



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

Mejoras tecnológicas del proceso de aprovechamiento de poda de olivo mediante hidrólisis y fermentación

Autor: Silvia Peinado Serrano

Directores de la tesis: Alberto J. Moya López
M^aSoledad Mateo Quero

Fecha: 04/03/2024

ISBN:
Licencia CC

RUJA

Memoria presentada para la obtención del
TÍTULO DE DOCTORA



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Febrero 2024



Universidad de Jaén

Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales

TESIS DOCTORAL

Mejoras tecnológicas del proceso de aprovechamiento de poda de olivo mediante hidrólisis y fermentación

Silvia Peinado Serrano

Aspirante al Grado de Doctora

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ACEITES DE OLIVA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: SUBPRODUCTOS Y RESIDUOS; GESTIÓN
MEDIOAMBIENTAL

DIRECTORES DE LA MEMORIA

Alberto J. Moya López

M^a Soledad Mateo Quero

TUTOR

Sebastián Sánchez Villasclaras

ALBERTO J. MOYA LÓPEZ y M^a SOLEDAD MATEO QUERO, profesores titulares, y SEBASTIÁN SÁNCHEZ VILLASCLARAS, catedrático de la Universidad de Jaén, dentro del Área de Ingeniería Química, como directores y tutor de la presente tesis doctoral, respectivamente,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación “Mejoras Tecnológicas del proceso de aprovechamiento de poda de olivo mediante hidrólisis y fermentación” ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén y en el Grupo de Investigación ‘Bioprocesos (TEP 138, Junta de Andalucía)’, bajo la dirección de los Doctores, D. Alberto J. Moya López y Dña. M^a Soledad Mateo Quero por Dña. Silvia Peinado Serrano para aspirar al Grado de Doctora por la Universidad de Jaén.

Jaén, Febrero de 2024

Alberto J. Moya López

M^a Soledad Mateo Quero

Sebastián Sánchez Villasclaras

Mi sincero agradecimiento a mis directores Alberto J. Moya López y M^a Soledad Mateo Quero y a mi tutor, Sebastián Sánchez Villasclaras, por aportar sus conocimientos y apoyarme en todo momento.

A mi familia, porque sin ellos no sería quien soy

A vosotros Juanfra, Carolina y María.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. RESUMEN	29
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN	35
2.1 Contexto energético y medioambiental. Problemática actual.....	37
2.2. Biocombustibles como alternativa	41
2.2.1. Tipos y clasificación	41
2.2.2. Bioetanol	44
2.3. Biomasa	47
2.3.1. Concepto de biomasa.....	47
2.3.2. Material lignocelulósico	48
2.3.2.1. Celulosa.....	50
2.3.2.2. Hemicelulosa.....	51
2.3.2.3. Lignina.....	52
2.4. El olivar como fuente de biomasa lignocelulósica.....	55
2.4.1. Localización, extensión y características	55
2.4.2. La poda de olivo	57
2.5. Fraccionamiento, conversión y aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica	61
2.6. Pretratamiento de la biomasa	63
2.6.1. Pretratamientos Físicos	64
2.6.2. Pretratamientos químicos.....	66
2.6.2.1. Hidrólisis alcalina	69
2.6.2.2. Deslignificación oxidativa	70
2.6.3. Pretratamientos Físico-Químicos	71
2.6.4. Pretratamientos Biológicos	73

2.7. Hidrólisis	75
2.7.1. El proceso hidrolítico. Tipos de hidrólisis	75
2.7.1.1. Hidrólisis ácida	76
2.7.1.2. Hidrólisis enzimática	77
2.7.2. Variables de operación en los procesos de hidrólisis ácida.....	78
2.7.3. Hidrolizado, fuente de azúcares e inhibidores	81
2.7.4. Detoxificación de hidrolizados.....	83
2.7.4.1. Detoxificación mediante agentes reductores	86
2.8. Fermentación	87
2.8.1. Consideraciones generales	87
2.8.2. Factores condicionantes del proceso fermentativo.....	88
2.8.2.1. Tipo y concentración del microorganismo.....	88
2.8.2.2. Composición del sustrato: carbono, nitrógeno y compuestos inhibidores	89
2.8.2.3. Condiciones de operación: pH, temperatura y aeración	92
2.8.3. Microorganismos productores	94
2.8.3.1. <i>Pichia stipitis</i>	97
2.8.3.2. <i>Pachysolen tannophilus</i>	98
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	99
CAPÍTULO 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	103
4.1. Reactivos.....	105
4.2. Instrumentos y Equipos	107
4.2.1. Molino y tamizadora.....	108
4.2.2. Reactor a presión.....	109
4.2.3. Agitador orbital.....	110
4.2.4. Baño termostatzado y placa agitadora	111
4.2.5. pH-metro	111
4.2.6. Estufa de secado.....	112
4.2.7. Autoclave	112
4.2.8. Horno de mufla.....	113

4.2.9. Montaje de extracción Soxhlet	113
4.2.10. Microscopio electrónico de barrido de alta resolución	114
4.2.11. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	115
4.2.12. Cabina de flujo laminar	116
4.2.13. Espectrofotómetro	118
4.3. Microorganismos empleados.....	119
4.4. Procedimiento de trabajo	121
4.4.1. Planteamiento General	121
4.4.2. Recogida, molienda y tamizado de la biomasa	124
4.4.3. Hidrólisis con ácido oxálico	126
4.4.4. Líneas de tratamientos químicos propuestas en el estudio experimental ..	128
4.4.4.1. Línea 1: Pretratamiento con hidróxido de sodio	128
4.4.4.2. Línea 2: Pretratamiento con peróxido de hidrógeno.....	130
4.4.4.3. Línea 3: Tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio ..	133
4.4.5. Acondicionamiento del hidrolizado.....	135
4.4.6. Fermentación	136
4.5. Métodos de análisis.....	141
4.5.1. Caracterización de sólidos.....	141
4.5.1.1. Humedad y materia volátil	141
4.5.1.2. Determinación de polímeros fundamentales. Celulosa, hemicelulosa y lignina	142
4.5.1.3. Cenizas	144
4.5.1.4. Extractos acuosos y etanólicos	145
4.5.1.5. Estructura interna de la biomasa.....	147
4.5.2. Caracterización de corrientes líquidas procedentes de procesos hidrolíticos y fermentativos.....	148
4.5.2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución	148
4.5.2.2. Determinación de furanos y compuestos fenólicos totales	150
4.5.3. Evaluación del crecimiento celular.....	154

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	157
5.1. Caracterización de la biomasa de poda de olivo de partida.....	159
5.2. Hidrólisis ácida de la biomasa de poda de olivo de partida	165
5.2.1. Fermentación de hidrolizados ácidos de la materia prima.....	176
5.3. Tratamientos químicos específicos empleados.....	183
5.3.1. Pretratamiento con hidróxido de sodio: hidrólisis y fermentación.....	183
5.3.1.1. Hidrólisis ácida sobre biomasa pretratada con hidróxido de sodio ..	188
5.3.1.2. Fermentación de hidrolizados ácidos de sólidos pretratados con hidróxido de sodio	200
5.3.2. Pretratamiento con peróxido de hidrógeno: hidrólisis ácida y fermentación	208
5.3.2.1. Hidrólisis ácida de material pretratado con peróxido de hidrógeno	215
5.3.2.2. Fermentación de hidrolizados ácidos de sólidos pretratados con peróxido de hidrógeno	216
5.3.3. Tratamiento de detoxificación de hidrolizados ácidos con borohidruro de sodio	222
5.3.3.1. Fermentación de hidrolizados detoxificados con NaBH ₄	231
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	237
NOMENCLATURA	245
BIBLIOGRAFÍA	253
APÉNDICES (formato digital)	283
Apéndice A. Datos experimentales de hidrólisis	
Apéndice B. Datos experimentales de fermentación	
Apéndice C. Producción científica	

Artículo: "Improving bioethanol production from olive pruning biomass by deacetylation step prior acid hydrolysis and fermentation processes"

Artículo: "Effectiveness of sodium borohydride treatment on acid hydrolyzates from Olive-Tree pruning biomass for bioethanol production"

Artículo: "Nanocellulose from agricultural wastes: products and applications—A Review"

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2. Introducción

Tabla 2.1.	Principales biocombustibles y sus usos. Fuente: Agencia Andaluza de la Energía (2020) [5].....	42
Tabla 2.2.	Composición en base seca de la biomasa lignocelulósica (%).....	53
Tabla 2.3.	Composición en porcentaje del residuo de poda de olivo. Fuente: Sánchez <i>et al.</i> (2002) [169].....	59
Tabla 2.4.	Clasificación general de pretratamientos y tratamientos realizados sobre biomasa lignocelulósica, Fuente: Mateo (2011) [121].....	62
Tabla 2.5.	Pretratamientos físicos sobre diferentes tipos de biomasa.....	65
Tabla 2.6.	Pretratamientos químicos aplicados a diferentes tipos de biomasa.....	68
Tabla 2.7.	Pretratamientos físico-químicos sobre diferentes tipos de biomasa.....	72
Tabla 2.8.	Estudios de variables de operación en la hidrólisis ácida sobre poda de olivo	80
Tabla 2.9.	Métodos biológicos de detoxificación de hidrolizados.....	84
Tabla 2.10.	Métodos físicos de detoxificación de hidrolizados.....	84
Tabla 2.11.	Métodos químicos de detoxificación de hidrolizados.....	85
Tabla 2.12.	Principales hongos y levaduras de interés industrial en procesos de fermentación.....	94

Capítulo 4. Desarrollo experimental

Tabla 4.1.	Diseño de experimentos para el tratamiento con ácido oxálico.....	126
Tabla 4.2.	Diseño de experimentos para el pretratamiento con hidróxido de sodio.....	129
Tabla 4.3.	Diseño de experimentos para el pretratamiento con peróxido de hidrógeno	131
Tabla 4.4.	Diseño de experimentos para el tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio.....	133
Tabla 4.5.	Composición del medio de cultivo sólido.....	136
Tabla 4.6.	Composición del medio de cultivo líquido.....	138
Tabla 4.7.	Tiempos de retención de azúcares analizados.....	148
Tabla 4.8.	Concentración-absorbancia (ABS ₇₆₀) para la curva patrón de ácido cafeico	152
Tabla 4.9.	Relación entre absorbancia de la suspensión celular a 620 nm y peso seco para <i>Pichia stipitis</i>	155

Capítulo 5. Resultados y discusión

Tabla 5.1.	Caracterización de la biomasa de poda de olivo de partida.....	159
Tabla 5.2.	Cenizas totales de la biomasa de poda de olivo de partida.....	161
Tabla 5.3.	Extractos acuosos y etanólicos de la biomasa de poda de olivo de partida	161

Tabla 5.4.	Compuestos fenólicos en poda de olivo de variedad 'Picual', Salido <i>et al.</i> (2015) [165].....	162
Tabla 5.5.	Valores del parámetro “w” para diferentes materiales lignocelulósicos.....	166
Tabla 5.6.	Caracterización de hidrolizados en contenido en azúcares simples (g/dm ³)	170
Tabla 5.7.	Valor de CSF e inhibidores de los hidrolizados del diseño experimental.....	171
Tabla 5.8.	Caracterización de los sólidos resultantes de la hidrólisis con ácido oxálico de la biomasa de poda de olivo de partida.....	174
Tabla 5.9.	Evolución temporal de la concentración (g/dm ³) de biomasa, azúcares, inhibidores y bioetanol durante la fermentación del hidrolizado del ensayo OXA-4.....	177
Tabla 5.10.	Evolución temporal de la concentración (g/dm ³) de biomasa, azúcares, inhibidores y bioetanol para la fermentación del hidrolizado del ensayo OXA-5.....	179
Tabla 5.11.	Parámetros de fermentación en hidrolizados de biomasa de poda de olivo de partida.....	181
Tabla 5.12.	Concentración de ácido acético en la fase líquida tras realizar el pretratamiento con NaOH.....	184
Tabla 5.13.	Concentración de azúcares en la fase líquida tras realizar los ensayos del diseño experimental para el pretratamiento con NaOH.....	184
Tabla 5.14.	Análisis de la Varianza (ANOVA) del modelo ajustado para la concentración de ácido acético.....	186
Tabla 5.15.	Composición en % en peso de la biomasa de poda de olivo de partida (BPO partida) y de los sólidos obtenidos tras el pretratamiento con NaOH.....	187
Tabla 5.16.	Variables de operación y composición para los hidrolizados ácidos obtenidos a partir de materia prima pretratada con NaOH en condiciones óptimas (g/dm ³).....	189
Tabla 5.17.	Porcentaje de D-glucosa sobre la D-xilosa generada en cada ensayo del diseño experimental.....	190
Tabla 5.18.	CSF y azúcares totales (g/dm ³) tras la hidrólisis ácida. Comparativa entre biomasa de poda de olivo de partida y biomasa pretratada con hidróxido de sodio.....	191
Tabla 5.19.	Composición en % de los sólidos residuales obtenidos tras la hidrólisis ácida de biomasa pretratada con NaOH en condiciones óptimas.....	194
Tabla 5.20.	Valores fermentativos obtenidos de hidrolizados ácidos obtenidos a partir de biomasa pretratada con NaOH en condiciones optimizadas con las levaduras <i>P. stipitis</i> y <i>P. tannophilus</i>	205
Tabla 5.21.	Composición, en porcentaje, de los sólidos resultantes del pretratamiento con H ₂ O ₂	209

Tabla 5.22.	Valor codificado de las variables de estudio y porcentajes medios de celulosa, hemicelulosa y lignina eliminadas por el pretratamiento con peróxido de hidrógeno para cada ensayo.....	210
Tabla 5.23.	Análisis ANOVA para el modelo estadístico en el pretratamiento con H ₂ O ₂	213
Tabla 5.24.	Porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina eliminados mediante el pretratamiento con H ₂ O ₂ en 4 réplicas de las condiciones óptimas.....	214
Tabla 5.25.	Valores de parámetros de severidad y composición de los hidrolizados ácidos obtenidos con materia prima pretratada con H ₂ O ₂ en condiciones óptimas.....	215
Tabla 5.26.	Valores medios de concentración de biomasa, azúcares y bioproductos (g/dm ³) a diferentes tiempos en el ensayo fermentativo HPER-a.....	217
Tabla 5.27.	Valores medios de concentración de biomasa, azúcares y bioproductos (g/dm ³) a diferentes tiempos en el ensayo fermentativo HPER-b.....	218
Tabla 5.28.	Parámetros fermentativos correspondientes al experimento con <i>Pichia stipitis</i> CBS 6054 a partir del hidrolizado HPER-a.....	220
Tabla 5.29.	Parámetros fermentativos correspondientes al experimento con <i>Pichia stipitis</i> CBS 6054 a partir del hidrolizado HPER-b.....	221
Tabla 5.30.	Concentración de furanos en g/dm ³ presentes en los hidrolizados ácidos, sin y con tratamiento de detoxificación con NaBH ₄	224
Tabla 5.31.	Concentración de compuestos fenólicos totales en g/dm ³ presentes en los hidrolizados ácidos, sin y con tratamiento de detoxificación con NaBH ₄	225
Tabla 5.32.	Diseño de experimentos 2 ³ central compuesto y reducción de furanos y compuestos fenólicos totales para el tratamiento de detoxificación con NaBH ₄	226
Tabla 5.33.	Análisis de varianza ANOVA para el diseño de experimentos del tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio.....	227
Tabla 5.34.	Confirmación del modelo en condiciones óptimas de eliminación de furanos y compuestos fenólicos totales tras el tratamiento con NaBH ₄ . Comparativa teórico-empírica	231
Tabla 5.35.	Parámetros fermentativos obtenidos en los hidrolizados ácidos obtenidos en condiciones más favorables y tratados posteriormente con NaBH ₄ en condiciones optimizadas	234

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2. Introducción

Fig. 2.1.	Porcentaje de consumo de energías renovables por países de la Unión Europea en 2020, Fuente: Eurostat [137].....	38
Fig. 2.2.	Demanda de bioetanol en billones de litros al año a nivel mundial, Fuente: Agencia Internacional de la Energía [7]	46
Fig. 2.3.	Composición general en porcentaje de la biomasa lignocelulósica	48
Fig. 2.4.	División de los componentes principales de la biomasa lignocelulósica	49
Fig. 2.5.	Estructura de una microfibrilla constituyente de la pared celular. Fuente: Buchanan <i>et al.</i> (2015) [33]	51
Fig. 2.6.	Estructura de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Horvat (2016) [79]	52
Fig. 2.7.	Superficie destinada al olivar en las provincias andaluzas (ha). Fuente: Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo rural de la Junta de Andalucía (2023) [50]	56
Fig. 2.8.	Concentración de poda de olivo en la parte central de las hileras del cultivo. Fuente: Sociedad Cooperativa Andaluza San Vicente de Mogón (Jaén) [182]	58
Fig. 2.9.	Principales inhibidores generados a partir de la degradación de biomasa lignocelulósica ,.....	91

Capítulo 4. Desarrollo experimental

Fig. 4.1.	a) Molino de cuchillas, b) Tamizadora.....	108
Fig. 4.2.	Reactor a presión. a) Vista general del montaje, b) Cuerpo del reactor.....	109
Fig. 4.3.	Agitador orbital. a) vista externa con la cámara de incubación. b) Detalle del interior.....	110
Fig. 4.4.	a) Baño termostatzado con placa agitadora, b) Módulo de control de agitación.....	111
Fig. 4.5.	pH-metro portátil.....	111
Fig. 4.6.	Estufa de secado Memmert.....	112
Fig. 4.7.	Autoclave vertical Raypa.....	112
Fig. 4.8.	Montaje Soxhlet para eliminación de extractos.....	113
Fig. 4.9.	Microscopio electrónico de barrido de alta resolución.....	114
Fig. 4.10.	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	116
Fig. 4.11.	Cabina vertical de flujo laminar.....	117
Fig. 4.12.	Espectrofotómetro.....	118
Fig. 4.13.	Esquema general del desarrollo experimental.....	123
Fig. 4.14.	Medio de cultivo sólido.....	137
Fig. 4.15.	Muestras con metalizado de oro para microscopio electrónico de barrido	147
Fig. 4.16.	Cromatograma y tabla asociada de concentraciones, HPLC	150
Fig. 4.17.	Curva patrón de ácido cafeico- compuestos fenólicos totales	152
Fig. 4.18.	Concentración de biomasa en peso seco frente a absorbancia a 620 nm, para <i>P. stipitis</i>	156

Capítulo 5. Resultados y discusión

Fig. 5.1	A) Biomasa de poda de olivo en polvo; B) biomasa de poda de olivo de partida (0,425-0,600 mm); C) superficie de la viruta de poda de olivo de partida; D) compactación de la estructura interna.....	163
Fig. 5.2.	Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-1. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada.....	169
Fig. 5.3.	Representación de la concentración de azúcares frente al factor de severidad combinado (CSF).....	172
Fig. 5.4.	Representación de la concentración de inhibidores frente al valor de CSF	172
Fig. 5.5.	Ensayo fermentativo del hidrolizado derivado del tratamiento OXA-4, (CSF=1,51) obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida.....	178
Fig. 5.6.	Ensayo fermentativo del hidrolizado derivado del tratamiento OXA-5, (CSF=1,56) obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida.....	179
Fig. 5.7.	Superficie de respuesta obtenida para la eliminación de ácido acético tras el pretratamiento con hidróxido de sodio.....	185
Fig. 5.8.	Azúcares fermentables frente a CSF en hidrolizados de biomasa pretratada con hidróxido de sodio en condiciones óptimas.....	192
Fig.5.9.	Inhibidores frente a CSF en hidrolizados de biomasa pretratada con hidróxido de sodio en condiciones óptimas.....	193
Fig.5.10.	Porcentajes eliminados de celulosa, hemicelulosa y lignina referidos a la biomasa de partida frente al CSF.....	196
Fig. 5.11.	Balance de masa del proceso general con pretratamiento alcalino con NaOH más hidrólisis ácida.....	197
Fig. 5.12.	A) Biomasa de poda de olivo de partida; B) materia prima pretratada con hidróxido de sodio en condiciones optimizadas.....	198
Fig. 5.13.	Comparativa entre biomasa de poda de olivo: A) de partida, B) tras el pretratamiento alcalino con NaOH en condiciones óptimas y C) tras pretratamiento con NaOH optimizado + hidrólisis con ácido oxálico.....	199
Fig. 5.14.	Concentración de azúcares, inhibidores y etanol a lo largo del tiempo en los procesos fermentativos llevados a cabo con <i>P. stipitis</i> y <i>P. tannophilus</i> sobre los hidrolizados obtenidos usando biomasa pretratada con NaOH en condiciones optimizadas.....	201
Fig. 5.15.	Representación del ajuste del modelo estadístico, % de eliminación teórico frente a % de eliminación obtenido para: A) Celulosa; B) Hemicelulosa y C) Lignina.....	212

Fig.5.16.	Representación gráfica de la evolución temporal de la concentración de: biomasa, azúcares simples (D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa) y etanol en los ensayos de fermentación de los hidrolizados A) HPER-a y B) HPER-b	219
Fig. 5.17.	Gráficos de contorno para la optimización de la reducción de compuestos fenólicos totales con interacciones AB (tiempo/concentración NaBH_4) y BC (concentración NaBH_4 /pH)	229
Fig. 5.18.	Superficie de respuesta para la optimización de la reducción de furanos en función (Y_3) de las variables concentración de NaBH_4 (B) y pH (C).....	230
Fig. 5.19.	Gráficas procesos fermentativos. a) Hidrolizado de partida sin tratamiento de detoxificación con NaBH_4 , b) BH-OPT1, c) BH-OPT2, c) BH-OPT3 y e) BH-OPT4.....	233

CAPÍTULO 1

RESUMEN



En la presente memoria se recogen los ensayos llevados a cabo a fin de optimizar diferentes procesos centrados en el aprovechamiento bioquímico de la biomasa de poda de olivo, material lignocelulósico muy abundante en la provincia de Jaén, producido como residuo derivado de la actividad agrícola relacionada con el cultivo del olivar.

