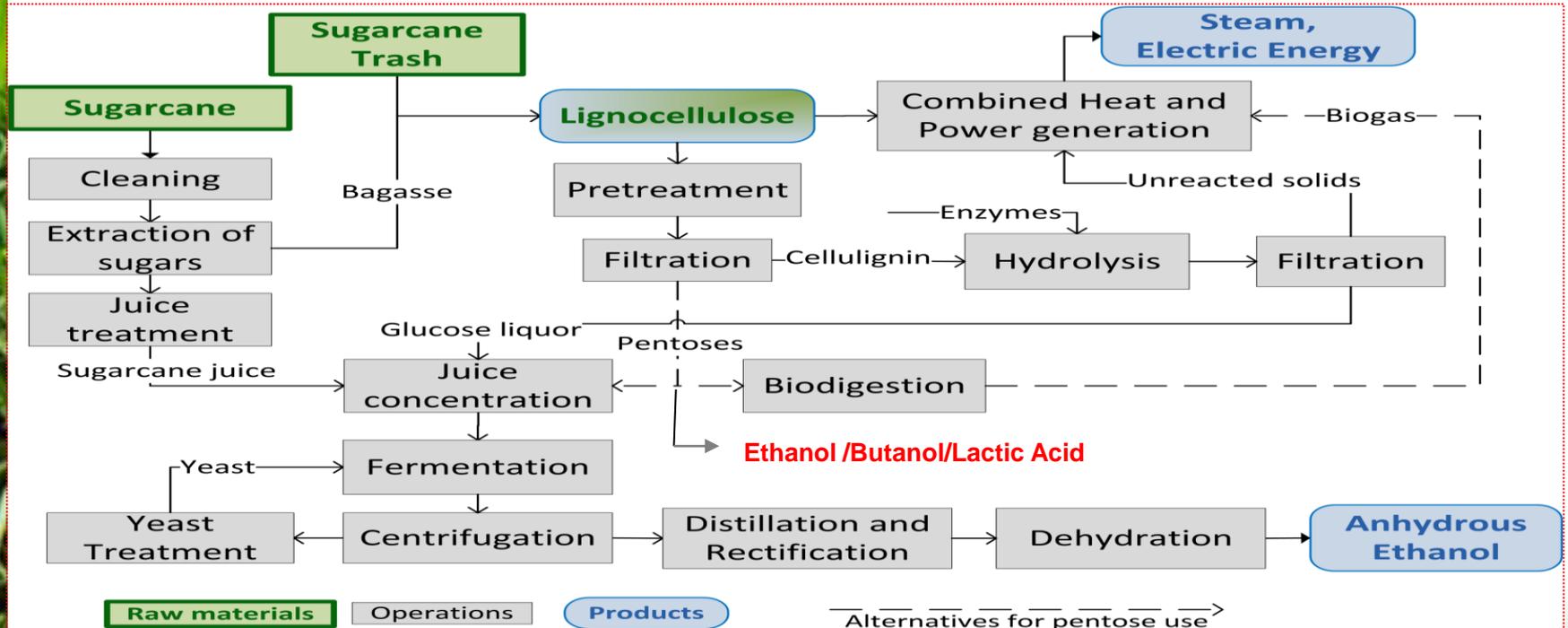
La cantidad disponible de SCS ha crecido y el desarrollo de **aplicaciones valiosas** para este material lignocelulósico se ha vuelto crucial para el desarrollo de una **economía circular**.



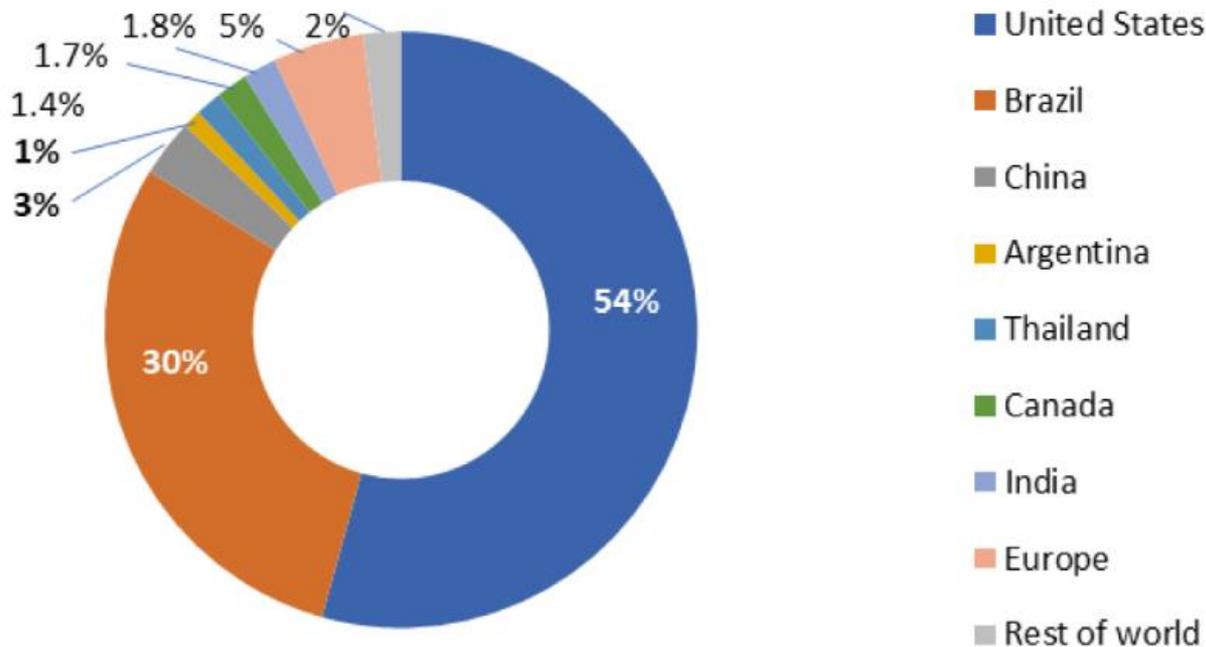
Potential applications of sugarcane straw. (Aguiar et al. 2021)

# Biorrefinería de la caña de azúcar

Diagrama de flujo de bloques - Producción integrada de bioetanol, butanol y biogás de 1ª y 2ª generación a partir de la caña de azúcar



# Producción de etanol combustible por país



Production of fuel ethanol by country (share of global production) in 2019.  
Adapted from: 2020 Ethanol Industry Outlook. Renewable Fuel Association (RFA).

# Llegan los carros eléctricos... ¿Usarán etanol?

## Concept of e-Bio Fuel Cell

### High efficiency

- Running cost equivalent to EV
- Long range



e-Bio Fuel-Cell

### Easy to supply

- Short refueling time
- Low infrastructure constraints
- Safe fuel (ethanol-blended water)



100% ethanol



Ethanol-blended water

### Carbon neutral cycle

### Clean

- Exhaust as clean as atmosphere



Sugarcane

Bioethanol

NISSAN

e-Bio Fuel-Cell utiliza etanol como fuente de combustible para generar electricidad a través de la **celda de combustible de óxido sólido (SOFC)**.