Enmarcado dentro del Programa de Doctorado en “Aceites de Oliva”, en su línea de subproductos y residuos, el trabajo de investigación ha sido desarrollado dentro de las dependencias del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén.

Actualmente, la producción de bioetanol se encuentra centrada en la fermentación de azúcares simples procedentes de biomasa azucarada, amilácea o lignocelulósica. En esta última, el contenido y la estructura de la lignina y su entrecruzamiento con diferentes polisacáridos suponen la mayor limitación para un aprovechamiento integral de la misma, lo que hace que en procesos en los que se trabaje con biomasa lignocelulósica se requieran pretratamientos optimizados para aumentar el fraccionamiento de los azúcares complejos en azúcares simples y reducir la presencia de inhibidores generados durante los tratamientos hidrolíticos, incrementando con ello el rendimiento de sacarificación con el fin de producir biocombustibles o para conversión en otros productos de interés comercial.

En este estudio se ha realizado inicialmente una etapa de hidrólisis ácida de la biomasa de poda de olivo sin hoja usando un ácido diluido poco común, como es el caso del ácido oxálico. En dicha fase se trabajó con temperaturas entre 130 °C y 170 °C, y concentraciones de ácido entre 50-100 mM, manteniendo constantes el tiempo de tratamiento en 30 minutos y la agitación en 150 rpm. Para esta etapa de hidrólisis se determinó el valor del factor de severidad combinado para el cual la concentración de azúcares en los hidrolizados obtenidos era máxima, minimizándose a su vez los principales inhibidores presentes (CSF = 1,56; Temperatura = 150 °C; concentración de ácido oxálico = 75 mM).

La fermentación llevada a cabo sobre cada uno de los hidrolizados obtenidos del tratamiento de hidrólisis ácida, según las condiciones definidas mediante un diseño experimental, fue realizada con la levadura *Pichia stipitis* CBS 6054. De este proceso fermentativo se observó que, en ensayos con valores de CSF en el rango 0,88-1,51, se obtuvieron rendimientos de etanol entre 0,27 g/g y 0,40 g/g. Para ensayos con rangos de severidad por encima de 1,51 la fermentación presentó dificultades severas, probablemente debido a la concentración de inhibidores presentes.

Tras el análisis de los resultados de esta fase inicial se planteó la necesidad de mejorar los rendimientos en bioproducto obtenidos, proponiéndose para tal fin la realización de algunos tratamientos que facilitaran la asimilación del sustrato por parte de los microorganismos encargados de la etapa fermentativa.

Los tratamientos químicos de mejora propuestos fueron: dos pretratamientos realizados de forma previa a la hidrólisis ácida, uno llevado a cabo con hidróxido de sodio y otro con peróxido de hidrógeno, y un tercer tratamiento, en este caso de detoxificación, realizado de forma posterior al proceso hidrolítico, empleando como agente reductor borohidruro de sodio.

En el pretratamiento con hidróxido de sodio se trabajó con intervalos de tiempo de 8-92 minutos y concentración de compuesto de 0,08-92%, determinándose las condiciones optimizadas (tiempo = 59 minutos y concentración de NaOH = 0,8%) mediante una metodología de superficie de respuesta para conseguir una eliminación total del ácido acético presente en los hidrolizados de poda de olivo sin hoja y una reducción significativa de otros inhibidores. De dicho pretratamiento en condiciones optimizadas se obtuvo una biomasa sólida de composición (en base seca): $42,0 \pm 0,4\%$ de celulosa, $18,6 \pm 0,5\%$ de hemicelulosa y $20,0 \pm 0,2\%$ de lignina, a la cual se le realizó el tratamiento de hidrólisis.

Tras llevar a cabo este pretratamiento alcalino en las condiciones optimizadas anteriormente establecidas, junto con la hidrólisis ácida, también en las mejores condiciones determinadas, se realizaron ensayos de fermentación de los hidrolizados obtenidos del doble tratamiento secuencial empleando dos levaduras diferentes: *Pichia stipitis* CBS 6054 y

Pachysolen tannophilus ATCC 32691, obteniéndose mayores rendimientos en etanol con la primera de ellas (próximos al 90% del valor máximo teórico).

En cuanto al segundo pretratamiento propuesto, el llevado a cabo usando peróxido de hidrógeno, se trabajó con rangos de temperatura entre 50 °C y 90 °C, tiempo entre 60-120 minutos, concentración de H₂O₂ del 2-10% (p/v) y pH entre 8-12. Este tratamiento perseguía una optimización basada en la minimización de los porcentajes de celulosa y hemicelulosa eliminados, para perder la menor cantidad posible de azúcares fermentables, maximizando a su vez la eliminación del contenido en lignina. En este sentido, se definieron unas condiciones óptimas de trabajo de 120 minutos, 50 °C, 10% de peróxido de hidrógeno y pH 12, obteniendo un sólido al que se realizaría la posterior hidrólisis ácida en las condiciones más favorables definidas con anterioridad.

Tras el citado proceso de hidrólisis del material pretratado con peróxido de hidrógeno se obtuvieron hidrolizados con la siguiente composición (g/dm³) de: D-glucosa = 8,01 ± 0,61; D-xilosa = 19,37 ± 0,20; L-arabinosa = 5,90 ± 0,78; ácido acético = 2,82 ± 0,15; y ácido fórmico = 2,71 ± 0,33. De la fermentación de estos hidrolizados con la levadura *Pichia stipitis* CBS 6054, se obtuvieron rendimientos en etanol entre 0,29 g/g y 0,41 g/g.

Finalmente, el último tratamiento químico propuesto, una detoxificación con borohidruro de sodio como agente reductor, se realizó tras la hidrólisis con ácido oxálico en las mejores condiciones. En esta ocasión, el tiempo de tratamiento osciló en el rango 3,2-36,8 minutos, la concentración de NaBH₄ entre 9,6-110,4 mM y el pH entre 3,32-6,68. La optimización del tratamiento de detoxificación se realizó en función de la eliminación de furanos y compuestos fenólicos totales, determinando unas condiciones de tratamiento óptimas de 30-63 mM de NaBH₄, pH entre 5,5-6,0 y tiempo entre 20-30 minutos, lo que llevó a conseguir porcentajes de eliminación del 94-98% y del 37-40%, respectivamente.

Para los hidrolizados detoxificados se obtuvieron rendimientos de etanol de 0,27 g/g, con consumos del 46%, aproximadamente, del sustrato presente en las fermentaciones llevadas a cabo con *Pichia stipitis* CBS 6054.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN



2.1 Contexto energético y medioambiental. Problemática actual

Las fuentes de energía de origen fósil son todavía hoy la principal causa de emisión de gases de efecto invernadero. La sustitución de estos combustibles por energías renovables es uno de los retos más importantes de la sociedad actual, que desde hace más de una década intenta realizar una transición energética para conseguir un modelo de “energía limpia” que nos permita avanzar hacia un desarrollo sostenible desde el punto de vista medioambiental, social y económico.

Según el informe de la Agencia Europea de Medio Ambiente (European Environmental Agency, EEA) de 2017 [6], los países europeos consumen menos energía que hace 10 años, principalmente gracias al aumento de la eficiencia energética. Europa también depende menos de los combustibles fósiles debido al ahorro de energía y la utilización, más rápida de lo previsto, de energías renovables.

En la década de 2005-2015, la proporción de energías renovables en el consumo de energía de la UE (Unión Europea) prácticamente se duplicó, pasando del 9% a cerca del 17%.

Los datos de 2020, ofrecidos por el Departamento de Medioambiente y Energía de la Oficina Europea de Estadística (Eurostat) [137] establecen un 22% de consumo final bruto de estas energías, aunque las diferencias por países son notorias, como se muestra en la Figura 2.1. Sin embargo, a pesar de que su cuota de mercado se está reduciendo, los combustibles fósiles siguen siendo la fuente de energía dominante en Europa.

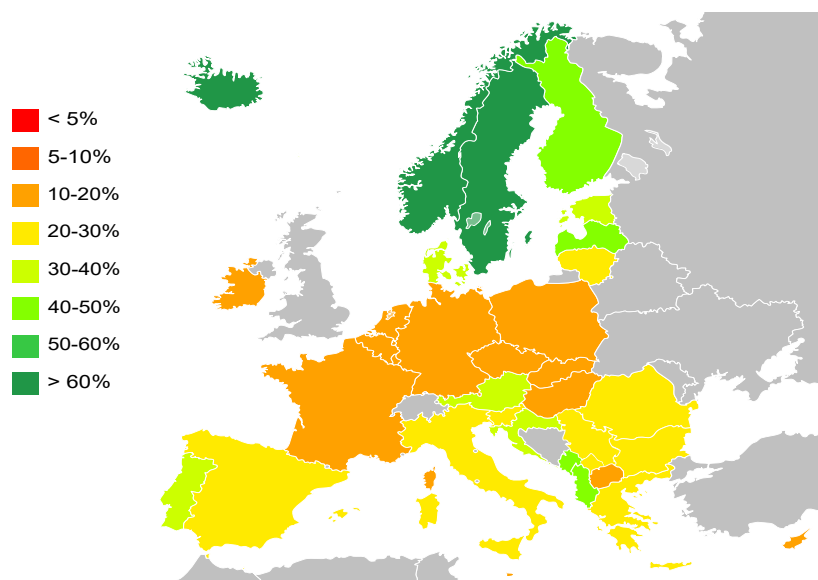


Fig. 2.1. Porcentaje de consumo de energías renovables por países de la Unión Europea en 2020

La Agencia Internacional de la Energía (International Energy Agency, IEA) elabora anualmente un informe que recopila la mayor cantidad de datos por países y consumo, el conocido como “World Energy Outlook” (WEO).

En los dos últimos informes realizados 2020 y 2021, IEA [7] se analizan las consecuencias de la pandemia Covid-19 en la energía, en particular en la transición energética en curso. Utilizando cuatro escenarios como alternativas factibles para describir el futuro de la energía a veinte años vista, todos ellos se centran en la reducción y/o eliminación del uso de combustibles fósiles y de emisiones netas en 2050.

Según estos informes, la demanda mundial de petróleo registró una caída en 2020 del 8%; 3% la del gas y 7% la del carbón. Las emisiones cayeron en consecuencia un 7%. Una de las pocas certezas del mañana energético es que el futuro de la energía será más eléctrico y menos fósil.

Las energías renovables, incluidas la solar, eólica, hidráulica y los biocombustibles, principalmente, están en el centro de la transición hacia un sistema energético menos intensivo en carbono y más sostenible, según el informe WEO (2021) [7].

La dependencia energética del conjunto de países de la Unión Europea es superior al 50%, con una fuerte importación de productos petrolíferos. En el caso de España, la dependencia energética es muy superior a la media, entre 70 y 81% en la década 2005-2014, Oficina de estadística de la Unión Europea (EUROSTAT) (2016) [137]. Por ello, resulta de especial interés potenciar las fuentes de energía renovables.

La bioenergía, definida como la “producción basada en el conocimiento y la utilización de recursos biológicos, procesos biológicos innovadores y principios de sostenibilidad para la obtención de bienes y servicios en todos los sectores económicos”, en la Cumbre Global sobre Bioeconomía celebrada en Berlín (2015), puede integrarse a nivel regional en biorrefinerías, en las que se realice la valorización en cascada de la biomasa Zabaniotou (2018) [207].

El empleo de biomasa como fuente energética (bioenergía) supone tres cuartas partes del consumo global de energías renovables en el mundo, según la Agencia Internacional de Energías Renovables, IRENA (2017) [8]. Por lo tanto, en el contexto del cambio climático y la seguridad energética resulta clave para conseguir los objetivos de desarrollo sostenible de Naciones Unidas.

2.2. Biocombustibles como alternativa

2.2.1. Tipos y clasificación

Desde un punto de vista químico, la biomasa está constituida por carbohidratos (azúcares, almidones, celulosa), aceites, grasas, lignina y proteínas. Estos materiales pueden ser transformados en combustibles líquidos o gaseosos, o en productos químicos sustitutos de otros productos derivados del petróleo.

Cuando se habla de biocombustibles, se hace referencia a todos los combustibles líquidos o gaseosos que se obtienen a partir de la biomasa y que pueden ser utilizados para cualquier aplicación energética, ya sea térmica, eléctrica o mecánica, para alimentar calderas y motores de combustión interna. No obstante, los términos comúnmente empleados para su definición son:

- **Biocarburante**: combustible líquido destinado al transporte y producido a partir de la biomasa.
- **Biolíquido**: combustible líquido destinado a usos energéticos distintos del transporte, entre ellos la producción de electricidad y de calor y frío a partir de la biomasa.
- **Biogás**: combustible gaseoso producido a partir de biomasa.
- **Biocarburantes avanzados**: son aquellos producidos a partir de materias primas como residuos y desechos de la agricultura y la silvicultura; concretamente quedan recogidas en el anexo IX, parte A de la Directiva (UE) 2018/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de diciembre de 2018 relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables [30].

La Tabla 2.1., obtenida de datos proporcionados por la Agencia Andaluza de la Energía (2020) [5], muestra los principales tipos de biocombustibles existentes en la actualidad, junto con sus usos más frecuentes.

Tabla 2.1. Principales biocombustibles y sus usos

Biocarburante	Descripción	Uso y Aplicaciones
Bioetanol	Etanol producido a partir de biomasa o de la fracción biodegradable de los residuos, para su uso como biocarburante	En motores de gasolina mezclado hasta el 15% En motores Flex-fuel en mezclas superiores al 15% o como E85 (85% de etanol) En motores diesel, mezclado en bajas proporciones
Biodiesel	Éster metílico producido a partir de aceite vegetal o animal de calidad similar al gasóleo	En motores diésel en mezcla con gasóleo convencional o al 100%
Biogás	Combustible gaseoso producido por digestión anaerobia de la biomasa y/o la fracción biodegradable de los residuos	Purificado hasta alcanzar la calidad del gas natural se usa como sustitutivo del mismo
Biometanol	Metanol producido a partir de la biomasa	Similares aplicaciones que el bioetanol
Biodimetiléter	Dimetiléter producido a partir de la biomasa	Indicado para la sustitución del gasoil en los motores de ciclo Diésel
Bio-ETBE (etil tercbutil éter)	ETBE producido a partir del bioetanol. La fracción volumétrica que computa como biocarburante es el 47 %	En mezcla al 15% en volumen con la gasolina
Bio-MTBE (metil tercbutil éter)	Combustible producido a partir del biometanol. La fracción volumétrica que computa como biocarburante es del 36 %	En mezcla al 15% en volumen con la gasolina
Biocarburantes sintéticos	Hidrocarburos sintéticos o sus mezclas, producidos a partir de la biomasa	En función del tipo podrá emplearse en un motor diésel o de ciclo Otto
Bio-hidrógeno	Hidrógeno producido a partir de la biomasa y/o a partir de la fracción biodegradable de los residuos	Para motores adaptados

Tabla 2.1. (cont) Principales biocombustibles y sus usos

Biocombustible	Descripción	Uso y Aplicaciones
Hidrobiodiesel	Producido por hidrogenación/isomerización de aceite vegetal o animal	Motores diesel
Aceites vegetales puros	Aceites vegetales obtenidos por procesos físicos/químicos	Restringido a motores diésel adaptados de tecnología tipo Elsbett o en motores compatibles
Bioqueroseno	Fracción ligera procedente de la destilación de biodiesel obtenido por transesterificación	En mezclas con queroseno hasta el 20% para uso en motores de aviación
Otros biocombustibles	Productos producidos por tratamiento en refinería de biomasa, la biogasolina y el bioLPG; y los carburantes de biorefinería	Motores diésel y Otto en función de las características del combustible

Las principales ventajas del uso de los biocombustibles son:

- Constituyen una fuente de energía renovable, que contribuye a reducir las emisiones globales de CO₂, ayudando a combatir el efecto invernadero y el calentamiento global.
- Permiten diversificar las fuentes de suministro energético, ya que sus materias primas son muy variadas, proporcionando mayor seguridad de abastecimiento energético.
- Reducen la dependencia nacional del petróleo.
- Poseen alta compatibilidad con los sistemas de transporte y distribución de los carburantes fósiles.
- Están sujetos a normas de calidad que garantizan su viabilidad técnica.
- Reducen las emisiones de partículas nocivas y otros contaminantes.

2.2.2. Bioetanol

“El bioetanol es alcohol etílico producido a partir de productos agrícolas o de origen vegetal, ya se utilice como tal o previa modificación o transformación química”, según la definición incluida en el Boletín Oficial del Estado, dentro de la Orden ITC/2877/2008 (2008) [29], por la que se establece un mecanismo de fomento del uso de biocarburantes y otros combustibles renovables con fines de transporte dentro del Boletín Oficial del Estado.

Históricamente el uso de etanol como combustible tiene su origen en los inicios del transporte motorizado, Demirbas (2009) [58]. Samuel Morey, inventor norteamericano, fue el primero en utilizar una mezcla de trementina y etanol en motores de combustión interna en el año 1820. En ese mismo siglo, Nicholas Otto, ingeniero alemán, desarrolló el primer motor de combustión interna que funcionaba con etanol. Henry Ford fue el primer fabricante de un automóvil con etanol como carburante, diseñando años después un modelo que podía funcionar tanto con alcohol como con gasolina, o con una mezcla de los dos Solomon *et al.* (2007) [185].

A partir de 1920, el petróleo dejó atrás a los combustibles vegetales debido a que resultaba más económico y generaba más energía por litro que el etanol, quedando relegado su uso hasta principios del siglo XXI, donde los problemas ambientales y la búsqueda de alternativas limpias produjo el resurgir de estas formas de energía.

Debido a que el etanol es una fuente neta de energía, fácilmente almacenable, con alto contenido de oxígeno (35 %) y combustión limpia, se le considera de gran aplicación potencial como combustible, Agüero-Rodríguez *et al.* (2015) [10], siendo utilizado como alternativa para la oxigenación y aumento de octanaje de la gasolina o como aditivo de la misma y como insumo para la producción de biodiésel.

Al ser el bioetanol un combustible obtenido de manera renovable a partir de restos orgánicos, los vehículos que los utilizan son menos contaminantes. Este biocarburante se encuentra ya mezclado o aditivado en la gasolina y gasoil. Las mezclas comúnmente

comercializadas son E5, E10 y E85. La letra identifica el tipo de biocombustible (E), bioetanol. El número señala el porcentaje de este compuesto que hay en la mezcla.

La mayor parte del etanol que se produce actualmente parte de materias primas ricas en azúcares (principalmente caña de azúcar y remolacha) y en almidón (maíz, trigo, cebada, etc.), es el conocido como bioetanol de **primera generación** o convencional, cuyo proceso de obtención está totalmente implantado a nivel comercial. Existe además una producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, el denominado bioetanol avanzado o de **segunda generación**, que se encuentra en vías de desarrollo comercial debido a que actualmente su coste de producción es relativamente alto comparado con los combustibles fósiles.

Para la producción de este bioalcohol pueden utilizarse diferentes materias primas o biomasa vegetales, residuales y/o de cultivos energéticos.

Según el tipo de carbohidrato que contengan, las materias primas se clasifican en sacaríferas (azúcares simples), amiláceas y celulósicas (celulosa y hemicelulosa) siendo todas ellas susceptibles de sufrir un proceso de fermentación, ya sea de manera directa (sacarosa) o tras un proceso de hidrólisis (almidón, inulina, lignocelulosa), a través del cual podremos obtener bioetanol.