La electricidad generada carga la batería que proporciona energía al vehículo.



(C) Copyright NISSAN MOTOR CO., LTD. 2016 All rights reserved.

# Biocombustibles



## Etanol 1G

USA y Brasil



573 MMT de caña de azúcar

➔ 143 MMT de bagazo (50% humedad)

(UNICA, 2018/2019)

## Etanol 2G

Subproductos (bagazo /paja)



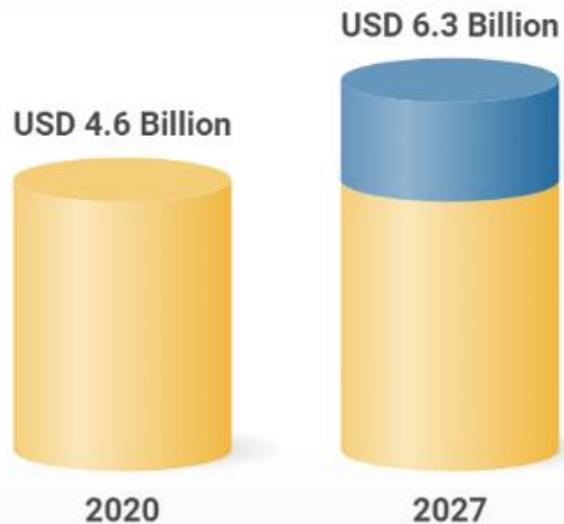
➔ Fracción C6 (*S. cerevisiae*)

➔ **Fracción C5** ➔ Microorganismos  
menos explorados

# *n*-Butanol

## Global Market for *n*-Butanol

Market forecast to grow at CAGR of 4.8%



# n-Butanol



Propiedades del combustible	Butanol	Etanol	Gasolina
Contenido energético (MJ/L)	<b>29.2</b>	21.2	32.0

## Combustible superior

- **Mayor densidad energética**
- Se puede **utilizar directamente** (sin adaptaciones)
- **Menos higroscópico**, menos **volátil** y menos **corrosivo** que el etanol
- Puede fabricarse en las **plantas de etanol actuales**.

## Producción

Ruta petroquímica (OXO)

**Ruta bioquímica (FERMENTACIÓN ABE)**



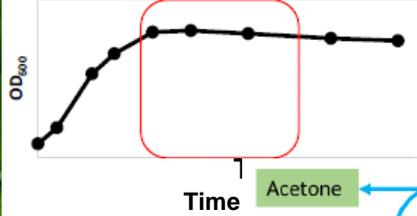
# Fermentación ABE

*Clostridium* spp. solventogénico

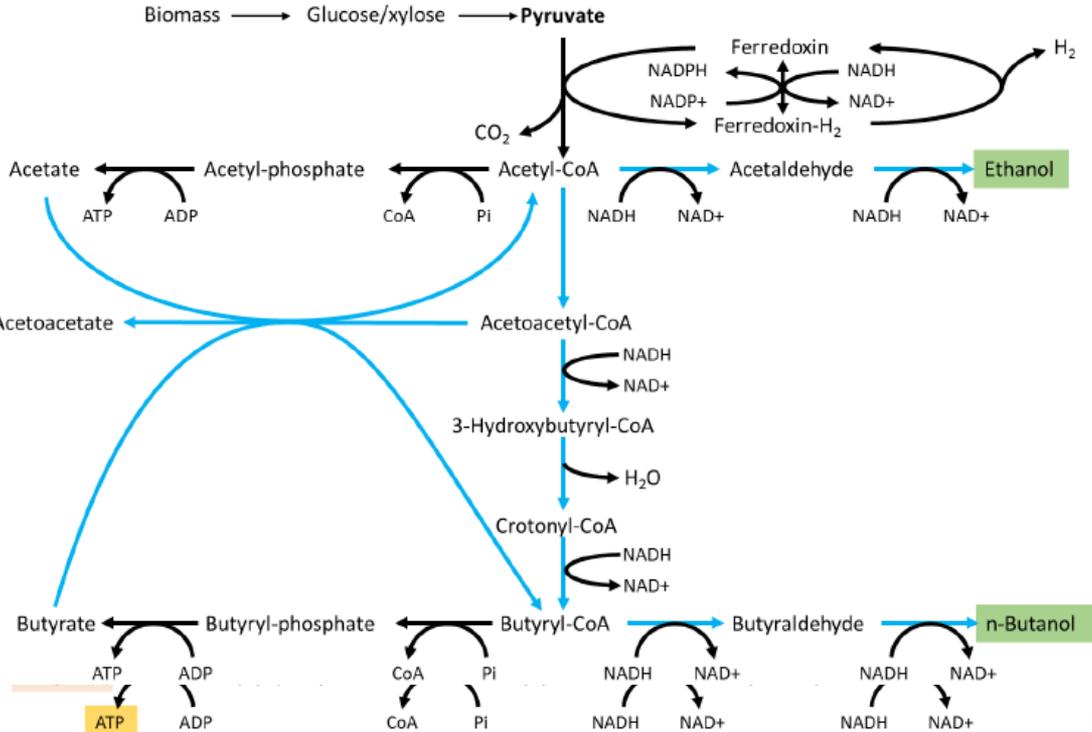
- Gram positiva
- Forma esporos
- Anaeróbica
- C6/C5

## Fase solventogénica

Fase fermentaria



pH



# Desafíos de la fermentación ABE



- ☹ **Materia prima de alto costo**
- ☹ **Baja concentración**
- ☹ **Bajo rendimiento**
- ☹ **Baja productividad**

## Estrategias para superar los desafíos



### Materiales lignocelulósicos

- ✓ Beneficios para el **medio ambiente**
- ✓ El renovable más **abundante**
- ✓ Fuente de carbono de **bajo costo**
- ✓ No compite con la producción de alimentos



**Desarrollo de cepas**



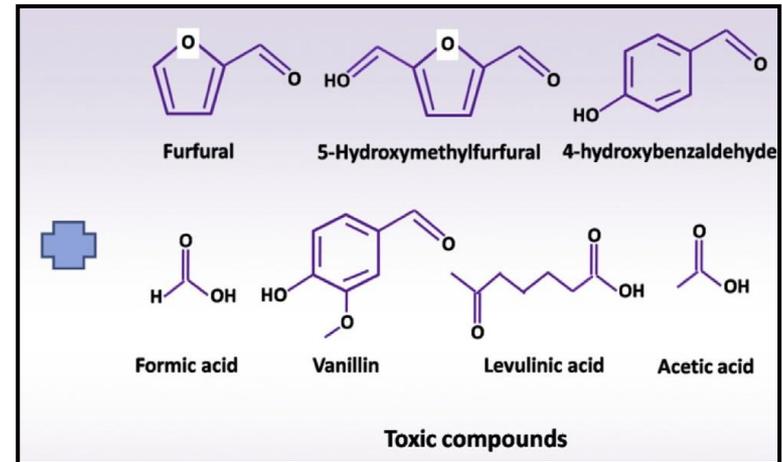
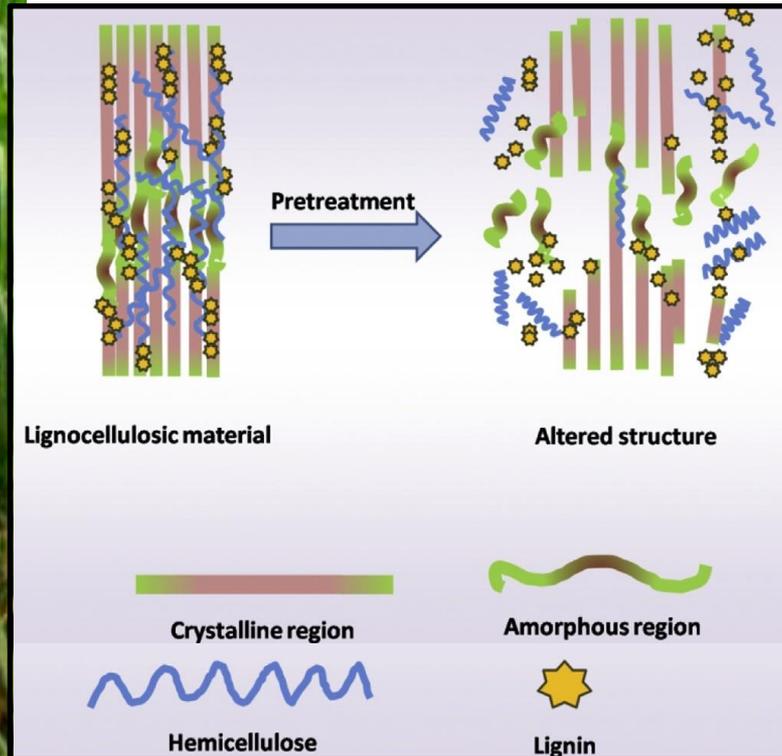
**Desarrollo del proceso de fermentación**



# Biomasa Lignocelulósica - Pretratamiento



*El pretratamiento tiene como objetivo disminuir la cristalinidad de la celulosa, aumentar el área de superficie de la biomasa, remover la hemicelulosa y romper el sello de lignina*



Source: Phitsuwan et al. 2013.



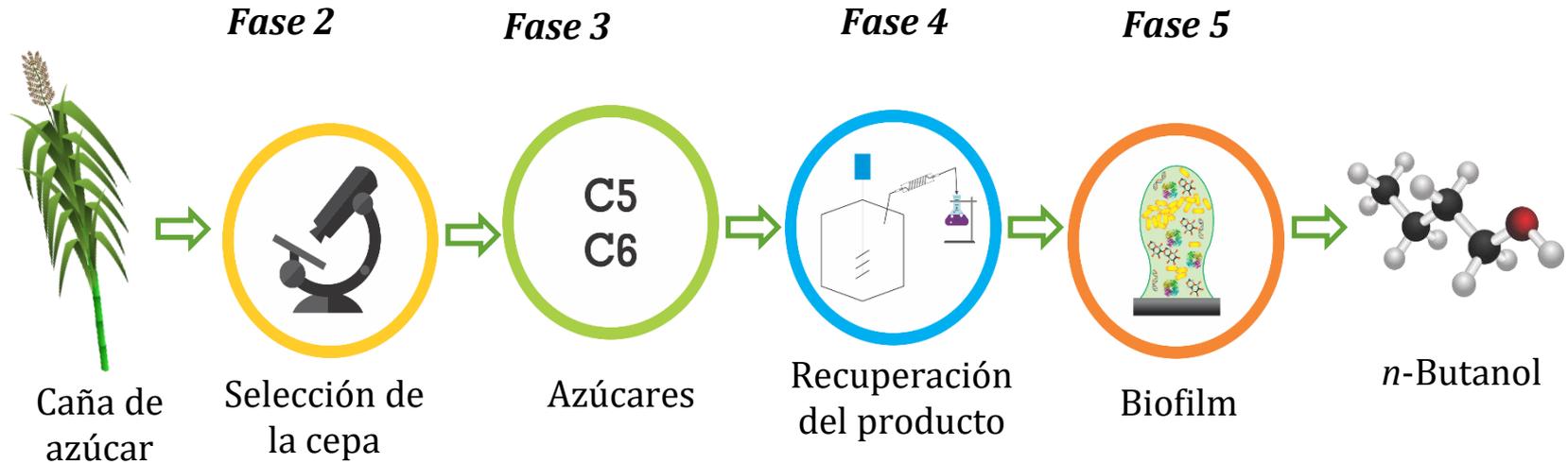
## *Objetivo*



Investigar enfoques integrados para mejorar producción de ***n*-butanol de segunda generación** utilizando subproductos de la **caña de azúcar**

# Desarrollo del Proyecto

## Fase 1 Introducción



Conclusiones



Contents lists available at ScienceDirect

Biomass and Bioenergy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biombio](http://www.elsevier.com/locate/biombio)



Research paper

Towards enhanced *n*-butanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate: Strain screening, and the effects of sugar concentration and butanol tolerance



Ana Maria Zetty-Arenas<sup>a,b,c</sup>, Rafael Ferraz Alves<sup>b</sup>, Carla Andreia Freixo Portela<sup>b</sup>, Adriano Pinto Mariano<sup>c</sup>, Thiago Olitta Basso<sup>d</sup>, Laura Plazas Tovar<sup>e</sup>, Rubens Maciel Filho<sup>c</sup>, Sindelia Freitas<sup>b,c,\*</sup>

## Fase 2



Towards enhanced ***n*-butanol production** from sugarcane bagasse **hemicellulosic hydrolysate**:  
Selección de la **cepa** y efecto de la concentración del **azúcar** y **tolerancia al butanol**

# Selección de la cepa



## *C. saccharoperbutylacetonicum*

### El más alto:

- ✓ Consumo de azúcar
- ✓ Rendimiento de butanol
- ✓ Concentración de butanol



- ✓ **Tolerancia al butanol**

- ✓ **Más tolerancia a las CI en el hidrolizado hemicelulósico**



# Results

**Tabla 1.** Rendimiento de la fermentación ABE usando las cuatro cepas de Clostridia solventogénicas usando glucosa y xilosa como únicas fuentes de carbono, después de 48 h de fermentación.

Strain <sup>(a)</sup>	OD <sub>600nm</sub> <sup>(b)</sup>	Yield <sup>(c)</sup> (g/g)		Productivity (g/L h)		Consumption rate (g/L h)	Residual sugar (%)
		Butanol	ABE	Butanol	ABE	Total Sugars	
<b>Xylose</b>							
CA	4.16	0.06	0.1	0.03	0.06	0.37	38.34
CB	3.10	0.02	0.06	0.01	0.04	0.28	56.41
CS	8.07	0.24	0.28	0.18	0.27	0.7	0.00
★ CL	4.73	0.25	0.35	0.17	0.25	0.52	0.00
<b>Glucose</b>							
CA	4.07	0.04	0.07	0.02	0.05	0.39	40.68
CB	3.30	0.05	0.11	0.02	0.06	0.29	48.29
CS	8.58	0.22	0.29	0.17	0.26	0.74	0.00
CL	6.95	0.31	0.42	0.23	0.32	0.54	0.00

<sup>a)</sup> CA: *C. acetobutylicum* DSM 6228; CB: *C. beijerinckii* DSM 6422; CS: *C. saccharobutylicum* DSM 13864 and CL: *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923.