La Agencia Internacional de la Energía [7], prevé que la demanda de biocombustibles a nivel mundial aumente un 28 % en los próximos 5 años, tras una caída histórica en 2020 en medio de la interrupción del transporte global debido a la pandemia de Covid-19.

En el caso del bioetanol, en particular, la previsión de aumento en la demanda se sitúa en un 28 % para 2026, alcanzando los 186 mil millones de litros.

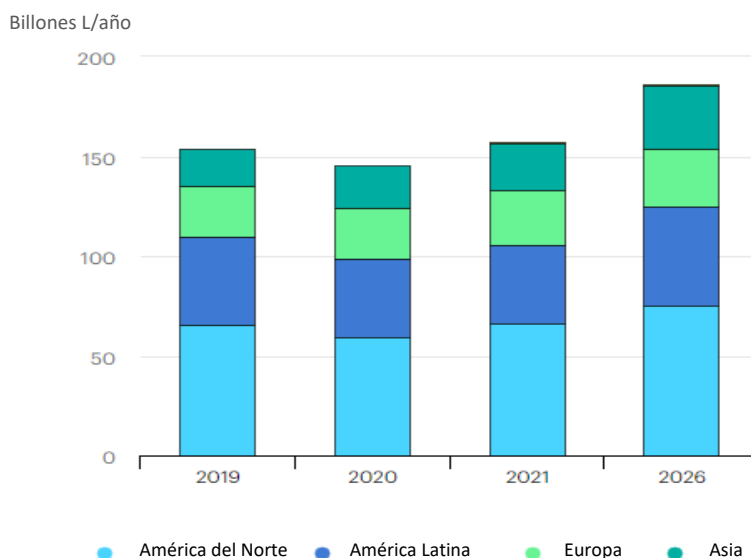


Fig. 2.2. Demanda de bioetanol en billones de litros al año a nivel mundial

La producción de bioetanol actualmente está encabezada por Estados Unidos y Brasil, con el 85% de la producción mundial, situándose Europa en tercer lugar, con Alemania como principal país productor.

En el caso de España, según se desprende del último “Estudio del impacto macroeconómico de las energías renovables en España” elaborado por APPA, (Asociación de Empresas de Energías Renovables) [19], la cuota en España de la industria nacional de bioetanol aumentó en 2019 hasta el 95,6%, el mayor nivel alcanzado en los últimos años, gracias a la gran caída experimentada por las importaciones (-85,4%).

La producción de las cuatro plantas de bioetanol existentes alcanzó en 2019 la cifra récord histórica de 433.136 toneladas gracias al crecimiento de las exportaciones, que aumentaron en un 22,3% con respecto al año anterior. Ello permitió elevar la ratio de operación del sector sobre la capacidad instalada (383.009 toneladas) hasta el 113%, frente al 108% alcanzado el año anterior. Por este motivo, el bioetanol experimentó un importante crecimiento de su aportación al PIB en 2019, un 13,6 %.

2.3. Biomasa

2.3.1. Concepto de biomasa

En la actualidad el término “biomasa” se puede definir como:

“un grupo de productos energéticos y materias primas de origen renovable y reciente que se originan a partir de materia orgánica formada por vía biológica”

Quedan fuera de este concepto los combustibles fósiles y las materias orgánicas derivadas de estos ya que, aunque ellos tuvieron un origen biológico, su formación tuvo lugar en tiempos remotos. La biomasa es una energía renovable de origen solar a través de la fotosíntesis de los vegetales.

Como recurso energético se puede clasificar en:

- **Biomasa Natural**: producida en la naturaleza sin intervención humana
- **Biomasa Residual**: subproducto o residuo generado en distintas actividades humanas, diferenciándose a su vez:
 - Biomasa residual seca: forestal, agrícola, industrial agroalimentaria y maderera, residuos sólidos urbanos y biogás de vertederos.
 - Biomasa residual húmeda: residuos ganaderos e industriales biodegradables (aguas residuales)
- **Cultivos Energéticos**: destinados a la producción de calor y biocombustibles, Barroso (2010) [22].

2.3.2. Material lignocelulósico

De forma general, el término de material lignocelulósico hace referencia a aquel que procede de tejidos vegetales cuyas células presentan una pared celular constituida por un entramado de microfibrillas de celulosa, formando capas recubiertas de hemicelulosa y sobre las que se deposita lignina, Barroso (2010) [22]. Estos materiales constituyen la mayor fuente de biomasa del planeta y comprenden: residuos forestales y agrícolas, residuos sólidos urbanos y derivados del papel.

Comúnmente utilizado, el término de biomasa celulósica o lignocelulósica hace referencia al componente principal de dicha biomasa, la celulosa, materia prima de donde se obtiene la glucosa, de cuya fermentación se produce etanol.

En valores porcentuales medios, la biomasa lignocelulósica estaría formada por un 40 al 50 % de celulosa, del 25 al 30 % de hemicelulosa y del 15 al 20 % de lignina, además de trazas de pectina, compuestos de nitrógeno e ingredientes inorgánicos, como se muestra en la Fig. 2.3., Tayyab *et al.* (2017) [191].

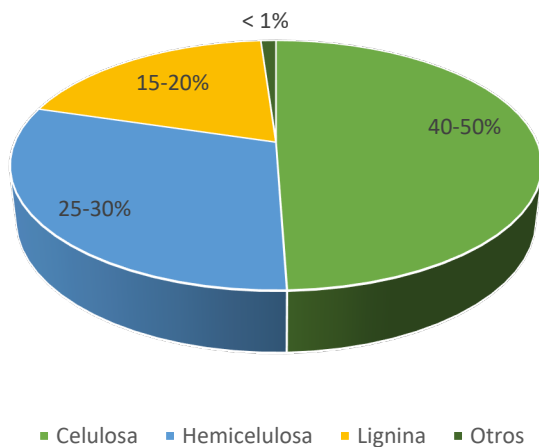


Fig. 2.3. Composición general en porcentaje de la biomasa lignocelulósica

Pese a ser el componente mayoritario y al elevado porcentaje en el que se encuentra la celulosa en este tipo de biomasa debemos destacar la difícil accesibilidad que presenta, ya que se encuentra íntimamente unida a otros materiales de la pared celular como la lignina o las sustancias pépticas.

Según su función e importancia, los componentes de los materiales lignocelulósicos se clasifican en:

- Componentes estructurales

Lo forman principalmente tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, aunque pueden existir otras moléculas como pectinas, glicoproteínas, suberina y cutina.

- Componentes secundarios

Se presentan en menor proporción y son de dos tipos; por un lado, se consideran los extractos, componentes de bajo peso molecular, hidrosolubles o extraíbles en solventes orgánicos y, por otro lado, las cenizas, compuestas principalmente por sales minerales.

La Figura 2.4. muestra la división de la biomasa lignocelulósica en estos componentes principales.

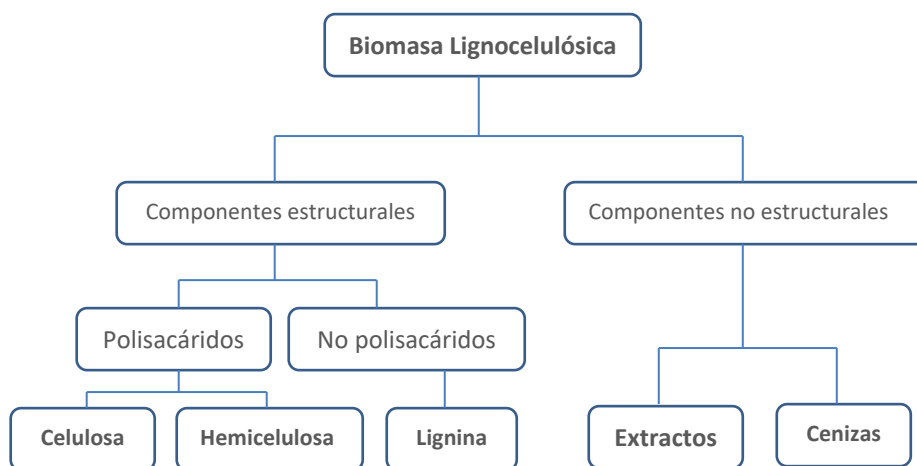


Fig. 2.4. División de los componentes principales de la biomasa lignocelulósica

Según el tipo de material, la proporción entre los principales componentes estructurales de la biomasa es variable. De forma general, la pared primaria de las plantas está formada por una matriz de hemicelulosas (25-50%), microfibrillas de celulosa (9-25%), pectinas (10-35%) y proteínas (10%), mientras que la pared secundaria contiene celulosa (40-80%), hemicelulosa (10-40 %) y lignina (5-25%), Bidlack *et al.* (1992) [27].

Dentro de los materiales estructurales se estudiarán en mayor profundidad los polímeros fundamentales, celulosa, hemicelulosa y lignina.

2.3.2.1. Celulosa

La celulosa es el polímero mayoritario del planeta y el componente principal de las paredes celulares de los vegetales; es blanca, muy estable, de estructura fibrosa y resistente al ataque químico y a la tracción mecánica.

Estructuralmente su base consiste en una cadena lineal de moléculas de glucosa, unidas mediante un enlace glucosídico de tipo β (1-4) (cadena glucánica).

Esta configuración β permite formar cadenas largas y fuertes, estabilizadas por enlaces mediante puentes de hidrógeno internos, entre las diferentes unidades de glucosa, y enlaces intermoleculares, entre glucosas pertenecientes a distintas cadenas. A través de estos puentes de hidrógeno varias cadenas adyacentes de celulosa (60-70) se combinan formando fibrillas que se reúnen en microfibrillas. Estas están caracterizadas por zonas en las que las cadenas glucánicas se organizan en estructuras altamente ordenadas (zonas cristalinas) encajadas en una fase amorfa, Hendriks y Zeeman (2009) [77].

En la Figura 2.5. se muestra la estructura de una de estas microfibrillas constituyentes de la pared celular descritas.

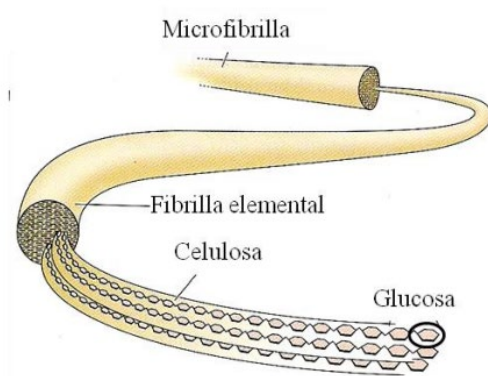


Fig. 2.5. Estructura de una microfibrilla constituyente de la pared celular

La longitud de una molécula de celulosa se determina mediante el número de unidades de glucano del polímero, que alude al grado de polimerización. Este grado depende del tipo de planta, pero parece estar comprendido entre 2.000 y 27.000 unidades, Taherzadeh y Karimi (2007) [188].

2.3.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido cuya estructura está constituida por diferentes unidades de monosacáridos: pentosas, hexosas, y ácidos urónicos.

En este polisacárido se forman cadenas ramificadas de menor grado de polimerización que la celulosa y no tienen, por tanto, zonas cristalinas. Además, los puentes de hidrógeno son menos eficaces, haciendo que sean más accesibles al ataque de reactivos químicos.

La composición de la hemicelulosa en maderas duras y blandas difiere significativamente. Las maderas duras están constituidas mayoritariamente por heteroxilanos, relativamente lábiles a la hidrólisis ácida, pudiéndose llevar a cabo la autohidrólisis en condiciones medias de severidad. Por el contrario, en maderas blandas existe una gran proporción de glucomananos, más resistentes a la hidrólisis ácida, Pereira (2003) [143].

2.3.2.3. Lignina

La lignina es un polímero aromático de estructura tridimensional compleja, amorfa y muy ramificada, formada por la condensación de precursores fenólicos unidos por diferentes enlaces; presenta una estructura polimérica macromolecular.

Entre sus funciones cabe destacar la protección de la celulosa del ataque microbiano, el conferir resistencia e impermeabilidad al material y la de mantener unidas las fibras celulósicas. Sus unidades fundamentales son 3-metoxi-4-hidroxifenilpropano y 3,5-dimetoxi-4-hidroxifenilpropano, Sarkanen y Ludwig (1971) [171].

La lignina representa aproximadamente entre 20 y 35 % de la materia seca en fibras madereras y entre 10-25 % en fibras no madereras.

La Figura 2.6. muestra la estructura general de la biomasa lignocelulósica, Horvat (2016) [79].

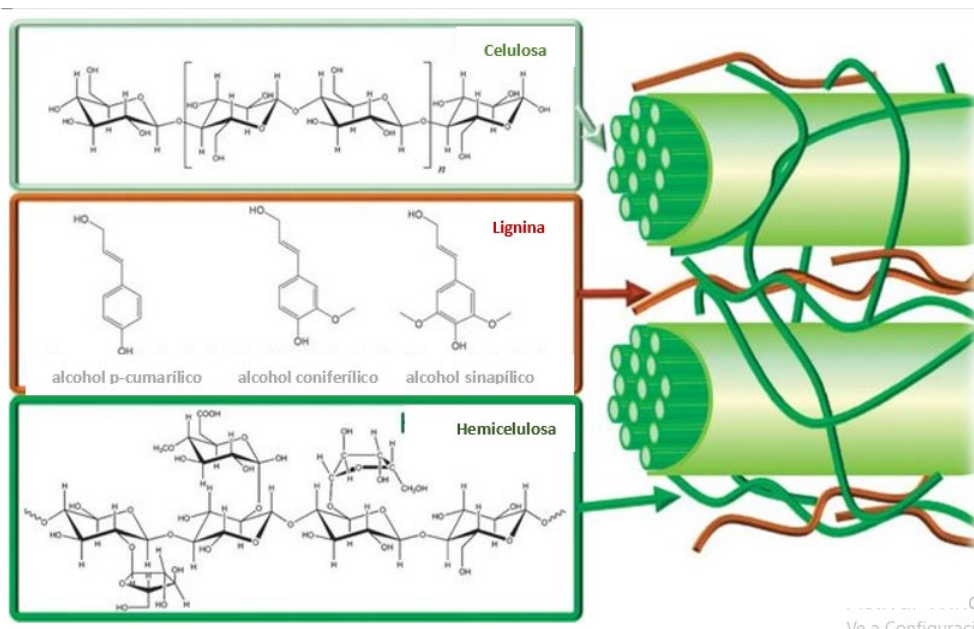


Fig. 2.6. Estructura de la biomasa lignocelulósica

La composición de las principales fracciones de los materiales lignocelulósicos varía en función del residuo que se considere, como refleja la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Composición en base seca de la biomasa lignocelulósica (%)

	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Referencias
Bagazo de caña de azúcar	42-48	19-25	20-42	Saini <i>et al.</i> (2015) [164]
Paja de arroz	28-36	23-28	12-14	Mateo (2011) [121], Saini <i>et al.</i> (2015) [164]
Paja de Trigo	33-38	26-32	17-19	Rabemanolontsoa and Saka (2013) [152] Saini <i>et al.</i> (2015) [164]
Paja de centeno	33-35	27-30	16-19	Sánchez (2009) [166]
Paja de avena	31-37	27-38	16-19	Sánchez (2009) [166]
Paja de cebada	31-45	27-38	14-19	Saini <i>et al.</i> (2015) [164]
Mazorca de maíz	38-45	25-35	15-22	Howard <i>et al.</i> (2003) [80], Cherubini y Ulgiati (2010) [44]
Girasol	34-42	5-29	7-13	Kumar <i>et al.</i> (2020a) [95]
Carrizo	35	23	20	Scordia <i>et al.</i> (2011) [173]
Bambú	41-42	18	29-30	Ma <i>et al.</i> (2020) [115]
Pino	42-50	19-22	25-30	Aguilera <i>et al.</i> (1985) [9]
Eucalipto	44-46	17-19	23-28	Garrote <i>et al.</i> (2007) [73]
Haya	43-45	33-34	21-22	Demirbas (2005) [57]
Abeto	42-44	29-30	27-29	Demirbas (2005) [57]
Álamo	39-40	14-15	29-30	Kumar <i>et al.</i> (2020a) [95]
Poda de olivo (con hoja)	30-40	24-27	18-23	Mateo (2011) [121]
Madera de poda de olivo	36-39	22-26	14-17	García (2007) [68]

En los últimos años, debido a las políticas de gestión de residuos, la búsqueda de energías alternativas y la protección ambiental ha aumentado el interés por encontrar aplicación a los materiales lignocelulósicos.

Los estudios para el aprovechamiento de esta biomasa pasan por su conversión, ya sea por vía termoquímica, mediante procesos de combustión, gasificación y pirólisis, o por conversión bioquímica, con procesos de digestión o de hidrólisis y fermentación. En este último caso, se recurre a la hidrólisis, por la acción de ácidos o de enzimas, de las fracciones celulósicas y hemicelulósicas de manera que se obtengan soluciones con pentosas y hexosas fermentables, Palmqvist y Hahn Hägerdal (2000) [139].

2.4. El olivar como fuente de biomasa lignocelulósica

2.4.1. Localización, extensión y características

El sector del aceite de oliva es un pilar fundamental en el sistema agroalimentario español. España es líder mundial en superficie, producción, y comercio exterior con un 70% de la producción de la UE y el 45% de la mundial.

Periódicamente el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y las Consejerías competentes en esta materia elaboran una Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE) [126]. Según la última de ellas, elaborada con los datos de 2022, en España el olivar abarca más de 2,76 millones de hectáreas, estando presente en 15 de las 17 comunidades autónomas con una distribución centro-sur y este de la península, principalmente.

El sector no solo tiene una indiscutible importancia económica, sino que también tiene una gran repercusión social, ambiental y territorial. Más de 350.000 agricultores se dedican al cultivo del olivar; el sector mantiene unos 15.000 empleos en la industria y genera más de 32 millones de jornales por campaña.

En el caso de la comunidad autónoma andaluza, en la actualidad 1.671.180 hectáreas son dedicadas al cultivo del olivo, de las cuales 1.021.419 son de secano y 649.762 de regadío (según datos recopilados los primeros meses de 2023, correspondientes a la campaña de 2022).

La Figura 2.7. muestra la superficie en hectáreas destinada al cultivo objeto de estudio en cada una de las provincias de Andalucía, según el informe de “Avance de superficies y producciones”, elaborado por la Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo rural [50].



Fig. 2.7. Superficie destinada al olivar en las provincias andaluzas (ha)

Según el informe ESYRCE (2022) [126], se confirma que, aunque a ritmo lento, debido sobre todo a los problemas de sequía y cambio climático, sigue la tendencia de aumento progresivo de la superficie agrícola andaluza destinada al cultivo del olivo, con más de 100.000 hectáreas nuevas en los últimos 8 años (1.567.375 ha en 2015 según ESYRCE).

En este informe se constata, asimismo, que la mayor parte de su fruto se destina a la producción de aceite, que el régimen hídrico predominante es seco, que más de la mitad de los olivares (el 52,5%) superan el medio siglo de vida y que la densidad de plantación más frecuente está entre 100 y 200 árboles por hectárea, entre otras cuestiones.

Por provincias, Jaén es la que engloba la mayor superficie, con 588.252 hectáreas, que suponen el 35% del total de olivar andaluz, seguida de Córdoba, con 371.144 hectáreas, destinadas en su mayoría a la producción de aceite en ambos casos. Sevilla, que ocupa el tercer puesto con 242.215 hectáreas, siendo la provincia con mayor número de hectáreas de olivar destinadas a aceituna de mesa.

Como características adicionales del olivar andaluz destacar que, en cuanto a tratamiento del suelo, la gran parte de los productores se decantan por técnicas sostenibles de manejo del suelo, cubierta vegetal espontánea y laboreo mínimo, con una profundidad no superior a 20 centímetros.

En cuanto al peso económico del sector, la producción de la campaña de 2021 en Andalucía superó los 3.560 millones de euros, existiendo actualmente en esta comunidad autónoma 868 almazaras, 657 envasadoras de aceite, 40 orujeras, 13 refinerías, 224 entamadoras y 115 envasadoras de aceituna.

En Jaén el olivar ocupa el 85% de la superficie agrícola, siendo la poda de olivo el residuo más abundante. Anualmente se producen grandes volúmenes de esta biomasa lignocelulósica que conllevan una problemática ambiental asociada a su tradicional quema en los campos de cultivo.

Este hecho unido al coste mínimo o nulo que supondría disponer de ella hace que surja la posibilidad de su utilización en otros campos, como en la síntesis de compuestos químicos (carbón activo, furfural, carbohidratos y antioxidantes) o la industria energética.

2.4.2. La poda de olivo

El proceso de poda se define como el conjunto de operaciones dirigidas a cortar o quitar las ramas de los árboles y plantas para que crezcan y se desarrollen con más vigor, a fin de estimular el crecimiento, mejorar el desarrollo y la floración y lograr proporcionar una distribución equilibrada de las ramas.