<sup>(b)</sup> Maximum optical density achieved throughout the fermentation time.

<sup>(c)</sup> The yield was determined in grams of butanol produced per grams of sugar consumed.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)



Co-fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate and molasses by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*: Effect on sugar consumption and butanol production

Ana Maria Zetty-Arenas<sup>a,b,c,d</sup>, Laura Plazas Tovar<sup>e</sup>, Rafael Ferraz Alves<sup>b,f</sup>,  
Adriano Pinto Mariano<sup>c</sup>, Walter van Gulik<sup>a</sup>, Rubens Maciel Filho<sup>c</sup>, Sindelia Freitas<sup>c,g,\*</sup>

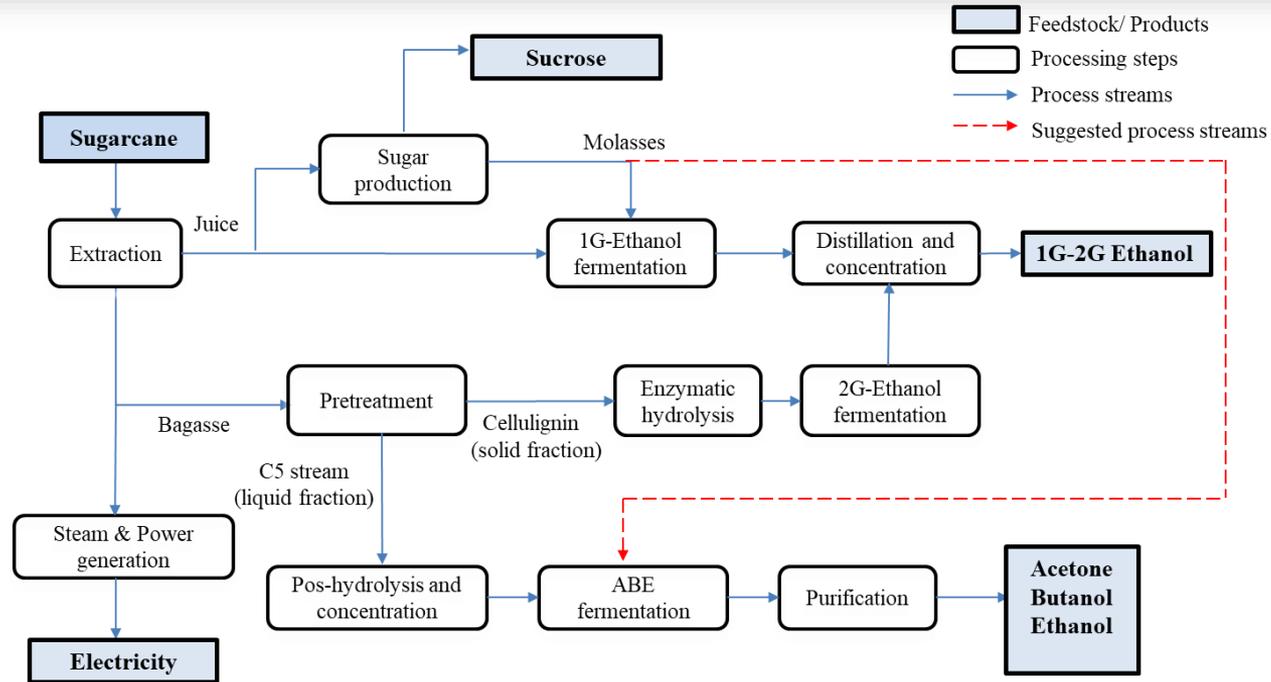
# Fase 3

C5  
C6

Estrategia de **co-fermentación de melaza e hidrolizado hemicelulósico** de caña de azúcar para la producción de **butanol de segunda generación** en una economía circular

# Co-fermentación de azúcares C5 / C6

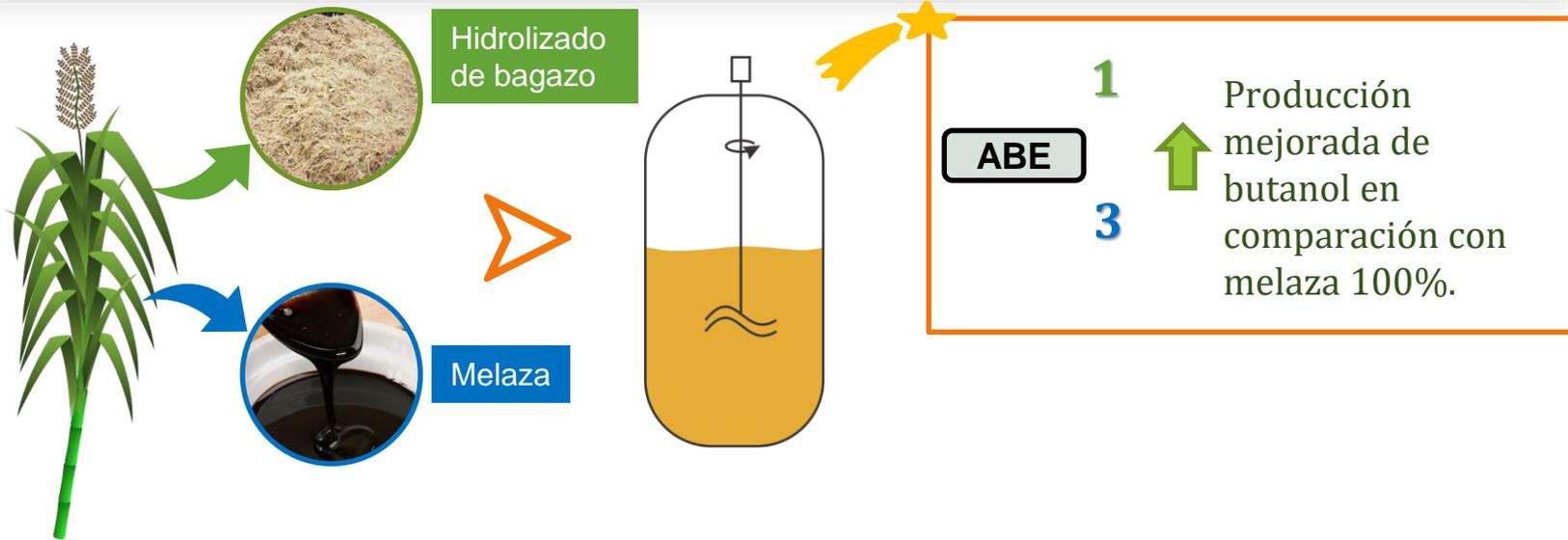
C5  
C6



**Figura 1.** Biorrefinería de caña de azúcar: producción de sacarosa, electricidad, etanol 1G-2G y acetona-butanol-etanol (ABE).