Al ser el olivo un cultivo muy longevo, a lo largo de su vida hay que aplicar diferentes criterios de poda como son el de poda de formación, poda de producción y poda de renovación de ramas, todos ellos procesos necesarios para llegar a mantener una plantación de olivar productiva incluso cuando su edad supera la centena de años.

Además, la poda en el cultivo del olivar posee otros objetivos como controlar el volumen de copa para mantener una producción equilibrada y de calidad, adaptar la estructura de la planta a la recolección mecanizada y reducir la incidencia de plagas y enfermedades.

Como norma general, la poda debe de realizarse cuando la actividad vegetativa del olivo sea mínima, una vez efectuada la recolección, evitando podar cuando la savia ya está en movimiento ya que la cicatrización es peor. En general, en el caso de que la recolección de la aceituna sea para su uso como aceituna de mesa la poda se realizará entre noviembre y diciembre, mientras que para la destinada a la producción de aceite el proceso tendrá lugar entre febrero y abril.

Durante la poda es común la acumulación de la misma en la parte central de las hileras de dicho cultivo, como muestra la Figura 2.8., tomada de la Sociedad Cooperativa Andaluza de San Vicente de Mogón, Jaén [182]. Desde estas zonas centrales, la poda es posteriormente triturada o quemada, conllevando ambas opciones problemas ambientales asociados. En el caso del depósito de la poda triturada sobre el suelo se han identificado problemas de proliferación de hongos patógenos, como es el caso del *Verticilium dahlia*. Por otra parte, con la quema in situ de los restos de poda aparecen las emisiones de CO₂, la mineralización del suelo o el alto riesgo de incendios, surgiendo así la necesidad de un nuevo destino para el aprovechamiento de esta biomasa lignocelulósica, principalmente por vía bioquímica (procesos de sacarificación por hidrólisis ácida o enzimática y fermentación) o termoquímica (combustión, gasificación, pirólisis).



Fig. 2.8. Concentración de poda de olivo en la parte central de las hileras del cultivo

La biomasa generada en el proceso de poda del olivo contiene por término medio un 50% de hojas, un 25% de madera de las ramas finas de diferente grosor, y un 25% de madera gruesa o leña, de diámetro superior a 5 cm, aunque estos porcentajes dependerán de factores como el tipo de poda que se realice, de la edad de la plantación, las condiciones climáticas o la zona de cultivo.

Para caracterizar la poda de olivo existen diferentes metodologías, destacando la propuesta por la Agencia de eficiencia energética y energías renovables de Estados Unidos, NREL (de sus siglas en inglés, National Renewable Energy Laboratory) o la de Browning (1967) [32] y Rocha (2000) [159].

La composición de la biomasa de poda de olivo, según su contenido porcentual en humedad, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas, expresados en peso referido a biomasa seca se recoge en la Tabla 2.3., Sánchez *et al.* (2002) [169].

Tabla 2.3. Composición en porcentaje del residuo de poda de olivo

	Madera (%)	Hojas (%)	Total (%)
Humedad	10,7	8,5	10,2
Celulosa	32,8	5,3	36,6
Hemicelulosa	26,9	16,3	19,7
Lignina	14,7	23,1	20,8
Cenizas	1,5	5,0	3,3

En la presente Tesis doctoral se estudiarán las posibilidades que ofrece la poda de olivo sin hoja como materia prima de partida. Dicha materia prima será procesada con diversos tratamientos de naturaleza física, química y bioquímica para la obtención de productos de interés industrial como son el ácido acético, y los bioalcoholes, como el etanol y el xilitol.

Se descarta el uso de la hoja debido al gran número de estudios existentes tanto en nutrición animal como en salud que otorgan utilidad a la misma.

2.5. Fraccionamiento, conversión y aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica

En la conversión de materias lignocelulósicas queda consensuada la necesidad de realizar 4 etapas principales para que este proceso sea efectivo: reducción de tamaño de la biomasa, pretratamiento, hidrólisis y conversión a productos finales como biocombustibles, Carroll y Somerville (2009) [38].

La producción de bioetanol solo puede ser rentable a partir del aprovechamiento de las distintas fracciones valorizables que compensen los costes de las fases de almacenamiento, pretratamiento y tratamiento necesarias para la bioconversión.

Existen multitud de métodos de pretratamiento y tratamiento de la materia lignocelulósica, clasificados generalmente en físicos, físico-químicos, químicos y biológicos. La Tabla 2.4., adaptada de Mateo (2011) [121], muestra un resumen general de los más destacados.

El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica por conversión bioquímica, seleccionada en esta tesis doctoral, tiene como etapas fundamentales la hidrólisis del material y la fermentación de la solución resultante. La primera etapa será de tipo químico (con ácido oxálico diluido), mientras que la fermentación estará mediada por microorganismos, estudiando además como influyen en los rendimientos finales la realización o no de algunos pretratamientos o tratamientos de detoxificación de los hidrolizados.

Tabla 2.4. Clasificación general de pretratamientos y tratamientos realizados sobre biomasa lignocelulósica

TIPO	TRATAMIENTO	CAMBIOS
FÍSICOS	Pulverización mecánica	
	Pirólisis	- Aumentan el área superficial, accesibilidad y tamaño de poro.
	Microondas	- Disminuyen cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa.
	Rayos gamma	- Producen hidrólisis parcial de hemicelulosas.
	Expansión	- Despolimerización parcial de lignina
	Extrusión	
FÍSICO- QUÍMICOS	Explosión con vapor	
	Hidrotérmico o autohidrólisis	
	Oxidación húmeda	
	Explosión de fibra con NH₃	
	Explosión con CO₂, NO₂, SO₂	- Deslignificación - Disminución de cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa - Hidrólisis de hemicelulosas
QUÍMICOS	Hidrólisis ácida (H₂SO₄, HCL, etc.)	
	Hidrólisis alcalina NH₃, NaOH	
	Ozonolisis	
	Extracción con organosolventes	
	Deslignificación oxidativa	
BIOLÓGICOS	Maceración pectinolítica	- Degradación de la lignina
	Maceración xilanolítica	- Reducción del grado de polimerización de hemicelulosa y celulosa
	Deslignificación bacteriana y	
	fúngica	

2.6. Pretratamiento de la biomasa

Actualmente queda asumida la necesidad de un pretratamiento de la biomasa, indispensable para que celulosa y hemicelulosa queden accesibles para su fraccionamiento posterior en azúcares simples fermentables. Dicho pretratamiento es una de las etapas que más afectan a la viabilidad económica del proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, ya que suele tener unos elevados requerimientos energéticos y de equipamiento, Alvira *et al.* (2010) [14].

El objetivo global de cualquier pretratamiento es alterar la compleja estructura de la biomasa, Taherzadeh y Karimi (2007) [188], facilitando la acción de las enzimas o de los compuestos químicos usados en las etapas posteriores.

En la bibliografía existe una gran variedad de pretratamientos cuya finalidad es mejorar la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica. Las propiedades físico-químicas y el comportamiento de cada materia prima es diferente por lo que es necesario aplicar el pretratamiento más adecuado dependiendo del tipo de material de partida, Karagöz *et al.* (2012) [87]. Además, la selección de los tratamientos previos a llevar a cabo tendrá influencia en otros aspectos como la generación de sustancias inhibitoras en los hidrolizados, la demanda de energía o la necesidad de tratamiento de las corrientes líquidas obtenidas como aguas residuales.

Las principales características que se buscan en un pretratamiento para la producción de etanol son, Alvira *et al.* (2010) [14]; Van Dyk y Pletschke (2012) [197]; Zabed *et al.* (2016) [208]; Mankar *et al.* (2021) [117]:

- Obtener sólidos con alta digestibilidad de celulosa, reduciendo su cristalinidad y su grado de polimerización.
- Deslignificar la biomasa, no alterando en exceso la estructura nativa de la lignina, solo lo necesario para garantizar la accesibilidad, puesto que, una severa

deslignificación puede ocasionar problemas por agregación de las microfibrillas de celulosa, además de la aparición de compuestos no deseables.

- Evitar una degradación significativa de azúcares.
- Generar la menor cantidad posible de compuestos tóxicos e inhibidores.
- Reducir el tamaño de partícula con el fin de aumentar el área superficial de acción.
- Permitir el trabajo con diferentes tipos de biomasa y altas cargas de la misma, economizando tiempo y recursos.
- Presentar bajo consumo de energía reduciendo costes e intentando recuperar algunos de los reactivos o compuestos como la lignina para aumentar la viabilidad económica del proceso.

Los pretratamientos se pueden clasificar en 4 grupos generales: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos.

2.6.1. Pretratamientos Físicos

Los métodos de pretratamiento físico se utilizan generalmente para reducir el tamaño de partícula de la biomasa. Durante este tipo de pretratamientos se emplean generalmente herramientas mecánicas como molinos, fresas, amoladoras o tornillos, y técnicas como rayos ultravioleta, rayos gamma o microondas, Mankar *et al.* (2021) [117].

Los requerimientos energéticos de estos pretratamientos mecánicos dependen del tamaño final de partícula que se quiera alcanzar y del tipo de biomasa, Sánchez y Cardona (2008) [167]; Cuervo *et al.* (2009) [52].

La Tabla 2.5. muestra los principales pretratamientos físicos usados actualmente junto con ejemplos de biomasa tratada con los mismos.

Tabla 2.5. Pretratamientos físicos sobre diferentes tipos de biomasa

Pretratamiento	Características	Biomasa pretratada	Referencias
Molienda	Técnicas encaminadas a reducir el tamaño de partícula (astillado, trituración, molienda)	Rastrojo de maíz Bagazo de caña Paja de trigo	Zhang <i>et al.</i> (2013) [209] Sun y Cheng (2002) [187] Qu <i>et al.</i> (2017) [151]
Extrusión	Proceso termo-mecánico para la reducción del tamaño mediante el uso de una herramienta de conformación	Paja de arroz madera de pino	Chen <i>et al.</i> (2023) [41] Karunanithy <i>et al.</i> (2012) [88]
Ultrasonidos	Ondas por encima del rango auditivo responsables de la cavitación acústica que genera microburbujas que al colapsar producen ondas de choque o puntos calientes locales que atacan la estructura cristalina de la biomasa	Serrín de roble rojo Astillas de yuca Bagazo de caña	Rezania <i>et al.</i> (2009) [156] Nitayavardhana <i>et al.</i> (2010) [135] Ramadoss y Muthukumar (2014) [153]
Microondas	Radiaciones electromagnéticas no ionizantes que inducen explosiones dentro de las partículas de un material y, por lo tanto, facilitan la ruptura de estructuras recalcitrantes	Bagazo de caña Pasto varilla Eucalipto	Ethaib <i>et al.</i> (2015) [61] Amini <i>et al.</i> (2018) [16]
Rayos gamma	Radiación ionizante que produce modificaciones estructurales y disminución de la cristalinidad de la celulosa debidas a la acción de radicales libres que ayudan a la degradación de los polisacáridos y a la deconstrucción de la pared celular por escisión de enlaces glucosídicos	Rastrojo de caña Maíz Eucalipto Álamo blanco	Liu <i>et al.</i> (2017) [109] Chung <i>et al.</i> (2012) [48]
Irradiación por haz de electrones	Radiación ionizante altamente cargada que al chocar con la biomasa trasfiere su energía a la misma, rompiendo los polímeros de la pared celular y generando radicales libres	Paja de arroz	Bak <i>et al.</i> (2009) [20] Kumar <i>et al.</i> (2020a) [95]
Pirólisis	Conversión de la biomasa mediante calentamiento en una atmósfera sin oxígeno	Bagazo de caña Eucalipto Pino	Chen <i>et al.</i> (2023) [41] Kumar <i>et al.</i> (2020b) [97]

2.6.2. Pretratamientos químicos

En este tipo de tecnologías se emplean diferentes agentes químicos como ozono, ácidos, bases, peróxidos y solventes orgánicos, con el fin de buscar la disolución de la lignina y el aumento del área de acción para la posterior hidrólisis química o enzimática.

Desde un punto de vista estrictamente químico se deberán de tener una serie de consideraciones a la hora de la selección de un pretratamiento.

En las reacciones químicas implicadas en la desestructuración de la biomasa lignocelulósica, como consecuencia del pretratamiento, cabe destacar que los principales tipos de enlace entre los componentes del material lignocelulósico son los enlaces de hidrógeno y los enlaces de tipo éter y éster.

Los enlaces de hidrógeno unen las fibras de hemicelulosas con las de celulosa y están formados entre los hidrógenos de los grupos hidroxilo sustituyentes de ambos compuestos, Bidlack *et al.* (1992) [27]. Estos enlaces son poco energéticos, y, por lo tanto, más fácilmente rompibles conforme la temperatura del pretratamiento va aumentando.

La cantidad de puentes de hidrógeno que conforman la estructura de la celulosa es mayor que la de la hemicelulosa. Este factor influirá en el grado de resistencia de ambos componentes al pretratamiento, ya que el agente hidrolítico encargado de desestructurar la materia prima tiene una accesibilidad directamente relacionada con el número de puentes de hidrogeno presentes en la estructura a hidrolizar, Pérez (2008) [145].

Los enlaces tipo éter son los responsables de las uniones entre los monómeros constituyentes de los polímeros de celulosa y hemicelulosa, así como de las uniones entre la hemicelulosa y la lignina.

El enlace éter es muy estable al ataque de la mayoría de ácidos, excepto a los ácidos bromhídrico y yodhídrico, y resulta menos reactivo frente a las bases. Además, las altas temperaturas empleadas en la mayoría de los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica producen sobre el átomo de oxígeno un aumento de la densidad electrónica negativa que le confiere una mayor susceptibilidad ante el ataque de un electrófilo, Vollhardt y Schore (2002) [199].

Por último, los enlaces de tipo éster unen los grupos acetilos a la cadena del heteropolímero principal de las hemicelulosas, además de encontrarse también en las uniones entre la lignina y la hemicelulosa.

En función de estas características, en cada investigación se seleccionará el pretratamiento acorde con las necesidades requeridas.

Los pretratamientos químicos tienen un coste algo más elevado en comparación con otros pretratamientos, ya que la adición de agentes químicos y la eliminación de dichos compuestos, en algunas ocasiones, suponen un coste adicional, no obstante presentan una alta efectividad en el ataque de la compacta estructura de la biomasa lignocelulósica.

En la Tabla 2.6. se recogen ejemplos de los principales pretratamientos estudiados hasta la fecha, junto con algunos tipos de biomasa sobre los que se ha llevado a cabo.

Tabla 2.6. Pretratamientos químicos aplicados a diferentes tipos de biomasa

Pretratamiento	Compuesto usado	Material pretratado	Referencias
Hidrólisis con ácido diluido	H ₂ SO ₄ HNO ₃	Paja de arroz Paja de trigo Bagazo de caña	Bhutto <i>et al.</i> (2015) [26] Sun y Cheng (2002) [187] Rodríguez-Ching <i>et al.</i> (2004) [160]
Hidrólisis con ácido concentrado	H ₂ SO ₄	Paja de trigo Tallo de maíz Bagazo de caña	Bhutto <i>et al.</i> (2015) [26] Demirbas (2005) [57]
Hidrólisis alcalina	KOH NaOH	Bambú Rastrojo de maíz Paja de girasol	Yuan <i>et al.</i> (2018) [206] Kumar <i>et al.</i> (2020a) [95]
Deslignificación oxidativa	H ₂ O ₂ , ozono, oxígeno	Bambú Cáscara de arroz Bagazo de marañón Bagazo de manzana	Yuan <i>et al.</i> (2018) [206] Da Costa <i>et al.</i> (2013) [55] Teong <i>et al.</i> (2019) [192]
Ozonolisis	O ₃	Paja de trigo Paja de algodón Bagazo de caña	Sun y Cheng (2002) [187] Travaini <i>et al.</i> (2013) [194]
Organosolv	Metanol, etanol, acetona	Álamo Pino Madera de eucalipto	Chum <i>et al.</i> (1990a) [46] Park <i>et al.</i> (2010) [142] Kumar <i>et al.</i> (2020a) [95]
Líquidos iónicos	Nmetilmorfolina-N-óxido monohidrato, cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio	Bagazo de caña	Kumar <i>et al.</i> (2020a) [95]
Procesos hidrotrópicos	Benzoato de sodio, cimenosulfonato de sodio, fenolsulfonato de sodio, etc.	Bagazo de caña Eucalipto	Gabov <i>et al.</i> (2017) [66] Kumar <i>et al.</i> (2020a) [95]

Se estudiarán en mayor profundidad los pretratamientos de hidrólisis alcalina y deslignificación oxidativa seleccionados en el presente estudio, ambos centrados en el uso de álcalis, presentan numerosas ventajas debido a las menores temperaturas y presiones de trabajo, menor corrosión de equipos, uso de reactores más simples, mínima formación de inhibidores y conservación considerable de carbohidratos, Phitsuwan *et al.* (2016) [147].

2.6.2.1. Hidrólisis alcalina

Se trata de un pretratamiento normalmente realizado utilizando álcalis como NaOH, KOH, Ca(OH)_2 o NH_4OH , siendo el hidróxido de sodio el comúnmente más utilizado en el pretratamiento de diferentes tipos de biomasa para la generación de bioetanol, biobutanol y biohidrógeno, Battista *et al.* (2016) [23], Garcia-Torreiro *et al.* (2016) [71].

Este tipo de hidrólisis puede llevarse a cabo a temperatura ambiente, con tiempos de tratamiento más largos, o aumentar la temperatura con el fin de reducir dichos tiempos.

La hidrólisis alcalina produce un hinchamiento de la celulosa que implica una reacción de saponificación que mejora la porosidad de la biomasa debido a una alteración en los enlaces cruzados entre la hemicelulosa y la lignina/celulosa. Se produce la alteración de la estructura de la biomasa lignocelulósica a través de la ruptura de enlaces éster, éter y C-C, haciendo la matriz más accesible para los procesos enzimáticos y/o de fermentación posteriores, Saratale y Oh (2015) [170].

De forma general, este tipo de pretratamiento mejora la superficie accesible, reduce la cristalinidad de la celulosa, altera la lignina, elimina los grupos acetilo y produce la escisión del ácido urónico, Agbor *et al.* (2011) [4].

Algunos ensayos de pretratamiento con NaOH a baja concentración (2% peso/peso) realizados sobre cáscara de arroz muestran una eliminación de lignina del 54%, un aumento de la concentración de celulosa superior al 51% y una baja solubilización de la hemicelulosa, Shahabazuddin *et al.* (2018) [174].

2.6.2.2. Deslignificación oxidativa

Este pretratamiento implica un proceso de oxidación que da como resultado la despolimerización de la lignina, la deconstrucción de las hemicelulosas en sus constituyentes mediante la oxidación selectiva de carbohidratos, la oxidación de compuestos como furfural e hidroximetil furfural a ácidos carboxílicos y la escisión del doble enlace C-C para ácidos grasos insaturados, Hendriks y Zeeman (2009) [77], Ho *et al.* (2019) [78].

Los principales oxidantes utilizados son el oxígeno, el ozono y el peróxido de hidrógeno, el mecanismo para el ataque a la estructura de la biomasa variará según el oxidante escogido y las condiciones de reacción.

Algunas investigaciones, como la llevada a cabo por Li *et al.* (2014) [105], observaron las características recalcitrantes de la pared celular vegetal de diversas materias primas, como el rastrojo de maíz o el álamo, durante el pretratamiento con H₂O₂ en concentraciones entre el 12,5–50% en peso, encontrando alteraciones importantes en la estructura, el grado de polimerización de la celulosa y su índice cristalino.

Ensayos realizados sobre paja de cebada con pretratamientos con peróxido de hidrógeno combinados con otros álcalis como NaOH y NaClO consiguieron mejoras en el rendimiento por encima del 79%, Sheikh *et al.* (2015) [175], mientras que sobre paja de maíz pretratada con H₂O₂ al 1,5% en combinación con ácido sulfúrico y agua se obtuvieron como resultado la disolución completa de la biomasa y la reducción significativa de compuestos como ácido levulínico, furfural e HMF, Yuan *et al.* (2016) [205].

Algunos autores defienden que en concentraciones de H₂O₂ por encima del 4% pueden aparecer problemas de inhibición en la posterior digestión anaeróbica durante la metanogénesis debido al exceso de iones hidroxilo generados, Song *et al.* (2012) [186].

2.6.3. Pretratamientos físico-químicos

Los pretratamientos físico-químicos son un enfoque combinado en el que sustancias químicas median procesos desarrollados generalmente a altas presiones y temperaturas cuya finalidad es atacar la estructura de la biomasa lignocelulósica de forma más rápida y eficiente.

En estos pretratamientos el tiempo será un factor decisivo ya que en exposiciones prolongadas a altas temperaturas y concentraciones de compuestos químicos la aparición de sustancias inhibidoras es mayor.

La Tabla 2.7. recoge un resumen de los principales pretratamientos físico-químicos existentes junto con sus características y algunos tipos de biomasa sobre los que han sido ensayados.

Tabla 2.7. Pretratamientos físico-químicos sobre diferentes tipos de biomasa

Pretratamiento	Características	Biomasa pretratada	Referencias
Explosión de vapor	Vapor caliente de 160 a 270 °C con un tiempo de residencia corto. Una vez completado el proceso, se libera la presión provocando la evaporación de la humedad y la digestión de la biomasa	Rastrojo de maíz	Liu <i>et al.</i> (2013) [110]
Agua líquida caliente (LHW)	Combina fuerzas mecánicas que se producen al mantener agua en estado líquido a elevadas temperaturas (160-240 °C) y presiones superiores a 5 MPa, y efectos químicos debido a la hidrólisis de los grupos acetilo presentes en la hemicelulosa	Bambú Paja de centeno	Kumar <i>et al.</i> (2020c) [99] Ingram <i>et al.</i> (2011) [81]
Líquidos iónicos asistidos por ultrasonidos	Tratamiento con BMIMCl y BMIMOAc con potencia de ultrasonido de 100W, frecuencia de 20–50 kHz, tiempo de residencia de 30 min y temperatura de 80 °C	Bagazo y paja de trigo Residuo de café	Yu <i>et al.</i> (2018) [204] Ravindran <i>et al.</i> (2017) [155]
Explosión con fibra de amoníaco (AFEX)	Tratamiento con amoníaco líquido anhidro (1:1 p/p), temperaturas moderadas (60-170 °C), presiones altas (15–30 bar) y un corto tiempo (5–60 min)	Paja de trigo Bagazo de caña Rastrojo de maíz	Bals <i>et al.</i> (2010) [21]
Explosión con CO ₂ supercrítico	Es una explosión de vapor modificada que involucra CO ₂ en lugar de aire atmosférico	Rastrojo de maíz	Narayanaswamy <i>et al.</i> (2011) [132]
Explosión con SO ₂	Explosión usando SO ₂ con concentración entre 1-4%, con temperaturas entre 150-230 °C y tiempo de tratamiento de 10-20 minutos	Pino Abeto	Söderström <i>et al.</i> (2002) [183]
Oxidación húmeda	Basado en altas presiones y temperaturas en condiciones acuosas, emplea agentes oxidantes que dan como resultado radicales hidroxilo que atacan la lignina y los carbohidratos	Trebol, Hierba de centeno	Martín <i>et al.</i> (2008) [119]

LHW: "liquid hot water"; AFEX: "Ammonia fiber explosion"; BMIMCl: Cloruro 1-Butil-3-metilimidazolio;

BMIMOAc: Acetato 1-Butil-3-metilimidazolio

2.6.4. Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos son medioambientalmente más sostenibles que el resto de pretratamientos, ya que requieren poca cantidad de energía y no generan compuestos tóxicos. Implican el uso de microorganismos como los hongos de la podredumbre blanca, parda o blanda, que son capaces de degradar la lignina y la hemicelulosa, Sun y Cheng (2002) [187].

Estos métodos, sin embargo, presentan como inconveniente su lento desarrollo, principal factor limitante a la hora de su aplicación a nivel industrial, Talebnia *et al.* (2010) [190].

La mayor eficiencia en el proceso de degradación de lignina de la biomasa lignocelulósica mediante la acción de enzimas ligno-degradantes, como peroxidasas y lacasas, la presentan los hongos de la podredumbre blanca, Kumar *et al.* (2009) [96]. Se ha estudiado la eficiencia de estos microorganismos en diferentes tipos de biomasa como son la paja de arroz, la madera de pino, el bambú o el rastrojo de maíz, destacando algunos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyanthus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* que muestran altas eficiencias deslignificadoras, Shi *et al.* (2008) [176]; Kumar *et al.* (2009) [96]; Alvira *et al.* (2010) [14].

2.7. Hidrólisis

2.7.1. El proceso hidrolítico. Tipos de hidrólisis

En general, un proceso de hidrólisis conlleva la conversión de polímeros de celulosa y hemicelulosa a sus monómeros. Tras este tratamiento la celulosa que se libera puede degradarse hasta glucosa (sacarificación).

La hidrólisis de materiales lignocelulósicos intenta romper de forma selectiva las hemicelulosas para obtener azúcares simples o bien oligómeros, Garrote *et al.* (2004) [72].

Existen principalmente dos tipos de hidrólisis, la hidrólisis ácida, mediada por el uso de ácidos concentrados o diluidos y la hidrólisis enzimática, donde se utilizan enzimas específicas, celulasas y hemicelulasas. Ya sean de un tipo u otro los principales factores que condicionan los procesos hidrolíticos son: la composición y porosidad de la biomasa lignocelulósica a tratar y la cristalinidad del homopolímero que la constituye, Sun y Cheng (2002) [187], García-Aparicio *et al.* (2007) [70].

Los primeros trabajos encontrados en bibliografía están relacionados con la producción de etanol vía hidrólisis ácida y datan de principios del siglo XX, mientras que la vía enzimática es relativamente reciente: último tercio del siglo pasado, García (2007) [68].

Sean de un tipo u otro, en aquellos procesos que suponen una acción hidrolítica mayor sobre el residuo, el grado de severidad del tratamiento empleado juega un papel muy importante. La severidad será un parámetro a tener en cuenta en los procesos desarrollados en este estudio, puesto que varios autores como Mateo (2011) [121] o Puentes (2020) [149], indican que en grados bajos de la misma se obtienen rendimientos globales de azúcares bajos, mientras que si son demasiado elevados se pueden generar productos inhibidores para una fermentación posterior.

2.7.1.1. Hidrólisis ácida

El proceso de hidrólisis ácida englobaría la secuencia de mecanismos de rotura de enlaces moleculares mediante un agente químico (un ácido). En el caso de los polímeros contenidos en los materiales lignocelulósicos, esta hidrólisis es un proceso complejo, consistente en el fraccionamiento de los materiales que integran el sustrato a través de la acción del agente hidrolítico, Puentes (2020) [149].

La concentración de ácido usada determinará si se trata de una hidrólisis con ácido concentrado (30-70%) o con ácido diluido (inferiores al 2%), existiendo en ambos casos ventajas e inconvenientes, Mateo (2011) [121].

En las hidrólisis con ácido concentrado los rendimientos en azúcares son mayores (superiores al 90% de la glucosa potencial), se minimiza la formación de inhibidores y el consumo de energía es menor por tratarse de tratamientos a baja temperatura. Sin embargo, este tipo de hidrólisis lleva asociados grandes problemas de corrosión de equipos, consumo elevado de ácidos y necesidad de una etapa costosa de neutralización posterior.

En el caso de la hidrólisis con ácido diluido existe un bajo consumo de reactivos, tiempos de residencia cortos y menores problemas de corrosión, lo que economiza enormemente el proceso, consiguiendo rendimientos cercanos al 60%. El consumo energético relacionado con el calentamiento de los equipos es algo mayor al tratarse de tratamientos temperaturas más elevadas, Taherzadeh y Karimi (2007) [188], sin embargo, las ventajas que presentan estos tratamientos superan a este inconveniente. Este tipo de hidrólisis será la seleccionada en los ensayos realizados en el presente trabajo de investigación.

2.7.1.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica implica la acción secuencial de un grupo de enzimas, conocidas como celulasas y hemicelulasas, que pertenecen a la familia de las glicosil-hidrolasas, llamadas así porque catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos, con el fin de romper los polisacáridos en sus azúcares monoméricos correspondientes, que serán fermentados con posterioridad, Gutiérrez-Rojas *et al.* (2015) [76].

Generalmente son procesos cuyas condiciones de operación se encuentran en el rango de temperatura (45-50 °C) y pH óptimo de trabajo de las enzimas situado entre 4 y 5, Bellido (2013) [24].

Las enzimas implicadas en la degradación del material lignocelulósico son producidas principalmente por microorganismos como bacterias y hongos. A pesar de que en la naturaleza existe un vasto espectro de microorganismos productores de enzimas celulolíticas, la investigación se ha centrado en algunos hongos, tales como *Trichoderma reesei*, y algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, debido fundamentalmente a su capacidad para producir enzimas en grandes cantidades y de forma extracelular, lo que favorece su separación en los medios de cultivo, y algunas bacterias anaerobias como *Cellulomonas* y *Streptomyces*, Alani *et al.* (2008) [11]; Takeuchi *et al.* (2017) [189].

Las celulasas, en función de su actividad enzimática, pueden ser clasificadas en tres grandes grupos: *endo-β-glucanasas*, que actúan hidrolizando las regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, causando un acortamiento de las cadenas de celulosa; *exo-β-glucanasas* (celobiohidrolasas), que actúan sobre los extremos de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa y *β-glucosidasas*, encargadas de hidrolizar una molécula de celobiosa para liberar dos moléculas de glucosa y de este modo evitar que la celobiosa actúe de forma inhibitoria sobre los otros dos tipos de celulasas, Lynd *et al.* (2002) [114].

La mayoría de los microorganismos productores de celulasas también son productores, aunque en menor grado, de hemicelulasas, también denominadas enzimas xilanolíticas. Sin embargo, existen microorganismos que las producen en mayor cantidad, tales como: *Escherichia coli*, *Pichia stipitis*, *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacter mathranii*, Tomás *et al.* (2013) [193].

Las hemicelulasas incluyen un mayor número de grupos de enzimas que las celulasas, debido a la heterogeneidad estructural del polímero, incluyendo actividades específicas para cada tipo de enlace. De acuerdo a sus propiedades catalíticas se agrupan en glucosilhidrolasas, que hidrolizan enlaces glucosídicos, y estearasas, encargadas de la hidrólisis de los enlaces tipo éster.

La etapa de hidrólisis enzimática resulta un proceso limitante en la obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, debido al alto coste de los complejos enzimáticos. Se trata de una fase influenciada por factores referentes a la materia prima, su pretratamiento y a las propias enzimas, dentro de los cuales se encuentran el uso de complejos enzimáticos adecuadamente combinados, el índice de cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, el área superficial disponible, el contenido y distribución de lignina, el contenido en hemicelulosa, el tamaño de partícula y la porosidad, Alvira *et al.* (2010) [14].

2.7.2. Variables de operación en los procesos de hidrólisis ácida

En la hidrólisis ácida existen 3 variables de operación fundamentales encargadas del control del proceso y cuyos valores resultan determinantes en la obtención de resultados: concentración y tipo de ácido, temperatura y tiempo de tratamiento, además de las acciones sinérgicas que entre ellas pueden surgir.

En cuanto al ácido usado, en este tipo de hidrólisis se emplean diversos tipos, como fórmico, sulfuroso, fosfórico, nítrico, clorhídrico y sulfúrico, siendo los dos últimos los que se han usado a escala industrial debido a su bajo coste y su menor toxicidad, Galbe y Zacchi (2007) [67].

En la actualidad, la búsqueda de mayores ventajas está haciendo a los investigadores trabajar con otros ácidos menos comunes como es el caso del ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$), el más simple de los ácidos dicarboxílicos alifáticos, un ácido orgánico saturado, de cadena normal y muy fuerte que se produce en estado natural en forma de oxalato de potasio o de oxalato de calcio en las raíces y rizomas de muchas plantas, como la acedera, el ruibarbo, la remolacha y las plantas de la familia *Oxalis*.

Como se ha expuesto en apartados anteriores, la concentración de ácido determinará si se trata de una hidrólisis ácida con ácido concentrado o diluido. Debido a las limitaciones por el coste de reactivos y los problemas de corrosión asociados, la investigación actual se centra en tratamientos a bajas concentraciones de ácido (por debajo del 2%). Dentro de las hidrólisis con ácido diluido, la concentración a usar variará en función del tipo de biomasa y de los objetivos marcados, dependiendo además del monosacárido que quiera degradarse principalmente; así, por ejemplo, se ha demostrado mayor susceptibilidad a la degradación de D-xilosa frente a D-glucosa o L-arabinosa en diferentes concentraciones crecientes de ácido clorhídrico, Domínguez *et al.* (1997) [59].

En relación a la variable temperatura, la importancia de su control radica en la facilidad que presentan los azúcares a la descomposición con altos valores de la misma. De la misma forma se ha estudiado que con temperaturas altas se generan compuestos tóxicos que pueden afectar negativamente al proceso fermentativo posterior, como son: furfural, 5-hidroximetil-2-furfuraldehído, ácido acético o ácido fórmico, entre otros, aspecto que se tratará con mayor profundidad en los apartados sucesivos.

En este sentido, cabe señalar que el empleo de una hidrólisis con ácido diluido conlleva generalmente la necesidad de realizar un pretratamiento al material de partida o un tratamiento de detoxificación del hidrolizado resultante con objeto de reducir o eliminar estos compuestos inhibidores.

El tiempo de tratamiento o tiempo de residencia en el reactor en las hidrólisis ácidas suele oscilar entre 20-180 minutos, aunque existen excepciones como las investigaciones con paja de trigo llevadas a cabo por Nigam (2001) [134], con tiempos de 18 horas o las de Kumar *et al.* (2009) [96] con jacinto de agua con 7 horas de tratamiento hidrolítico. De forma general en los trabajos de investigación suelen asignarse distintos intervalos de tiempo con el fin de estudiar su influencia, determinando finalmente las condiciones óptimas del mismo en función de los resultados obtenidos.

A escala industrial, debido a cuestiones económicas, priman los tiempos de residencia cortos, Moya (1997) [127].

En el caso concreto de la hidrólisis ácida llevada a cabo sobre biomasa de poda de olivo existen diversos trabajos de investigación, Tabla 2.8.

Tabla 2.8. Estudios de variables de operación en la hidrólisis ácida sobre poda de olivo

Variables de operación				Referencia
Ácido	Concentración	Temperatura	Tiempo	
H ₂ SO ₄	0,5 - 3 %	100-140 °C	30 - 90 min	Yildirim <i>et al.</i> (2022)[203]
H ₂ SO ₄	1- 3 %	121 °C	60 - 120 min	Fonseca <i>et al.</i> (2020) [64]
H ₂ SO ₄	0,9 %	164 °C	10 min	Fernandes-Klajn <i>et al.</i> (2018) [62]
H ₂ SO ₄	2 %	100 °C	150 min	Moya <i>et al.</i> (2016a) [129]
HCl	0,37 – 5,74 %	90 °C	180 min	Mateo <i>et al.</i> (2015) [125]
H ₂ SO ₄	1 - 2 %	100 – 120 °C	30 - 90 min	Mateo <i>et al.</i> (2014) [124]
H ₂ SO ₄	0,2 – 1,8 %	86 - 103 °C	20 - 220 min	Puentes <i>et al.</i> (2013) [150]
H ₂ SO ₄	0,00 – 0,05 M	180 – 230 °C	0 - 30 min	Mateo <i>et al.</i> (2013b)[123]
H ₂ SO ₄	0 – 32 %	60 - 90 °C	0 - 240 min	Romero <i>et al.</i> (2010) [162]
HCl	0,1 – 1,0 N	90 °C	240 min	Moya <i>et al.</i> (2008) [128]
H ₂ SO ₄				
CF ₃ -COOH				

Teniendo en cuenta los valores que toman las variables de estudio en estos trabajos de investigación y los resultados obtenidos en ellos, se determinará el rango de trabajo para las hidrólisis ácidas a realizar en la presente tesis doctoral.

2.7.3. Hidrolizado, fuente de azúcares e inhibidores

Los hidrolizados suponen una fuente de azúcares susceptibles de ser utilizados en procesos fermentativos, pero además de estos monosacáridos de alto interés para su conversión a bioproductos, durante la hidrólisis, al igual que durante los tratamientos previos a ella que se realizan sobre la biomasa lignocelulósica, se forman varios compuestos inhibidores, dentro de los que se incluyen algunos derivados de la degradación de dichos azúcares, que dificultan el proceso fermentativo posterior.

La clase y la concentración de compuestos inhibidores que se generan durante el proceso de hidrólisis y/o durante los pretratamientos dependen del tipo de biomasa (maderas duras, maderas blandas o residuos agrícolas, principalmente), del tratamiento llevado a cabo y de las condiciones del mismo (temperatura, pH, tiempo, concentración de compuesto usado, presión, naturaleza de los sólidos a tratar). Así, por ejemplo, en los hidrolizados que provienen de maderas duras existe una mayor concentración de furfural y acético, mientras que en maderas blandas aparecen pentosas y restos acetilados. De la misma forma, en los pretratamientos con ácidos a altas temperaturas y tiempos largos parece existir una mayor cantidad de inhibidores generados que en aquellos tratados en condiciones menos severas.

Los compuestos inhibidores se pueden dividir, según su naturaleza, en tres grupos principales: furaldehídos, ácidos alifáticos o carboxílicos y compuestos aromáticos. Su potencial tóxico no solo se debe al efecto individual que puede producir cada uno de ellos, sino que en ocasiones se ha observado un efecto sinérgico en la combinación de algunos de ellos, Jönsson *et al.* (2013) [86].

Entre los principales inhibidores encontramos:

- **Furaldehídos.** Son principalmente el furfural, producto de degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetil furfural (HMF), producto de degradación de las hexosas, celulosa mayoritariamente, Martín y Jönsson (2003) [118]. La problemática con estos compuestos surge debido a que pueden afectar de manera negativa a la fermentación de los microorganismos, inhibiendo el crecimiento celular y la velocidad de consumo de azúcar y por lo tanto la producción de etanol. Su alta toxicidad se debe a que inhiben la síntesis de macromoléculas y deterioran las membranas, produciendo daños sobre la membrana plasmática, el material genético y algunas proteínas, Kim (2018) [89].
- **Compuestos aromáticos.** Son compuestos fenólicos procedentes de la degradación de la lignina siendo el 4-hidroxibenzaldehído, la vainillina, el sinringaldehído, la acetosiringona, y los ácidos vainílico y sirínico los que se suelen encontrar en mayor medida, Klinke *et al.* (2002) [91].
- **Ácidos alifáticos.** Son, principalmente, el ácido acético, producido a partir de los restos acetilo de las hemicelulosas, y el ácido fórmico y levulínico, procedentes de la degradación del furfural y del HMF, Almeida *et al.* (2007) [12].

De todos los compuestos estudiados con anterioridad, ácido acético, furfural y HMF son los compuestos mayoritarios formados durante la hidrólisis de la poda de olivo.

Existe además un grupo de compuestos adicional (no incluidos en los tres grupos principales citados anteriormente) que se pueden liberar durante el tratamiento de la biomasa lignocelulósica, los denominados extractos. Entre ellos se encuentran diferentes tipos de resinas (ácidos grasos, terpenoides, esteroides y ceras) y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos, etc.). Estos compuestos también pueden actuar como inhibidores de los microorganismos empleados en la fermentación de los hidrolizados, Larsson *et al.* (2000) [102].

Los compuestos inhibidores pueden eliminarse por medio del uso de diferentes pretratamientos, el lavado, o mediante mecanismos de detoxificación como el carbonato cálcico o carbón activo en una gran variedad de materiales lignocelulósicos, Kuhad *et al.* (2010) [94]; Arslan y Eken-Saraçoglu (2010) [18]; Cantarella *et al.* (2004) [35]. También se puede realizar un proceso de adaptación a dichos compuestos tóxicos de tal forma que se cree un microorganismo altamente tolerante Yang *et al.* (2011) [202].

2.7.4. Detoxificación de hidrolizados

La concentración de inhibidores en el medio y la tolerancia a ellos que presente el microorganismo que se vaya a utilizar en la fermentación serán los factores que determinarán la necesidad de un proceso de detoxificación o no de los hidrolizados ácidos.

De forma general, se hace necesaria una etapa básica de acondicionamiento en la cual se adaptarán tanto el pH como la concentración de nutrientes a niveles que faciliten el inicio de la etapa fermentativa. En el caso de ser necesaria, además, una etapa extra de tratamiento de detoxificación, propiamente dicho, el método escogido dependerá del tipo de inhibidores presentes.

La aplicación de métodos de detoxificación va normalmente acompañada de la utilización de equipamiento y productos químicos, lo que produce un aumento en el coste del proceso. Además, muchas veces se generan residuos y algunas técnicas disminuyen la concentración de azúcares simples.

Los métodos de detoxificación pueden clasificarse en métodos biológicos, físicos y químicos; los principales procesos de cada tipo se recogen en las Tablas 2.9., 2.10. y 2.11. respectivamente.