# Co-fermentación de azúcares C5 / C6

C5  
C6



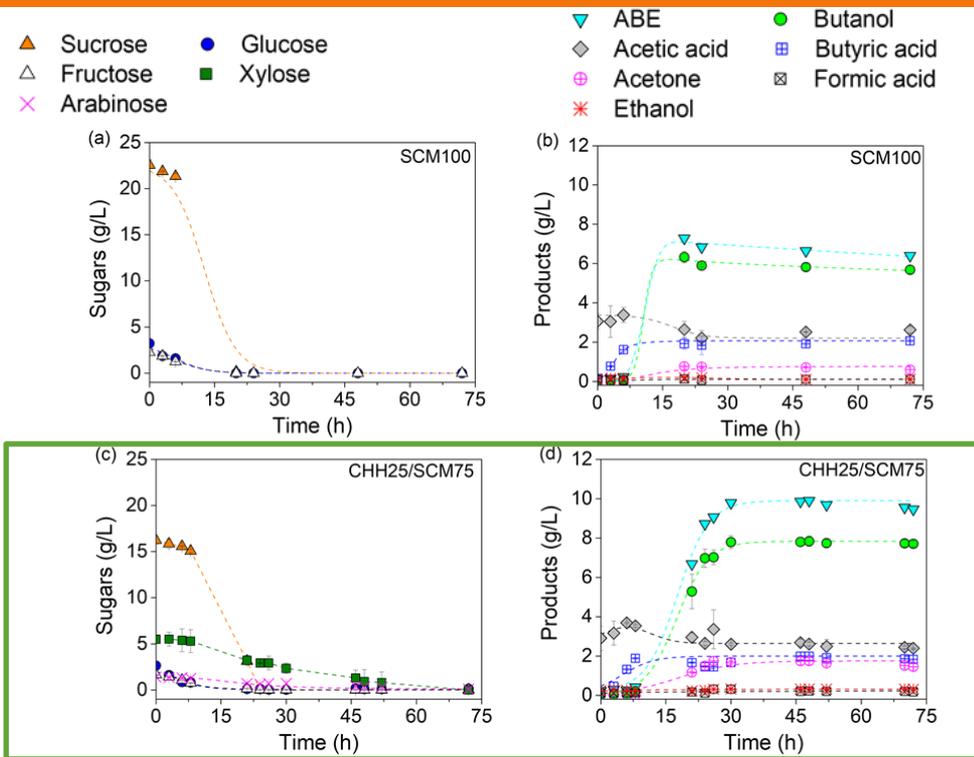
Preferencia de consumo



*Glucosa > fructosa > sacarosa > xilosa > arabinosa*

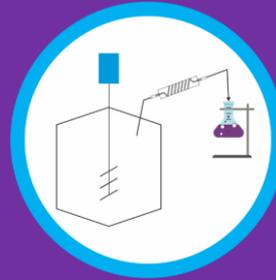
# Co-fermentación de azúcares C5 / C6

C5  
C6



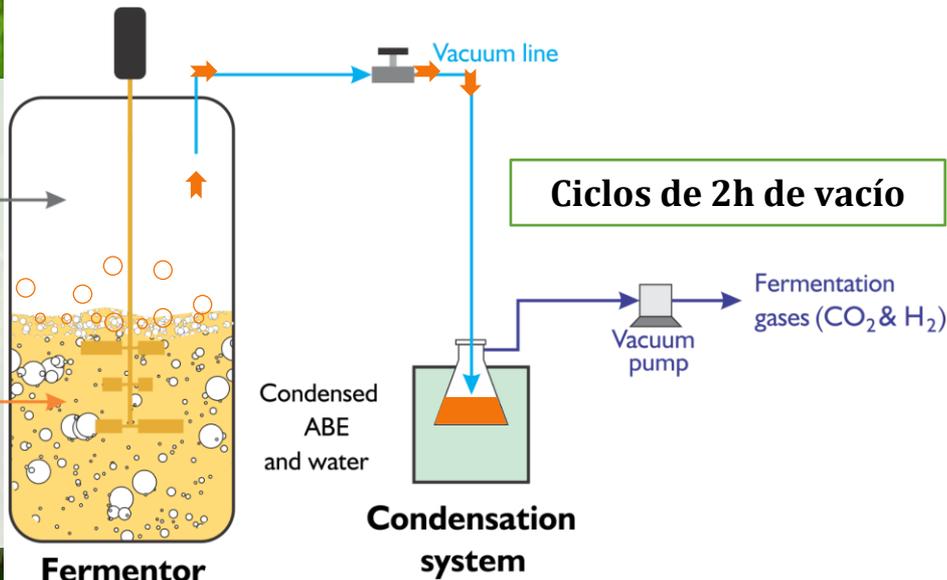
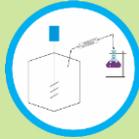
**Figura 3.** Perfiles de consumo total de azúcar (lado izquierdo) y ácidos orgánicos y productos ABE (lado derecho) de *C. saccharoperbutylacetonicum* para cada medio de cultivo durante 72 h de fermentación ABE en batelada.

## Fase 4



**Evaporación al vacío** para la **recuperación del producto *in-situ*** durante la fermentación de ABE por *C. saccharoperbutylacetonicum* utilizando subproductos de la caña de azúcar **aumentó la productividad de ABE**

# Recuperación de producto in-situ



➤➤➤ Agotamiento casi completo de azúcares

↑ Crecimiento celular, productividad de ABE y rendimiento de ABE

↓ Tiempo de fermentación

## Fase 5



*C. saccharoperbutylacetonicum* reveló formación de **biofilms**: caracterización de las sustancias poliméricas extracelulares (**EPS**) y **proteómica** cuantitativa de células sésiles y planctónicas