Tabla 2.9. Métodos biológicos de detoxificación de hidrolizados

Proceso	Inhibidores reducidos/eliminados	Biomasa	Referencias
Tratamiento enzimas y microorganismos	Ácidos aromáticos/alifáticos y furanos	Paja de arroz, Poda de olivo	Fonseca <i>et al.</i> (2013) [65]
Modificación genética	Potenciación de la resistencia	-	Petersson <i>et al.</i> (2006) [146], Liu <i>et al.</i> (2008) [111]
Adaptación	Aumento en la disponibilidad de diferentes cepas de levaduras	-	Liu <i>et al.</i> , (2005) [112], Linde <i>et al.</i> , (2008) [107]

Tabla 2.10. Métodos físicos de detoxificación de hidrolizados

Proceso	Inhibidores reducidos/eliminados	Biomasa	Referencias
Evaporación a vacío	Furfural HMF, ácido acético y compuestos volátiles	Paja de maíz	Zhang <i>et al.</i> (2015) [210]
Extracción disolventes orgánicos	con Ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico, furfural, HMF y derivados del ácido hidroxibenzoico	Madera de Eucalipto	Parajó <i>et al.</i> (1997) [140], Mateo <i>et al.</i> (2013a) [122]
Adsorción con carbón activo	Furfural, HMF, compuestos fenólicos totales y ácido acético	Maíz Poda de olivo	Xu <i>et al.</i> (2023) [201] Mateo <i>et al.</i> (2013a) [122]

Tabla 2.11. Métodos químicos de detoxificación de hidrolizados

Proceso	Inhibidores reducidos/eliminados	Biomasa	Referencias
Neutralización	Metales pesados, furfural, HMF, ácido acético, levulínico y fórmico, taninos, terpenos y CFT	Maderas duras, residuos agrícolas	Parajó <i>et al.</i> (1998) [141]
Agentes reductores	Furfural, HMF, p-benzoquinona, 2,6-dimetoxibenzoquinona	Abeto Bagazo de caña	Alriksson <i>et al.</i> (2011) [13] Cavka y Jönsson (2013) [40]
Overliming	Ácidos alifáticos, CFT e iones metálicos	Bagazo de caña, Poda de olivo	Nouri <i>et al.</i> , (2020) [136] Mateo <i>et al.</i> , (2013a) [122]
Intercambio iónico	Ácidos alifáticos, CFT y furanos	Maíz, Bagazo de caña	Kumar <i>et al.</i> , (2019) [98] Viñals <i>et al.</i> , (2006) [198] Solenzal <i>et al.</i> , (2006) [184]
Alcalinización	Ácidos, CFT, iones metálicos, furfural e HMF	Maderas duras, residuos agrícolas	Parajó <i>et al.</i> (1998) [141] García-Torreiro <i>et al.</i> (2016) [71]
Liming	Ácidos alifáticos, CFT e iones metálicos	Poda de olivo	Mateo <i>et al.</i> , (2013a) [122]
Plasma frío atmosférico	Ácido fórmico, ácido acético, furfural e HMF	Bagazo de caña	Lin <i>et al.</i> , (2020) [106]

CFT: compuestos fenólicos totales

2.7.4.1. Detoxificación mediante agentes reductores

La detoxificación mediante agentes reductores es un tratamiento posterior a la hidrólisis donde se utilizan compuestos como el ditionito de hidrógeno, sulfito de hidrógeno, ditionito de sodio, sulfito de sodio y borohidruro de sodio, Cavka *et al.* (2011) [39].

Se trata de un procedimiento sencillo de adición de los mencionados agentes sobre los hidrolizados antes de la fase de fermentación, que tiene como fin la reducción y /o eliminación de compuestos inhibidores para los microorganismos. En concreto se ha encontrado influencia sobre la concentración de compuestos como Furfural, HMF, p-benzoquinona, 2,6-dimetoxibenzoquinona.

Algunas investigaciones han demostrado efectos positivos en el crecimiento y la fermentación con microorganismos como *Echerichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*, cuando los hidrolizados lignocelulósicos de bagazo de caña o abeto son tratados con compuestos reductores de azufre y sodio, Nieves *et al.* (2011) [133], Cavka y Jönsson (2013) [40]. En el caso concreto del borohidruro de sodio sobre madera de abeto se obtuvieron mejoras tanto en el rendimiento como en la productividad de etanol de 0,02 a 0,030 g/g y de 0,05 a 0,57 g/(dm³ h), respectivamente.

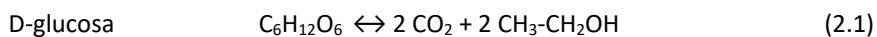
2.8. Fermentación

2.8.1. Consideraciones generales

De forma genérica, el término de fermentación se define como un proceso de transformación de un compuesto orgánico o inorgánico (sustrato) por la acción de enzimas que se encuentren en las células (in vivo) o aisladas de las mismas (in vitro), Camacho *et al.* (1986) [34]. Para la fermentación de compuestos orgánicos los microorganismos requieren un medio de cultivo adecuado, en el cual crecen, se reproducen, consumen los sustratos y producen, como consecuencia de su metabolismo, ácidos orgánicos, cetonas, alcoholes, antibióticos, enzimas, vitaminas, aminoácidos y esteroides, Moya (1997) [127]. Los microorganismos de mayor importancia en este proceso serían bacterias, hongos, levaduras (hongos unicelulares) y microalgas.

En el ámbito de la investigación donde se desarrolla esta tesis doctoral, la fermentación a la que se hace referencia es aquella llevada a cabo sobre hidrolizados derivados de biomasa lignocelulósica, con el fin de transformar los azúcares monoméricos obtenidos a partir de celulosa y hemicelulosa (hexosas y pentosas) a etanol, gracias a la acción de microorganismos.

La fermentación supondría una última etapa del proceso de conversión de biomasa en etanol antes de la separación final del producto, realizada generalmente por destilación. Esta transformación se lleva a cabo según las reacciones químicas 2.1 y 2.2.



A partir de estas ecuaciones puede calcularse un rendimiento teórico máximo de 0,511 gramos de etanol por gramo de azúcar, partiendo tanto de hexosas como de pentosas, Amin *et al.* (1983) [15].

En la práctica es muy difícil alcanzar este valor, ya que los microorganismos invierten cierta parte de los azúcares consumidos en su propio metabolismo celular, crecimiento y reproducción, así como en la producción de otros metabolitos secundarios como glicerol, ácido acético o ácido láctico. No obstante, algunos autores indican que en ocasiones se han dado rendimientos por encima de este valor teórico, sería el escenario excepcional que acontece cuando bajo hidrólisis y sacarificación simultáneas la levadura *P. stipitis* libera β -glucosidasa, que acelera la producción de etanol, Lee y Jeffries (2011) [104].

2.8.2. Factores condicionantes del proceso fermentativo

La conversión biotecnológica de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol por un proceso fermentativo dependerá, de forma general, de una serie de factores entre los que se pueden considerar como importantes:

2.8.2.1. Tipo y concentración del microorganismo

A la hora de seleccionar un microorganismo para la fermentación será importante estudiar la especie y cepa de trabajo en función de las condiciones que presente el hidrolizado de partida y los objetivos de producción propuestos, como puede verse con mayor profundidad en el apartado 2.8.3.

Una vez seleccionado, se deberá tener en cuenta que tanto la edad como la concentración del inóculo juegan un papel importante en relación a la actividad metabólica y la viabilidad de las células, Du Preez (1994) [60].

En este sentido deberán identificarse las distintas etapas del crecimiento celular y su duración específica para cada levadura, diferenciando principalmente:

- Fase de adaptación y aclimatación al medio (fase lag)
- Fase de crecimiento exponencial, con rápido crecimiento y desprendimiento de gran cantidad de CO₂
- Fase estacionaria o de crecimiento nulo, donde la escasa multiplicación celular hace disminuir mucho la velocidad de producción, mientras que la mortalidad aumenta debido a la limitación de nutrientes y la presencia de sustancias inhibidoras
- Fase final, donde debido al agotamiento de recursos la mortalidad es elevada

De forma general, diferentes investigaciones afirman mejores resultados para ensayos llevados a cabo en concentraciones iniciales de inóculo por encima de 3 g/dm³, incubados previamente durante 12-24 horas, Mateo (2011) [121], Agbogbo *et al.* (2007) [3], Roberto *et al.* (1995) [158], Roberto *et al.* (1991) [157].

2.8.2.2. Composición del sustrato: carbono, nitrógeno y compuestos inhibidores

En la etapa fermentativa, el medio de cultivo puede ser sintetizado (de composición homogénea y conocida) o proceder de material biomásico de diferente origen, (heterogéneo y de composición compleja), siendo este último el más frecuente a escala industrial. Será necesario conocer los constituyentes del medio de cultivo asegurando un sustrato que contenga una fuente de carbono y nitrógeno suficientemente rica, asequible para las células y con cantidades equilibradas de oligoelementos y sales minerales básicas.

En cuanto al carbono, se diferenciarán microorganismos capaces de consumir hexosas, como es el caso de las levaduras convencionales, y aquellos capaces además de consumir pentosas. Cuando existe mezcla de ambos azúcares en el medio se pueden diferenciar dos tipos de levaduras, las que consumen de forma simultánea ambos azúcares, como es el caso de *Candida guilliermondii* o *Candida spp.*, o las especies con comportamiento diaxíco, como

Pichia stipitis o *Pachysolen tannophilus*, que agota en primer lugar la D-glucosa (principalmente en su propio crecimiento) y de forma posterior D-xilosa y D-xilobiosa, Mateo (2011) [121].

Las fuentes de nitrógeno, necesario como componente de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular, incluyen por su parte, el N₂ atmosférico, compuestos inorgánicos (nitratos, nitritos y sales de amonio) y compuestos orgánicos (urea, aminoácidos, extracto de levadura y peptona). En función del tipo de hidrolizado lignocelulósico a fermentar y la cepa seleccionada existen diversos estudios que defienden un tipo u otro de fuente de nitrógeno, obteniendo en general mejores resultados para *P. tannophilus* y *P. stipitis* con fuentes de nitrógeno orgánicas, como aminoácidos, Slininger *et al.* (2006) [181] o extracto de levadura, urea y peptona, Agbogbo *et al.* (2006) [2], Silva *et al.* (2012) [178].

Además de la concentración de nutrientes, un factor determinante en la fermentación será la presencia de compuestos inhibidores, producto de la degradación de la biomasa al someterla a diferentes tratamientos y pretratamientos. Estudiados con mayor profundidad en el apartado 2.7.3. de la presente tesis doctoral, los principales inhibidores se pueden clasificar según la Figura 2.9.

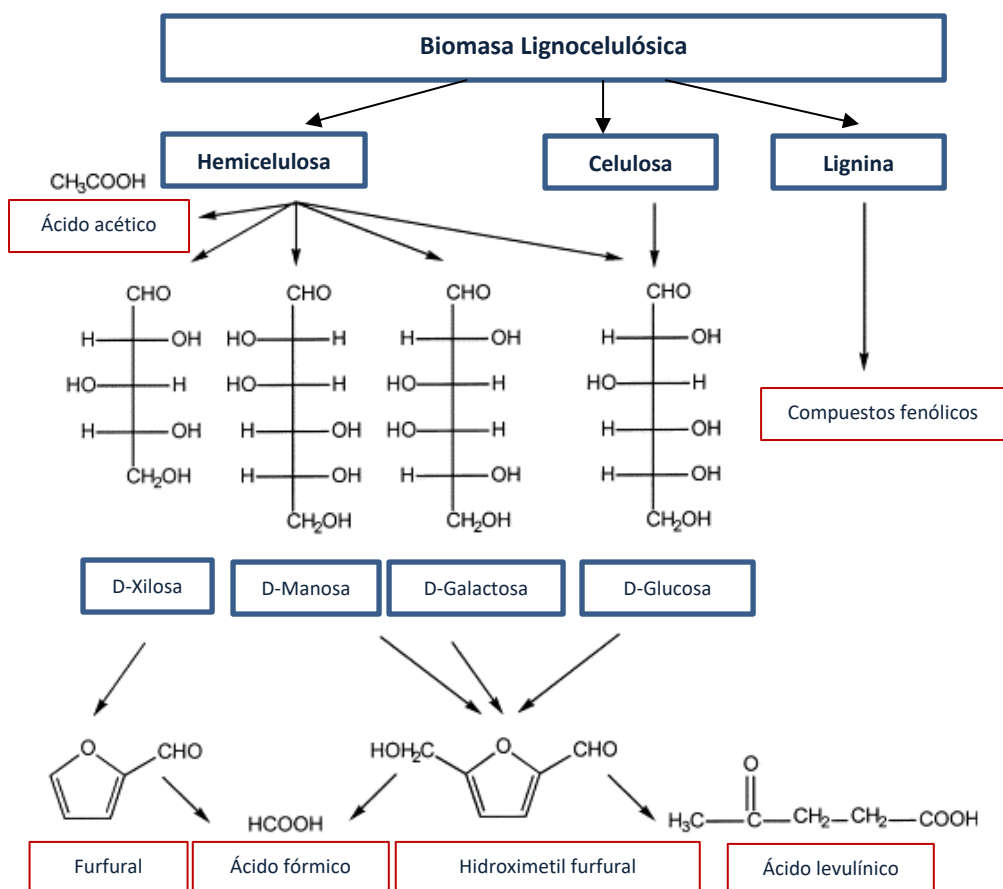


Fig. 2.9. Principales inhibidores generados a partir de la degradación de biomasa lignocelulósica, adaptado de Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000) [139]

Estos inhibidores afectarán en el rendimiento de etanol obtenido reduciéndolo o inhibiéndolo por completo de acuerdo a su concentración y al nivel de tolerancia de cada microorganismo.

El ácido acético es, de forma general, reductor/inhibidor del proceso fermentativo con levaduras para concentraciones entre 0,5 y 9 g/dm³, Parajó *et al.*, (1997) [140], siendo en el caso de *Pichia stipitis* completamente inhibitorio para concentraciones de 3,5 g/dm³, Bellido *et al.*, (2011) [25]. Los mismos autores establecen que, en relación al furfural e hidroximetil

furfural, el primero de ellos produce retraso en las tasas de consumo de azúcares, mientras que el segundo por sí solo no ejerce efectos significativos, sin embargo, se deberá tener en cuenta el efecto sinérgico que tiene lugar con la presencia de los tres tipos de inhibidores mencionados sobre *P. stipitis*. Otros autores como Roberto *et al.* (1991) [157] establecen que es a partir de 1,0 g/dm³, cuando el furfural comienza su actividad inhibitoria según los estudios realizados con *P. stipitis* CBS 5773, Peña (2008) [144] y que en concentraciones inferiores a 0,5 g/dm³, este aldehído supone una fuente de carbono para el crecimiento de la levadura.

Respecto a la inhibición en el crecimiento de las levaduras y en su actividad fermentativa a causa de otros compuestos mencionar que, en el caso del etanol, algunos estudios indican que en concentraciones inferiores a 18 g/dm³ el efecto inhibitor es bajo para levaduras como *Pachysolen tannophilus*, resultando más tóxico el generado por las propias levaduras que el que se encuentra en el medio de fermentación, Lee (1997) [103].

2.8.2.3. Condiciones de operación: pH, temperatura y aeración

El **pH** es un parámetro crítico en el cultivo de los microorganismos debido a su incidencia en el crecimiento de los mismos dentro de umbrales estrechos, con predominancia de un punto óptimo situado entre 5 y 9 para la mayoría de ellos.

Para los casos de levaduras como *Pichia stipitis* o *Pachysolen tannophilus* se establecen rangos óptimos de pH de 5,5 a 6,0, Fonseca *et al.* (2013) [65], Silva *et al.* (2012) [178], Scordia *et al.* (2011) [173], Agbogbo *et al.* (2006) [2] y 4,0 a 5,0, Roebuck *et al.* (1995) [161], Debus *et al.* (1983) [56] respectivamente.

Por otra parte, la **temperatura** es un parámetro fundamental debido al carácter mesófilo de la mayoría de levaduras empleadas en la fermentación de biomasa lignocelulósica, lo que hace que el rango de trabajo se sitúe en una franja de entre 15 °C y 35 °C, aunque los valores óptimos dependerán de la cepa concreta de levadura, del medio de cultivo que se utilice, Du Preez (1994) [60], y de la preferencia en la obtención de etanol o xilitol.

Algunos autores indican que la temperatura óptima para obtener los mayores rendimientos en etanol es superior a la necesaria para alcanzar los máximos en xilitol, Sánchez *et al.* (2004) [168].

A modo de ejemplo, en el caso de *Pachysolen tannophilus*, estudios demuestran que en rangos de temperatura entre 25 y 30 °C más del 80% de la xilosa presente en hidrolizados hemicelulósicos es transformada en xilitol, mientras que si dicha temperatura desciende de los 20 °C solo es consumido el 20% de la misma, Converti *et al.* (2001) [51], considerándose óptimo el valor de 32 °C en condiciones aeróbicas, Slininger *et al.* (1987) [180].

La **aeración** es un factor influyente en el metabolismo de los microorganismos ya que en condiciones aerobias, donde el oxígeno está en exceso, los azúcares son consumidos por vía oxidativa e invertidos únicamente en el crecimiento celular, mientras que cuando la presencia de oxígeno se restringe el consumo se realiza por vía fermentativa, obteniendo etanol y/o xilitol como productos, teoría que corroboran los ensayos con *Pachysolen tannophilus* llevados a cabo por Kruse y Schügerl (1996) [93] donde los mejores resultados fueron obtenidos con condiciones microaeróbicas.

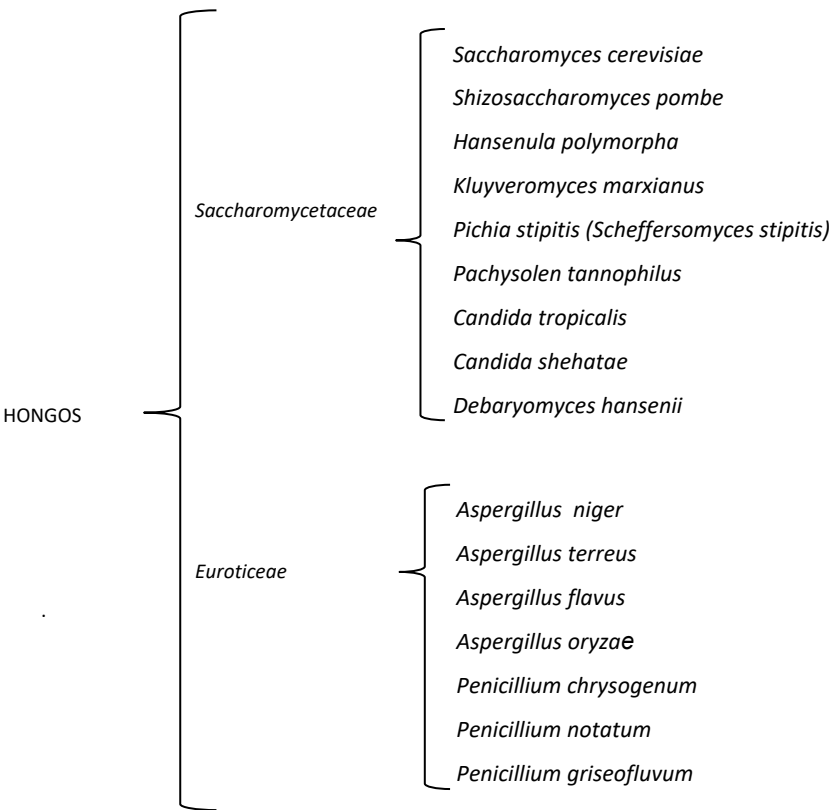
Situaciones parecidas ocurren en las fermentaciones de paja de arroz con *P. stipitis*, Silva *et al.* (2010) [177], o en medio sintético, Unrean y Nguyen (2012) [196], donde los rendimientos en etanol se incrementan cuando se reduce el caudal de oxígeno.

2.8.3. Microorganismos productores

Los microorganismos más utilizados en la etapa de fermentación se distribuyen, principalmente, en: algas, bacterias, hongos y levaduras (hongos unicelulares). Entre las bacterias de mayor interés industrial se encuentran las pertenecientes a las órdenes: Eubacteriales, Pseudomonales y Actinomycetales, Moya (1997) [127]. Aunque son los hongos y levaduras los microorganismos más estudiados por su alta eficiencia fermentativa, Ping *et al.* (2013) [148].

La Tabla 2.12. recoge los principales hongos y levaduras de la clase Ascomycetes utilizados en la industria, Mateo (2011) [121].

Tabla 2.12. Principales hongos y levaduras de interés industrial en procesos de fermentación



Con el objetivo de aumentar la eficiencia del proceso de producción de etanol y hacerlo económicamente viable, las cualidades que debe cumplir un microorganismo para considerarse apropiado son las siguientes, Sarkar *et al.* (2012) [172]:

- ser capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos
- tener elevados rendimientos de etanol y productividad
- ser capaz de soportar elevadas concentraciones de etanol y altas temperaturas
- ser tolerante a los inhibidores presentes en los hidrolizados
- tener actividad celulolítica

Estos requisitos convierten a las levaduras en el microorganismo más usado para la producción de etanol a nivel comercial debido a ciertas propiedades que las hacen adecuadas. Entre ellas, tasas de crecimiento rápido, producción eficiente de etanol y alta tolerancia a diferentes factores ambientales de estrés como son las altas concentraciones de etanol y los bajos niveles de oxígeno, Binod *et al.* (2013) [28].

Con el término levadura se alude a un conjunto de organismos unicelulares que se multiplican por fisión; se incluyen las verdaderas levaduras esporógenas (Ascomycetes), las levaduras asporógenas (hongos imperfectos) y algunos hongos dimórficos que adoptan formas de levadura bajo ciertas condiciones, Collins (1969) [49].

La mayoría de levaduras tradicionales en estudio se caracterizan por la capacidad de obtener etanol mediante la glucólisis a partir del consumo de hexosas, siendo incapaces de consumir las pentosas, desaprovechando así gran parte de los azúcares liberados en los procesos de aprovechamiento de la biomasa.

Para hacer económicamente viable la conversión de biomasa lignocelulósica a etanol son necesarios microorganismos que sean capaces de fermentar azúcares como la xilosa, galactosa, arabinosa y manosa, es decir, se debe incluir el aprovechamiento de las

hemicelulosas, formadas principalmente por pentosas, aumentando la recuperación de azúcares de la biomasa inicial, Gírio *et al.* (2010) [74].

Existen en la naturaleza microorganismos capaces de fermentar hexosas y pentosas como *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* o *Kluyveromyces marxianus*, Arora *et al.* (2015) [17]. Además, en los últimos años se han llevado a cabo estudios con organismos modificados genéticamente, como es el caso de *S. cerevisiae*, a los que se les introducen genes de microorganismos capaces de fermentar pentosas como *Pichia stipitis*, empleando estas cepas modificadas en procesos de producción de etanol a partir de diferentes materiales lignocelulósicos, Öhgren *et al.* (2006) [138].

Metabólicamente las levaduras están constituidas por una compleja red integrada de reacciones bioquímicas y transformaciones enzimáticas intracelulares de las que dependen la formación y el mantenimiento de sus sistemas estructurales altamente organizados.

La función de este metabolismo es extraer la energía y el poder reductor del medio que rodea a la levadura y usarlos para sintetizar los constituyentes moleculares de su estructura.

Las rutas metabólicas a seguir dependerán del monosacárido de partida (D-glucosa o D-xilosa) y del producto que se pretenda obtener (etanol o xilitol). De esta forma, la fermentación de D-glucosa a etanol se desarrolla, principalmente, por medio de la glucólisis, bioproceso en el cual se obtienen dos moléculas de ATP (adenosín trifosfato) y dos de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) por cada molécula de D-glucosa invertida. Mientras que la fermentación de D-xilosa a xilitol o etanol sigue otra ruta metabólica que requiere la reducción de dicha molécula a xilitol por la enzima xilosa reductasa (liberada por las levaduras).

De entre toda la variedad de microorganismos han sido seleccionados para este trabajo *Pichia stipitis* y *Pachysolen tannophilus* pues la bibliografía las presenta como buenas productoras de etanol.

2.8.3.1. *Pichia stipitis*

Pichia stipitis es una levadura del género *Scheffersomyces*. Al igual que la mayoría de miembros del orden de los *Saccharomycetales*, tiene un tamaño de 3 a 5 μm de diámetro. Su forma habitual es esférica o elipsoidal.

Aislada por primera vez por Pignal en 1967, presenta una de las capacidades nativas más altas para la fermentación de D- xilosa, Jeffries *et al.* (2007) [83]. Cabe resaltar que Kurtzman y Suzuki (2010) [101], propusieron el cambio de género de esta levadura por *Scheffersomyces* tras realizar los pertinentes estudios filogenéticos. No obstante, en el presente trabajo se ha considerado usar la denominación tradicional.

Un hábitat adecuado para esta levadura incluye áreas húmedas ricas en biomasa orgánica; así, bosques de madera dura o zonas con alto contenido en residuos agrícolas son ambientes comunes.

El crecimiento de *P. stipitis* se produce en un rango de temperatura entre 25 °C y 37 °C, siendo 30 °C la temperatura óptima. El pH adecuado para su crecimiento se sitúa entre 5-6, Jeffries *et al.* (2007) [83].

La importancia de *P. stipitis* a nivel industrial proviene de su capacidad para fermentar D-xilosa y obtener buenos rendimientos de producción de etanol, con resultados que variarán entre 0,40-0,45 kg/kg, Agbogbo *et al.* (2006) [2], Saha (2003) [163].

2.8.3.2. *Pachysolen tannophilus*

Se trata de una levadura no tradicional, perteneciente a la familia *Scharomycetaceae*, que fue descubierta en 1957 por Boidin y Adzet a partir de licor de sulfito y aislada por primera vez por Wickerham en 1970.

Pachysolen ha sido descrita como la primera levadura identificada capaz de fermentar D-xilosa directamente a etanol.

Está formada por entre 7 y 8 cromosomas y es un microorganismo destacado en la fermentación de pentosas, aunque también tiene capacidad fermentadora de otros azúcares como D-glucosa, manosa, galactosa e incluso glicerol para producir etanol, Maleszka *et al.* (1982) [116]. En el caso de sustratos en los que exista mezcla de estos azúcares *Pachysolen* se caracteriza por un consumo secuencial de los mismos, agotando en primer lugar la D-glucosa con rapidez con un consumo de pentosas sucesivo a un ritmo mucho más lento, Moya *et al.* (2008) [128], aunque en algunas ocasiones puede darse un consumo simultáneo de los mismos.

Se sabe que la levadura *Pachysolen tannophilus*, provoca diferentes mecanismos de respuesta al estrés adaptativo en un esfuerzo por sobrevivir y prosperar en condiciones hostiles como son choques de temperatura y pH, estrés oxidativo; choque osmótico; y toxicidad de productos de fermentación, principalmente etanol.

En cuanto a los rendimientos totales obtenidos con esta levadura destacan los 0,39 kg/kg de etanol obtenidos por Sánchez *et al.* (2004) [168] o los 0,37 kg/kg de etanol obtenidos por Moya *et al.* (2008) [128].

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS



El principal fin que persigue este trabajo de investigación, relacionado con el uso de restos de biomasa de poda de olivo, es su aprovechamiento y valorización mediante la conversión bioquímica de las fracciones de celulosa y de hemicelulosa para la producción de bioalcoholes, evaluando cómo repercuten en dicho material diferentes tratamientos químicos propuestos a escala de laboratorio y comparando la eficacia fermentativa en los hidrolizados obtenidos de dos levaduras no tradicionales, consideradas como buenas productoras de etanol: *Pichia stipitis* y *Pachysolen tannophilus*.

Esta labor propuesta resulta de vital importancia, puesto que, en Andalucía, y más concretamente en la provincia de Jaén, la biomasa de poda de olivo es muy abundante y su eliminación tradicional por incineración supone un grave problema medioambiental.

Para alcanzar este objetivo general se han establecido una serie de objetivos específicos que se centran en el estudio de las condiciones experimentales más adecuadas, en cada una de las etapas de tratamiento planteadas, para obtener un ataque de la materia prima eficaz, la mayor cantidad de azúcares monoméricos posible y la menor cantidad de inhibidores en los hidrolizados ácidos, con el fin de mejorar los rendimientos en el proceso fermentativo.

Así, los objetivos específicos relacionados con la presente propuesta de trabajo, considerando como materia prima la biomasa de poda de olivo, se enumeran a continuación:

- Optimización de un pretratamiento de la biomasa de partida con hidróxido de sodio, para eliminar la mayor cantidad posible de grupos acetilo que forman parte de las hemicelulosas, de manera que se dificulte la presencia de ácido acético en los hidrolizados ácidos obtenidos en una etapa posterior
- Optimización de un pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre la biomasa de poda de olivo, previo a la hidrólisis ácida, para observar su influencia en la deslignificación de la biomasa de partida

- Optimización de un tratamiento de detoxificación con borohidruro sódico, previo al proceso fermentativo, para la posible reducción de inhibidores en los hidrolizados ácidos
- Estudio de la influencia de la variación de diversos parámetros de trabajo como pH, temperatura o concentración de ácido oxálico en diferentes procesos hidrolíticos
- Estudio de la fermentación de los hidrolizados ácidos obtenidos en condiciones optimizadas empleando dos levaduras no tradicionales capaces de fermentar pentosas
- Comparación de resultados fermentativos entre biomasa de poda de olivo sin tratar y biomasa de poda sobre la que se ha realizado alguno de los tratamientos planteados

CAPÍTULO 4

DESARROLLO EXPERIMENTAL



4.1. Reactivos

Los principales reactivos químicos utilizados durante el desarrollo de esta tesis doctoral fueron:

1. Ácido oxálico dihidratado, $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.A., Panreac
2. Ácido sulfúrico, (H_2SO_4) , 96%, P.A., Panreac
3. Ácido sulfúrico, (H_2SO_4) , 72%, P.A., Panreac
4. Agar-agar, PRS, Panreac
5. Agua ultrapura, resistividad 18,2 MΩ cm
6. Borohidruro de sodio (NaBH_4) , Panreac
7. L-Arabinosa, 99% $(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5)$, Sigma
8. Disolución tampón pH= 4,01, N° Cat. 23-110-02, Crison
9. Disolución tampón pH= 7,00, N° Cat. 23-111-02, Crison
10. Electrolito $(\text{KCl } 3\text{M} + \text{AgCl})$, N° Cat. 95-01, Crison
11. Etanol absoluto, $(\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2)$, PRS, Panreac
12. Extracto de levadura granulado, Merck
13. Extracto de malta, Merck
14. Fosfato diácido de potasio, (KH_2PO_4) , P.A., Panreac
15. D- glucosa anhidra, $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)$, P.A., Panreac
16. Hidróxido de Sodio, (NaOH) , 99%, P.A., Panreac
17. Peptona de caseína, granulada para microbiología, Merck
18. Peróxido de hidrógeno, (H_2O_2) , 33%, P.A., Panreac
19. D-xilosa anhidra, $(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5)$, PRS, Panreac

4.2. Instrumentos y Equipos

En este apartado se describen los equipos e instrumentos utilizados durante los distintos tratamientos físicos y químicos realizados a la biomasa de poda de olivo, a fin de estudiar alternativas que conduzcan a un mejor aprovechamiento de esta materia prima, con vistas a la obtención de bioproductos de alto valor añadido como el etanol, máxima de esta tesis doctoral.

Los citados equipos se encuentran localizados en las dependencias del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, ubicados tanto en el Campus de Jaén como en el Campus Científico Tecnológico de Linares, más en concreto en los espacios habilitados para el grupo de investigación Bioprocesos (TEP 138).

4.2.1. Molino y tamizadora

La poda de olivo fue recogida de la zona de cultivo seleccionada, cuya localización viene especificada en el apartado 4.4.2., y trasladada a las instalaciones de la Universidad de Jaén donde se procedió a la separación manual de los restos de hoja que aún quedaban, tras haber quitado la mayor parte en la zona donde fue recogida la biomasa. Dicha hoja quedará reservada para otros fines, mientras que la fracción leñosa se someterá a una serie de etapas de procesamiento, principalmente mecánico, tras las cuales se obtendrá un material de poda sin hoja, molturado, con un tamaño de partícula y una humedad determinados que constituirá la **biomasa de poda de olivo de partida o materia prima**, base de este trabajo de investigación, sobre la cual se realizarán todos los ensayos experimentales.

Tras la retirada de la hoja de la poda, el procesamiento del material biomásico restante consistió en la trituration y homogenización del mismo usando para ello un molino de cuchillas Retsch GmbH, modelo SM11. Seguidamente fue seleccionado el tamaño de partícula de trabajo entre 0,425 y 0,600 mm, mediante una tamizadora Retsch, modelo Vibro; ambos equipos se muestran en la Figura 4.1.

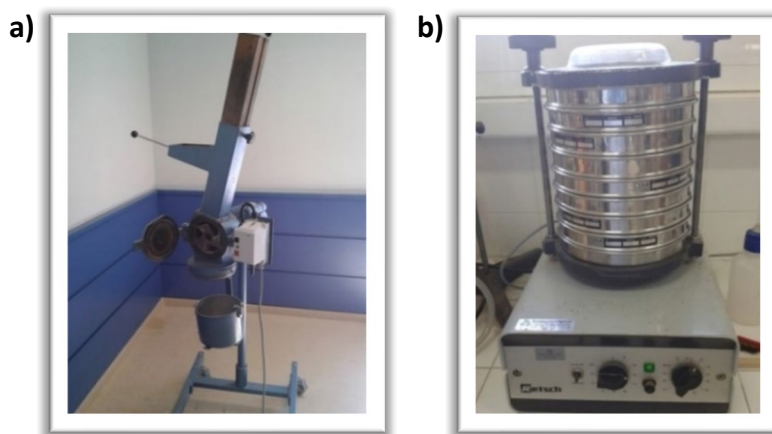
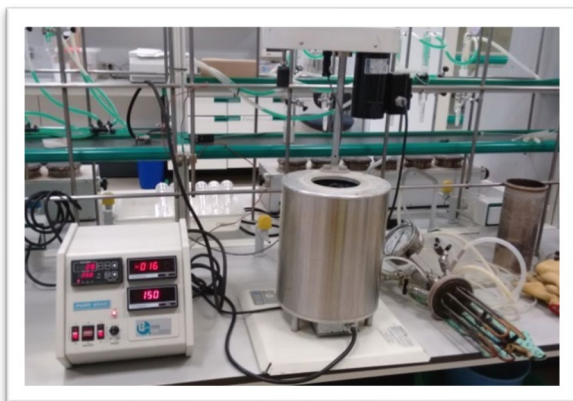


Fig. 4.1. a) Molino de cuchillas, b) Tamizadora

4.2.2. Reactor a presión

El proceso hidrolítico con ácido ha sido desarrollado en un reactor a presión discontinuo, tipo tanque agitado, de acero inoxidable, Parr modelo 4842 (Moline, IL, EE.UU.) que se muestra en la Figura 4.2. Dicho reactor permite trabajar a una presión máxima real de 1.370 psi (9.170 kPa), lo que equivale a unos 300 °C. Tiene una capacidad máxima de 2 dm³, aunque la carga nunca debe superar 1 dm³.

a)



b)



Fig. 4.2. Reactor a presión. a) Vista general del montaje, b) Cuerpo del reactor

Los elementos principales que componen el reactor son:

- Programador/ medidor de la temperatura de trabajo (controlador proporcional, integral y derivativo (PID), conectado a sonda digital) y velocidad de agitación (hasta un máximo de 750 rpm)
- Medidor de presión analógico de esfera
- Visualizador digital de temperatura de trabajo, velocidad de agitación y presión
- Cuerpo del reactor de acero inoxidable T316
- Camisa calefactora eléctrica controlada por un interruptor de doble posición
- Cabeza de agitación, modelo A1120HC
- Serpientes internos para el enfriamiento

- Válvula de descompresión y válvulas de entrada y salida de agua de refrigeración
- Válvulas de toma de muestra e inyección de gas

4.2.3. Agitador orbital

El pretratamiento con hidróxido de sodio sobre la biomasa de poda de olivo de partida, el tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio y los procesos fermentativos con levaduras, fueron realizados en un agitador orbital y de vaivén Rotabit modelo 30000974, con cámara de incubación acoplada Boxcult, Selecta, como se puede ver en la Figura 4.3.

Este dispositivo cuenta con una pantalla digital para temperaturas regulables de 5 °C hasta 60 °C, regulación de la velocidad desde 20 hasta 230 oscilaciones por minuto y del tiempo de funcionamiento, programable de 1 a 90 minutos o con la opción de trabajo en continuo. Amplitud de la oscilación ajustable a 15 ó 20 mm y capacidad de carga: hasta 30 kg.

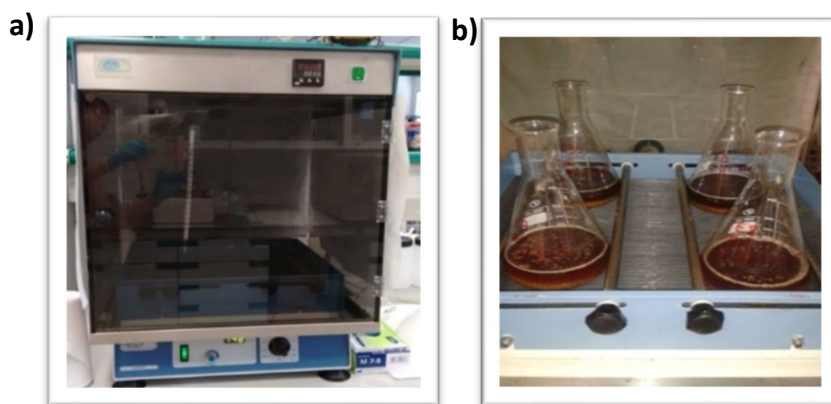


Fig. 4.3. Agitador orbital. a) Vista externa con la cámara de incubación. b) Detalle del interior

4.2.4. Baño termostatzado y placa agitadora

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno de la biomasa de poda de olivo de partida (sin hoja, molturada y con un tamaño de partícula de 0,425 a 0,600 mm), se ha llevado a cabo en un baño termostatzado dentro del cual se ha puesto una placa agitadora 2mag-Magnetic-Drive modelo 699022 con seis posiciones de agitación y rango de velocidad de 100 a 2.000 rpm. La regulación de estas variables se realiza mediante un módulo de control acoplado con pantalla digital según el procedimiento SoftStart, montaje mostrado en la Figura 4.4.

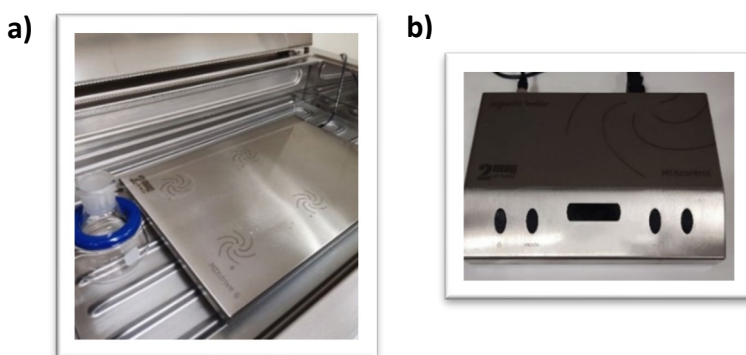


Fig. 4.4. a) Baño termostatzado con placa agitadora, b) Módulo de control de agitación

4.2.5. pH-metro

El pH es un parámetro fundamental en algunas de las etapas experimentales que integran el proceso general de valorización de la biomasa de poda de olivo, siendo de gran relevancia para llevar a cabo los pretratamientos con borohidruro de sodio y con peróxido de hidrógeno, en los que supone una de las variables del diseño de experimentos, así como para el control de pH durante los estadios iniciales de los procesos fermentativos, ya que en este último caso los microorganismos vivos son especialmente sensibles a los cambios del mismo.

El modelo usado es un pH-metro portátil Crison 25+, que se puede ver en la Figura 4.5.



Fig. 4.5. pH-metro portátil

4.2.6. Estufa de secado

Este equipo se usó tanto para el control de la humedad de las muestras sólidas biomásicas como para el secado de material de vidrio, y otros materiales de uso común; se trata de una estufa Memmert mod. UE 500, Figura 4.6.



Fig. 4.6. Estufa de secado Memmert

4.2.7. Autoclave

Se trata de un instrumento empleado tanto para aplicar la metodología de caracterización de materiales biomásicos sólidos, en relación a la determinación del contenido en azúcares, lignina y grupos acetilo, como para la esterilización de medio sólido y material empleado en la etapa de fermentación. Se ha usado un autoclave vertical Raypa, Mod. Stericlav-S, de 100 dm³ con válvulas manuales de desvaporización, pantalla digital y programable con diez programas de esterilización, el cual se muestra en la Figura 4.7.



Fig. 4.7. Autoclave vertical Raypa

4.2.8. Horno de mufla

El horno de mufla se ha usado para la determinación del contenido en cenizas del material lignocelulósico.

Se trata de un modelo HB-230 de la marca Hobersal con cámara de aislamiento de fibra cerámica y ladrillos refractarios de baja densidad, termopar tipo K, puerta abatible y pantalla digital de control de temperatura, capaz de alcanzar una temperatura máxima de 1200 °C.