# Biofilms

## **Ventajas de los reactores basados en biofilms en comparación con las células planctónicas:**

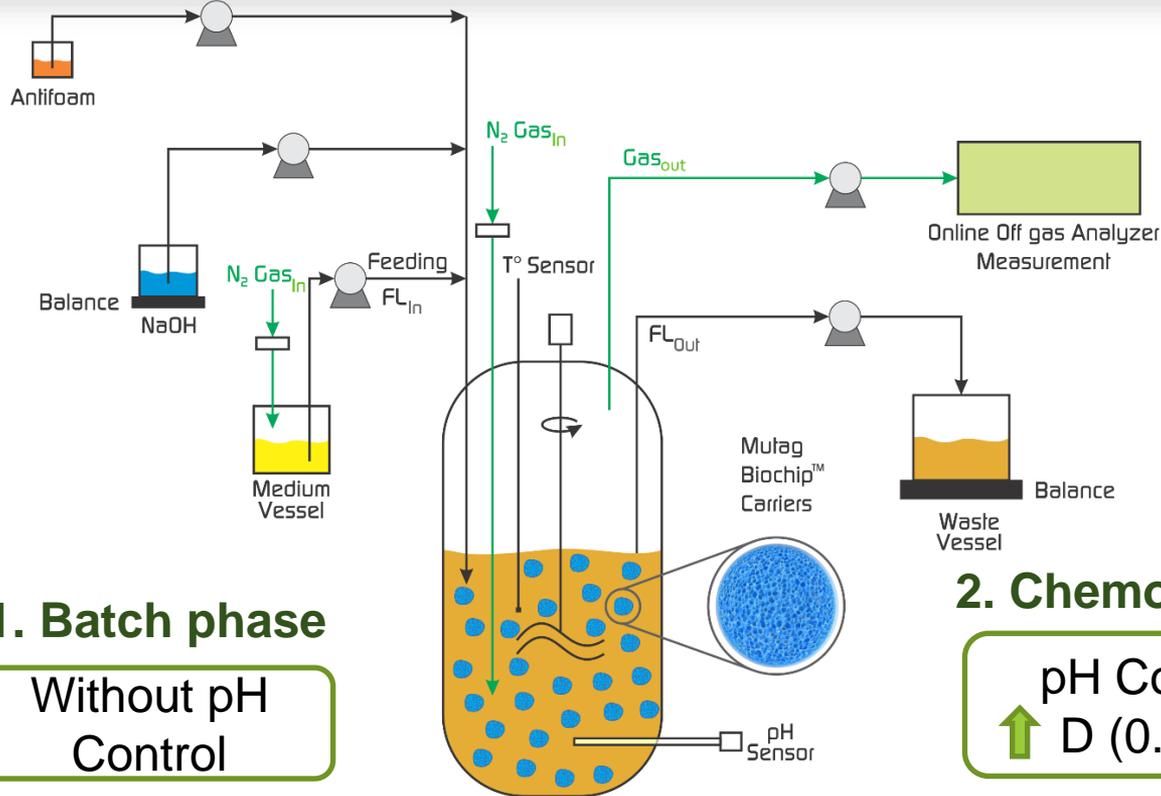
- Mayor densidad celular
- Mayor productividad
- Estabilidad celular
- Flexibilidad en el diseño del reactor para un funcionamiento continuo a más largo plazo
- Procesamiento posterior más fácil y de menor costo

## **Sustancias poliméricas extracelulares (del inglés EPS)**

- ✓ Estabilidad mecánica
- ✓ Protección celular frente a fagos y bactericidas
- ✓ Retención de enzimas
- ✓ Tolerancia y/o resistencia a antibióticos



# Setup del quimiostato



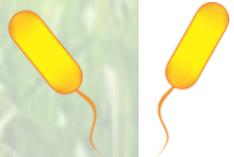
## 1. Batch phase

Without pH  
Control

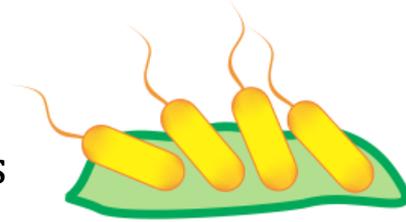
## 2. Chemostat cultivation

pH Control at 6.5  
↑ D (0.1 - 0.4 h<sup>-1</sup>)

# Cambios en la morfología celular



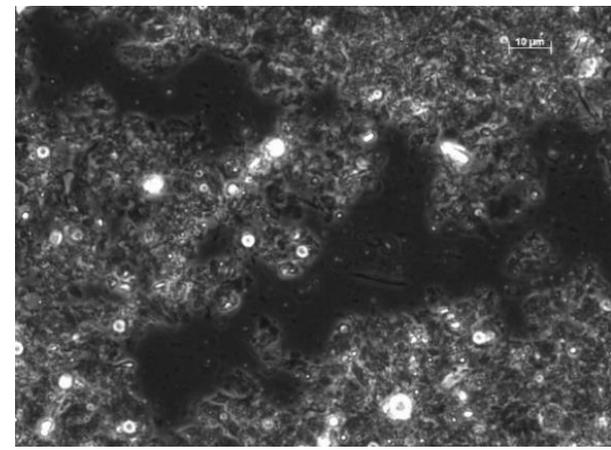
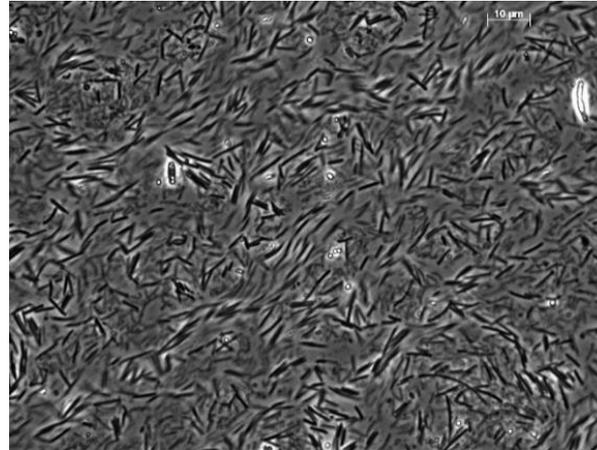
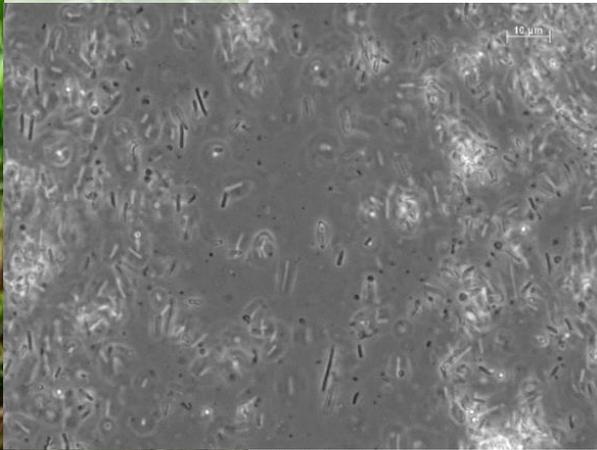
Células  
planctónicas



Agregados



Biofilm



# Caracterización del biofilme



- **41** Función metabólica
- **19** Procesamiento de información genética
- **29** Transporte de membrana
- **24** Procesamiento y motilidad de la información ambiental
- **4** relacionados con fagos
- **3** Membrana /estructura
- **1** Resistencia a los antibióticos (proteína de dominio  $\beta$ -lactamasa)
- **40** no asignadas a ninguna función

**Reprogramación del metabolismo**  
**164 proteínas enriquecidas en el biofilm**  
en comparación con las células planctónicas

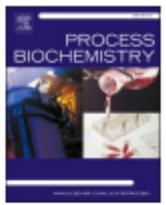


ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Process Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/procbio](https://www.elsevier.com/locate/procbio)



Enhancing acetic acid and 5-hydroxymethyl furfural tolerance of *C. saccharoperbutylacetonicum* through adaptive laboratory evolution

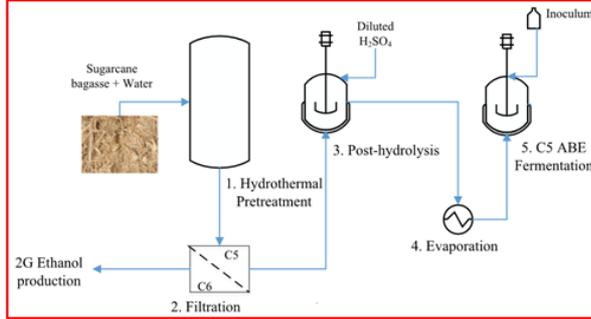
Rafael F. Alves<sup>a,b,c</sup>, Ana M. Zetty-Arenas<sup>b,c</sup>, Huseyin Demirci<sup>d,e</sup>, Oscar Dias<sup>e</sup>, Isabel Rocha<sup>f</sup>,  
Thiago O. Basso<sup>g</sup>, Sindelia Freitas<sup>b,h,\*</sup>

## Fase 6

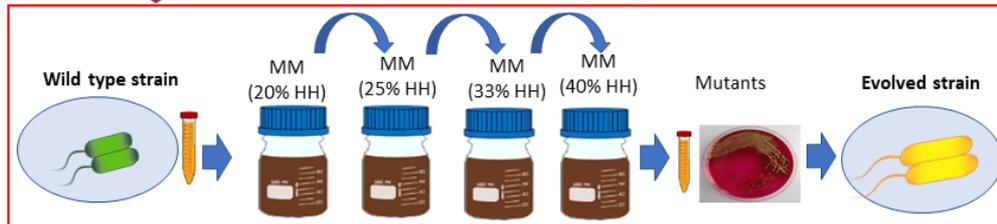
**Mejora de la tolerancia al ácido acético y al 5-HMF de *C. saccharoperbutylacetonicum* a través de la evolución adaptativa en laboratorio (ALE).**

# Mejora de la tolerancia de la cepa al ácido acético y al 5-HMF

## 1. Production of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (HH)



## 2. Adaptive laboratory evolution (ALE)



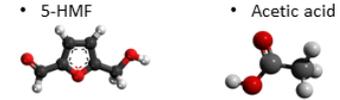
## 3. Evolved strains characterization

### Physiological analysis



- OD<sub>600nm</sub>
- Sugar consumption
- Titer
- Yield
- Productivity

### Inhibitor tolerance



### Morphology analysis



Scanning electron microscopy (SEM)

### Genome sequencing

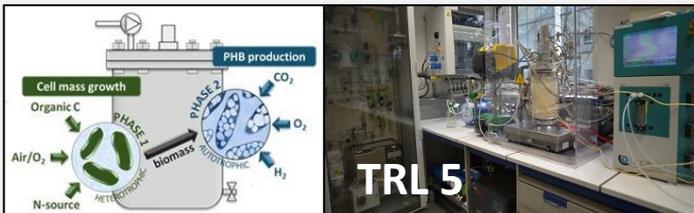


Mediante ALE se obtuvieron con éxito **cepas robustas** capaces de soportar una **alta concentración de ácido acético y HMF**, produciendo 22,1 g/L de ABE

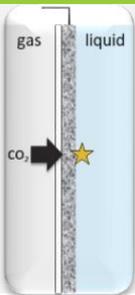
# CAPTURA Y UTILIZACIÓN DE CARBONO @ VITO

# PLATAFORMAS TECNOLÓGICAS DE CONVERSIÓN DE CO<sub>2</sub>

## Fermentación de gases

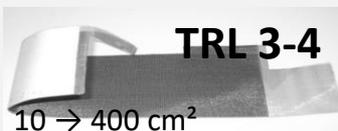


## Electrodos de difusión de gases (3 fases de contacto)



1. Handle mass diffusion limitation
2. Highly porous: handle reaction limitation
3. **VITO electrodes** ↔ competitors
  - water permeability to 1000 x lower
  - average pore size 10 x smaller
  - superior mechanical robustness

## VITOCORE® & VITOCaSe®



## Captura de CO<sub>2</sub> TRL 3 - 4

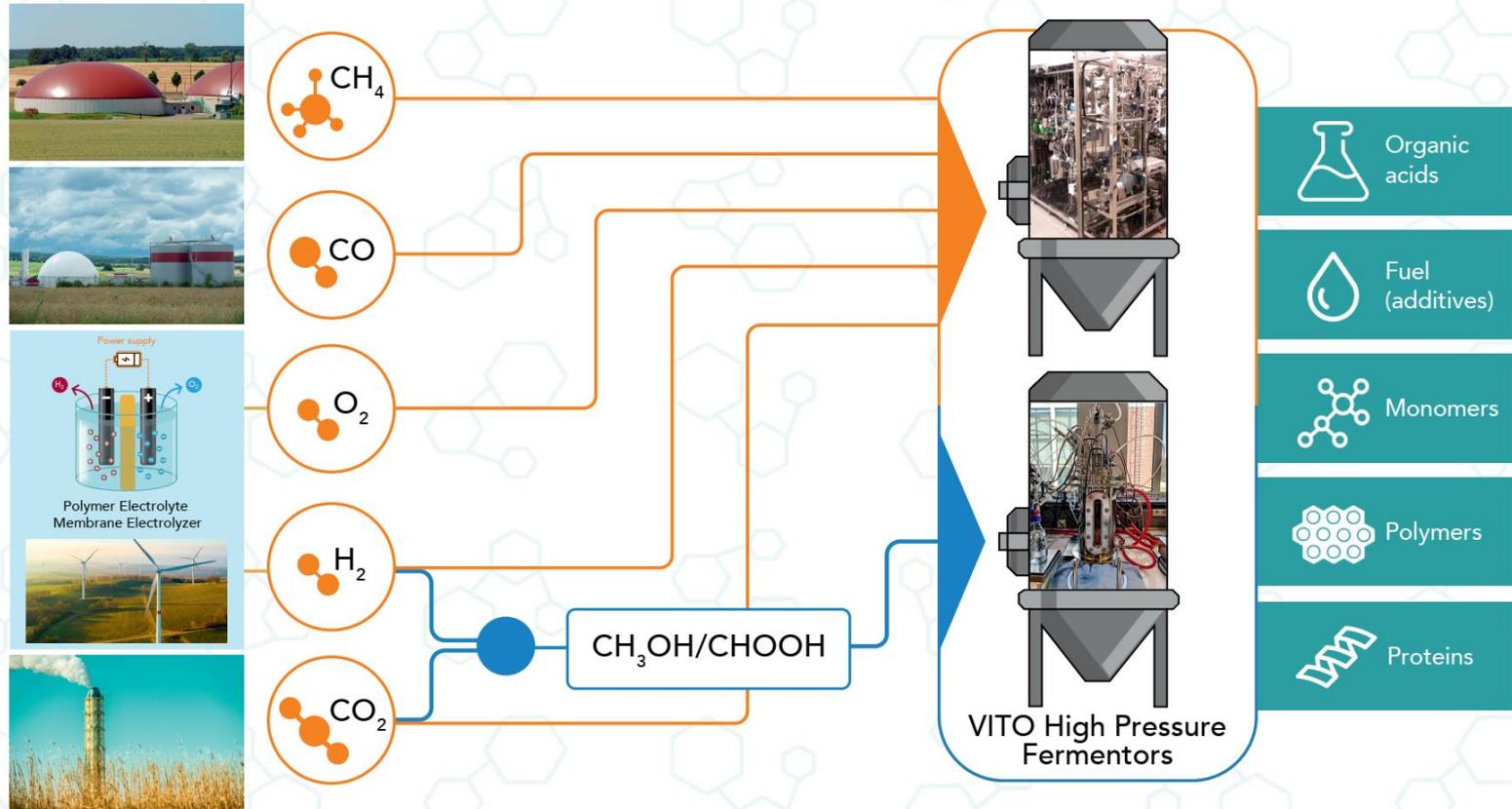


Evaluación tecnoeconómica y del ciclo de vida

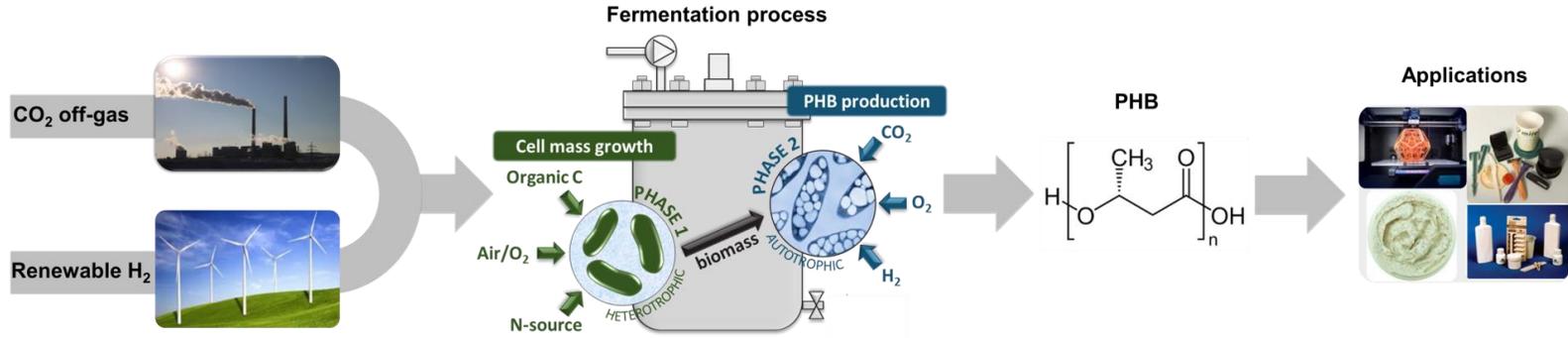
The background image shows a modern cityscape with several high-rise apartment buildings. In the foreground, there is a lush green park area with a winding river or stream. The sky is a clear, bright blue with some light clouds. The overall scene is bright and sunny, suggesting a clear day.

# BIOTECNOLOGÍA PARA LA CONVERSIÓN DE CO<sub>2</sub> @ VITO

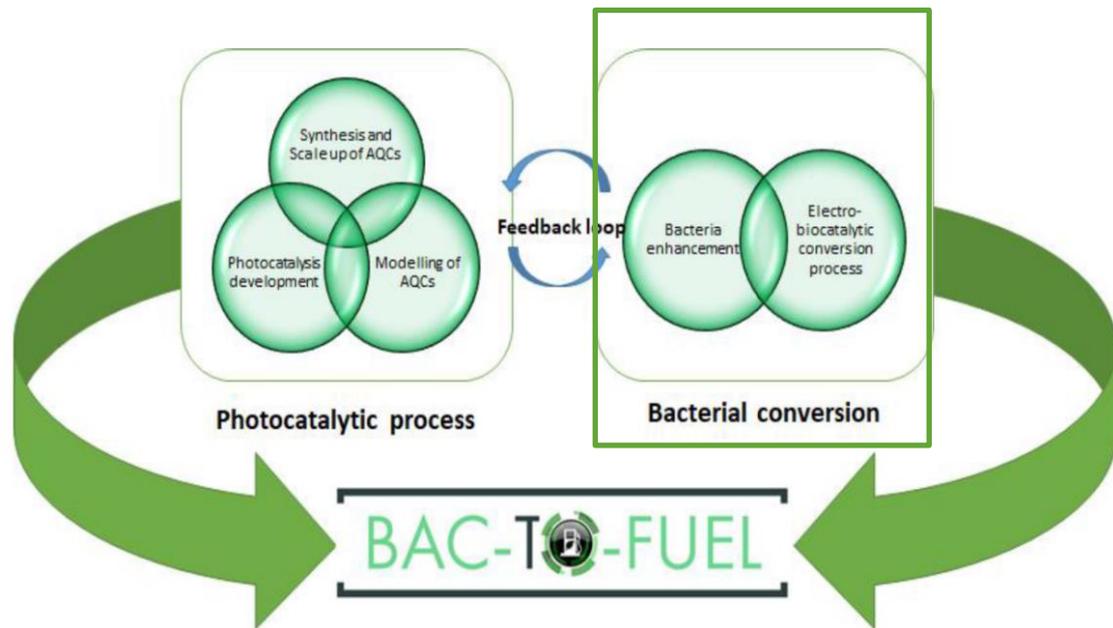
# Conceptos híbridos para la conversión de CO<sub>2</sub>: intermediarios C1 solubles



# CO<sub>2</sub> a biopolímeros mediante proceso de fermentación



- Proceso heterótrofo-autótrofo de dos fases
- Producción de PHA como materia prima: gases puros y gases de escape ricos en CO<sub>2</sub> real
- Trabajo experimental apoyado por trabajo de modelado
- Producción de homopolímero PHB y copolímero PHBV



BAC-TO-FUEL validará un sistema prototipo en TRL 5 que es capaz de transformar  $\text{CO}_2/\text{H}_2$  en **biocombustibles** para el sector del transporte.

# Comentarios finales

Decarbonising the economy means...

Creating economic, social and environmental prosperity.

By 2050, global welfare can improve by 17%.



Global Energy Transformation: A Roadmap to 2050  IRENA  
International Renewable Energy Agency

- La sociedad puede ser más dependiente de la luz solar que del petróleo....
- Colombia tiene un potencial enorme para desarrollar biorrefinerías robustas basadas en su biodiversidad privilegiada.
- Debe promoverse una alianza más fuerte entre universidad - empresa – estado para avanzar más rápido hacia la transición energética.

**Bioeconomía: tengamos la audacia de construir un futuro colectivo, sostenible, circular y responsable!!!**



# Agradecimientos



**Bi-ON2022**

Congreso Nacional  
de Energía Inteligente

**Ana Maria Zetty Arenas, PhD.**  
Investigadora Postdoctoral en Ingeniería de Bioprocesos  
Instituto Flamenco de Investigaciones Tecnológicas (VITO), Bélgica  
<https://www.linkedin.com/in/anazetty-bioprocess-scientist/>  
[anamaria.zettyarenas@vito.be](mailto:anamaria.zettyarenas@vito.be)  
[anamaz325@gmail.com](mailto:anamaz325@gmail.com)