4.2.9. Montaje de extracción Soxhlet

Este dispositivo se utilizó para la determinación de extractos acuosos y etanólicos de la biomasa de poda de olivo de partida. Se trata de un montaje sobre placas calefactoras, compuesto por matraces de fondo redondo de 250 cm³ que contendrán la fase líquida (agua o etanol según proceda), sobre los que se encaja el Soxhlet en cuyo interior se introduce un cartucho que contiene el sólido al que se le van a realizar las extracciones.

Finalmente, sobre el Soxhlet se coloca un serpentín refrigerante que ayudará a la condensación del agua o del etanol, según el tipo de extracción. La Figura 4.8. muestra el montaje descrito.



Fig. 4.8. Montaje Soxhlet para eliminación de extractos

4.2.10. Microscopio electrónico de barrido de alta resolución

Este equipo se empleó para el estudio de la estructura interna tanto de la biomasa de poda de olivo de partida, como de la obtenida después de algunos tratamientos, a fin de observar cómo se ve afectada la integridad física de la misma tras cada tratamiento.

Se trata de un microscopio electrónico de barrido modelo MERLIN de Carl Zeiss, con capacidad analítica EDX y WDX de Oxford, un sistema de ultra alta resolución que permite trabajar con todo tipo de muestras tanto en imagen como en análisis, mostrado en la Figura 4.9.

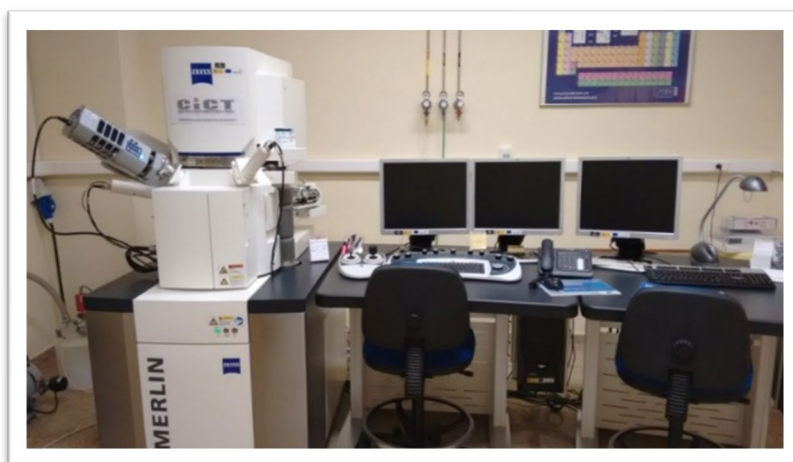


Fig. 4.9. Microscopio electrónico de barrido de alta resolución

Perteneciente a los Servicios del Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén, dicho microscopio consta de un cañón de emisión de electrones por emisión de campo de punta caliente y permite una resolución máxima de la imagen en electrones secundarios (SE) de 0.8 nm a 15 kv, de 1,4 nm a 1kv y 2,4 nm a 0,2 kv. Este equipo permite obtener imágenes de electrones retrodispersados.

Su rango de potencial de aceleración está comprendido entre 0.02 V y 30 kV. La corriente del haz está comprendida entre 10 pA y 300 nA.

El sistema de detección de electrones está formado por los siguientes detectores:

- Detector de electrones secundarios situado en la cámara de muestras, SE-Everhart-Thornley
- Detector de electrones secundarios de alta resolución
- Detector de electrones retrodispersados situado en la cámara de muestras, AsB de cuatro cuadrantes de estado sólido integrado en la lente de la columna GEMINI II
- Detector de electrones retrodispersados de alta resolución en la columna
- Detector de catodoluminiscencia

El software utilizado por el FESEM es SmartSEM basado en Windows, permite controlar todos los parámetros del equipo, así como obtener, almacenar y trabajar sobre las imágenes obtenidas.

4.2.11. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución

La cuantificación de los azúcares monoméricos (D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa), así como de ácido acético, ácido fórmico y etanol, han sido determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución (high performance liquid chromatography, HPLC), utilizando un instrumento Waters, (Figura 4.10.) perteneciente al Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) de la Universidad de Jaén, con las siguientes características:

- Columna BIO-RAD, Mod. Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm)
- Precolumna BIO-RAD Cartridge Holder (1250131) 30 x 46 mm
- Temperatura de trabajo: 45 °C
- Ácido sulfúrico 0,49 kg/m³ como eluyente
- Flujo: 0,6 cm³/ min
- Detector del índice de refracción (RID10-A)

- Volumen de muestra: 20 mm³
- Tiempo de detección 20-30 minutos



Fig. 4.10. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución

El sistema informático acoplado al cromatógrafo tiene instalado el software Chromeleon, el cual permitirá calcular la concentración de cada compuesto mediante la integración del área bajo los picos detectados en el cromatograma, tras introducir patrones de concentración conocida y definir un método de trabajo donde se establecerán valores de flujo, presión, tiempo de toma de muestra, etc.

4.2.12. Cabina de flujo laminar

Esta cámara se utilizó para la inoculación de las levaduras y para el mantenimiento de las condiciones de esterilidad en las etapas iniciales de los procesos fermentativos; se trata de una cabina vertical de flujo laminar modelo Mini-V/PCR de la marca Telstar con mechero Bunsen con válvula de aguja acoplado para el suministro de gas, Figura 4.11.



Fig. 4.11. Cabina vertical de flujo laminar

Como características generales presenta:

- Cabina de sobremesa en régimen de flujo laminar vertical no reciclado
- Superficie de trabajo en acero inoxidable AISI 304
- Filtro absoluto HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) de eficacia, H14
- Prefiltro de aspiración 85% ASHRE, situado en el lateral de la cabina
- Cabina Clase 3 según ISO14644-1 - Grado A
- Iluminación mediante LED: 66 W
- Sistema de control mediante microprocesador y pantalla de cristal líquido (liquid crystal display, LCD)

Esta cabina proporciona un flujo de aire laminar ultrafiltrado sobre la superficie de trabajo para proteger los productos manipulados del polvo, de la contaminación ambiental y de la contaminación cruzada. Incorpora una luz ultravioleta (UV) con temporizador particularmente adecuado para el proceso de desnaturalización de los contaminantes de oligonucleótidos.

4.2.13. Espectrofotómetro

Este instrumento, que se muestra en la Figura 4.12., se emplea para la evaluación del crecimiento celular durante la etapa de fermentación de los hidrolizados ácidos y además en el procedimiento de determinación de algunos inhibidores presentes en los hidrolizados ácidos.



Fig. 4.12. Espectrofotómetro

Se trata de un espectrofotómetro Thermo Spectronic, Mod. HELIOS Gamma 9423 UVG 1002E, capaz de trabajar en un amplio abanico de longitudes de onda y en cuyo interior se usarán cubetas de cuarzo o plástico según establezca cada procedimiento.

4.3. Microorganismos empleados

En el desarrollo de esta investigación se han utilizado levaduras no convencionales: *Pichia stipitis* CBS 6054 y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691.

***Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*) CBS 6054**

Es una levadura predominantemente haploide caracterizada por la producción de ascosporas, cuya procedencia está ligada a las etapas teliomórficas (finales de la reproducción) de *Candida shehatae*, y cuyas características fundamentales ya han sido estudiadas en apartados anteriores (2.8.1.1.).

Actualmente, el uso biotecnológico para la producción de etanol empleando esta levadura está muy extendido, debido a su capacidad para fermentar tanto hexosas como pentosas con altos rendimientos, Bellido *et al.* (2011) [25]. El interés en auge que suscita en el ámbito científico hace que se encuentren incluso algunas patentes referentes a estudios genéticos destinados a la creación de especies mutantes con ventajas biotecnológicas, Jin *et al.* (2002) [84].

La capacidad productora de etanol de las levaduras varía entre géneros, especies e incluso entre cepas dentro de una misma especie. Entre los criterios de selección de las cepas destacan: su capacidad fermentativa, medida como producción de etanol, la tolerancia a la acidez, el consumo de azúcares y la buena productividad volumétrica de etanol.

De entre las diferentes cepas existentes se ha seleccionado la CBS 6054, perteneciente al reservorio del Instituto de Biodiversidad Fúngica de Westerdijk, de Países Bajos, e identificada junto con la cepa CBS 5773 como las que presentan mayores rendimientos en etanol, Krahulec *et al.* (2012) [92], Agbogbo *et al.* (2006) [2].

Pachysolen tannophilus ATCC 32691

Se trata de una levadura perteneciente a un género monotípico que contiene una única especie, *Pachysolen tannophilus*.

Para esta tesis doctoral ha sido seleccionada la cepa ATCC 32691 perteneciente al reservorio de la colección americana de cultivos, “American type culture collection” (ATCC), debido a los buenos rendimientos obtenidos según investigaciones previas, Moya *et al.* (2008) [128].

Ambas levaduras degradan la xilosa sin requerir necesariamente oxígeno; sin embargo, unas condiciones semiaeróbicas pueden dar lugar a valores altos de la velocidad específica y del rendimiento de etanol, Moya (1997) [127].

Las citadas levaduras fueron conservadas en tubos de ensayo de 100 cm³, sobre medio sólido (extracto de levadura, 3 kg/m³; extracto de malta, 3 kg/m³, peptona 5 kg/m³; D-xilosa 10 kg/m³ y agar-agar 20 kg/m³) en una estufa Memmber BE 400, a temperatura aproximada de 20 °C, hasta su uso en las etapas fermentativas del trabajo experimental.

4.4. Procedimiento de trabajo

4.4.1. Planteamiento General

De forma general, en este estudio se plantea inicialmente un diseño experimental de ensayos basados en la hidrólisis con ácido oxálico diluido con el fin de estudiar su capacidad para atacar la estructura interna de la biomasa lignocelulósica y liberar la mayor cantidad posible de azúcares simples fermentables. Este ácido dicarboxílico, cuyos efectos son menos conocidos que los ácidos tradicionalmente usados, presenta además como ventajas menor toxicidad que otros ácidos como el ácido sulfúrico, Moya *et al.* (2016b) [130] y mayor eficiencia catalítica para la hidrólisis en condiciones similares de severidad, Lee y Jeffries (2011) [104].

Tras una batería de ensayos primarios basados en un ataque de la biomasa de poda de olivo de partida con este ácido, se establecen series de tratamientos complementarios al de hidrólisis con el fin de degradar previamente la estructura de la materia prima para facilitar la acción posterior del ácido. Además, estudiada la sensibilidad de las levaduras a alguno de los compuestos químicos presentes en los hidrolizados ácidos, se plantean ensayos con el fin de reducir la concentración de los principales compuestos tóxicos para las levaduras presentes en dichos hidrolizados y, así, aumentar la producción de etanol por vía fermentativa y, por tanto, el rendimiento total del proceso.

Por tanto, en función de las ventajas que podría ofrecer una deconstrucción inicial de la materia de partida y previendo la posible formación de compuestos inhibidores, se han diseñado las siguientes líneas de tratamiento:

→ Línea 1. Pretratamiento con hidróxido de sodio

Esta etapa se introduce como tratamiento previo a la hidrólisis ácida, buscando eliminar la mayor cantidad posible de grupos acetilo y debilitar la compactación estructural inicial de la materia prima, estudiando a la vez el efecto deslignificante sobre la biomasa de partida.

Una vez llevado a cabo este pretratamiento, el residuo se hidroliza con ácido oxálico bajo las mismas condiciones que las empleadas en el tratamiento inicial, se fermenta y se hace un estudio comparativo de resultados.

→ Línea 2. Pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno

Al igual que ocurre con la línea 1, se trata de un pretratamiento que se ha llevado a cabo antes de la hidrólisis ácida a fin de debilitar la estructura de la biomasa lignocelulósica. Adicionalmente es posible que el peróxido de hidrógeno ejerza algún efecto deslignificante sobre la biomasa de partida que pueda suponer mejoras en el proceso global.

→ Línea 3. Tratamiento de detoxificación con Borohidruro de Sodio

Surge como tratamiento complementario de detoxificación y tiene lugar entre las etapas de hidrólisis ácida y fermentación. Los experimentos que se llevarán a cabo permitirán conocer cómo afecta este compuesto químico a la concentración de inhibidores relevantes presentes en hidrolizados de naturaleza ácida, ya que algunos de estos inhibidores podrían impedir el correcto desarrollo de la etapa fermentativa.

La Figura 4.13. muestra el esquema general de trabajo seguido en el desarrollo experimental, estructurado en función de las tres líneas de tratamiento comentadas con anterioridad.

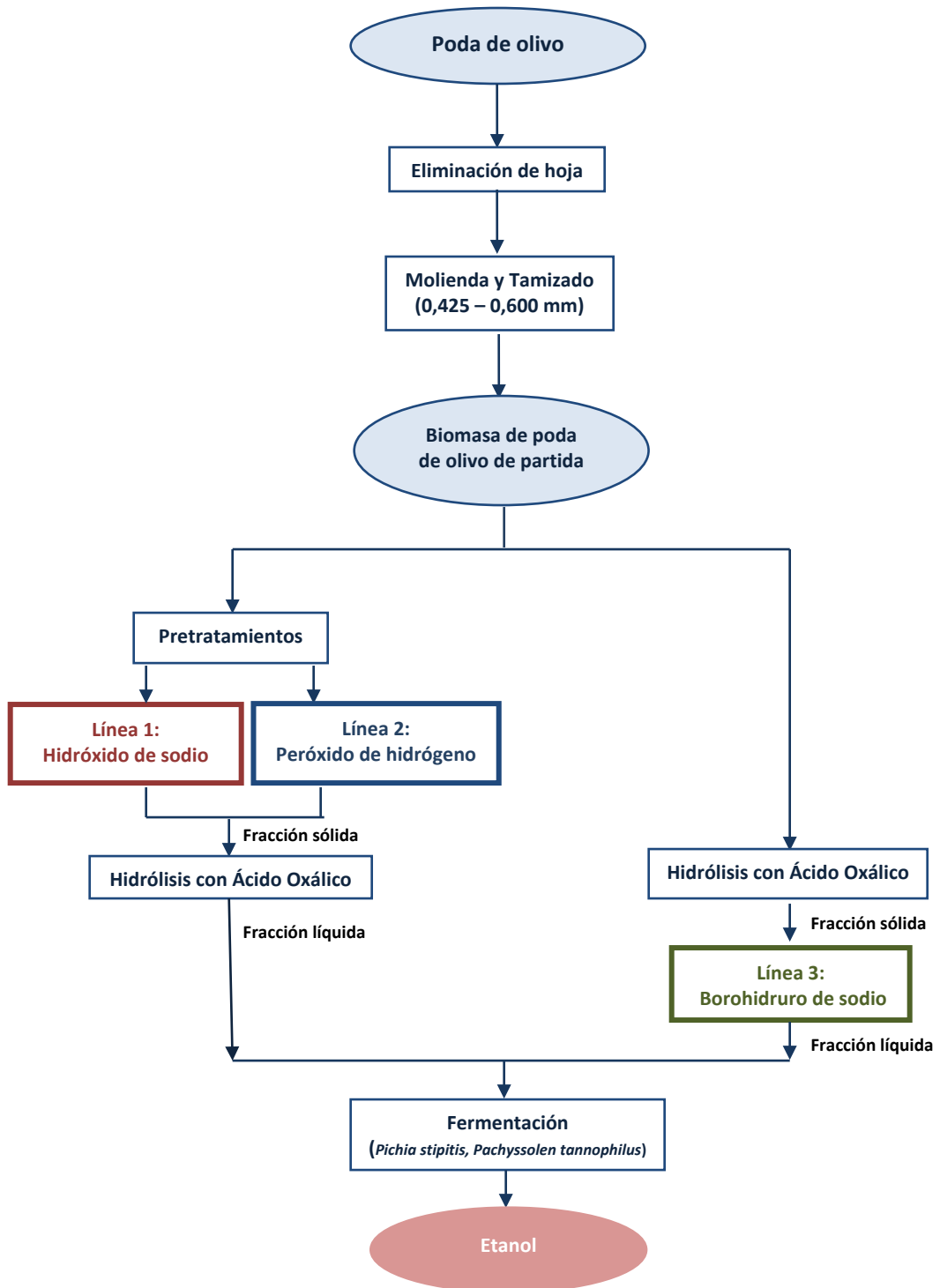


Fig. 4.13. Esquema general del desarrollo experimental

4.4.2. Recogida, molienda y tamizado de la biomasa

La biomasa utilizada en los experimentos desarrollados en esta Tesis Doctoral procede de una finca localizada en la localidad de Arjona, (Jaén), entre las coordenadas UTM (*Universal Transverse Mercator*) 442,490- 4196,389 W (*west*, oeste).

Enmarcados en un sistema de plantación tradicional (10 x 10 m), los olivos de esta finca se caracterizan por tener entre 20 y 30 años, ser de secano y pertenecer a la variedad picual, características predominantes en el olivar de la provincia de Jaén.

Tras el fin de la campaña de recogida de aceituna, tiene lugar el proceso de poda en el cual los restos cortados de los árboles son depositados en las hileras centrales de la plantación para su picado. A fin de obtener una biomasa de poda de olivo representativa de estos depósitos centrales, constituida por tronco de olivo, ramas y hojas (aunque estas últimas se eliminen posteriormente, ya que está en estudio su uso en otras líneas de investigación distintas a la de producción de bioetanol), se llevó a cabo una recogida de muestra estratificada que fue sometida a una serie de tareas de acondicionamiento consistentes principalmente en:

- **Homogenización.** Tras su recogida de la zona de cultivo la biomasa, procedente de diferentes hileras, se depositó en una caja de dimensiones adecuadas para su homogenización y se dejó secar a temperatura ambiente.
- **Eliminación de la hoja.** Ya en las dependencias del departamento de Ingeniería química se procedió a la eliminación manual de las hojas que aún quedaban adheridas a los restos leñosos.
- **Molturación.** Aproximadamente 50 kg de restos leñosos de diámetro inferior a 5 cm, ya sin hoja, fueron molidos con el molino de cuchillas, Retsch (mod. SM11) descrito en el apartado 4.2.1.

- **Clasificación por tamaño.** Dada la importancia del tamaño de partícula con el que se trabaja, debido a la influencia que posee en el desarrollo de los tratamientos, en esta tesis se seleccionará la fracción comprendida entre 0,425 – 0,600 mm, fijada por otros estudios, dentro del grupo de investigación, como la más idónea. El establecimiento de dicha fracción para los ensayos se basa en la premisa de trabajar con el mayor tamaño de partícula (evitando la molienda en exceso que supondría un gasto de energía innecesario) que permita el ataque a la estructura interna del residuo con los tratamientos usados. Para la citada selección de tamaño tras la molturación se llevó a cabo una operación de clasificación mediante una tamizadora Retsch (mod. Vibro) descrita en el apartado 4.2.1. Se utilizaron tamices de 500, 120, 50, 40, 30, 20 y 16 mallas ASTM (*American Society for Testing Materials*), según la norma ISO 3310-1, cuya luz de malla es 0,025; 0,125; 0,300; 0,425; 0,600; 0,850 y 1,200 mm, respectivamente.
- **Segunda homogenización.** Para asegurar una muestra característica del tamaño de partícula seleccionado en todos los tratamientos, se realizó una segunda homogenización del material; esta consistió en la mezcla de toda la biomasa de poda tamizada en un recipiente.
- **Almacenamiento.** El residuo de poda de olivo fue almacenado en recipientes antihumedad de plástico con cierre estanco hasta su uso.

El resultado del proceso de acondicionamiento descrito será una biomasa sin hoja, molturada y con un tamaño de partícula entre 0,425 – 0,600 mm, a la que denominaremos **biomasa de poda de olivo de partida** o **materia prima**, siendo esta con la que realizaremos todos los ensayos experimentales.

4.4.3. Hidrólisis con ácido oxálico

Para el diseño experimental de los tratamientos de hidrólisis con ácido oxálico se utilizó el software STATISTICA 6.0 escogiendo un modelo Box-Behnken 3^2 , que supuso la realización de 9 experimentos, a los cuales se denominó bajo la abreviatura “OXA”, seguida del número correspondiente a cada ensayo según las condiciones experimentales establecidas.

Se consideraron como variables independientes la concentración de ácido oxálico y la temperatura del sistema, con rangos de variación de 50-100 mM y 130-170 °C, respectivamente, según los valores establecidos en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Diseño de experimentos para el tratamiento con ácido oxálico

Ensayo	Temperatura, °C	Ácido oxálico, mM
OXA-1	130	50
OXA-2	130	75
OXA-3	130	100
OXA-4	150	50
OXA-5	150	75
OXA-6	150	100
OXA-7	170	50
OXA-8	170	75
OXA-9	170	100

Este tratamiento se ha realizado en el reactor a presión descrito en el apartado 4.2.2. El procedimiento consistió en la carga del vaso del citado reactor con 50 g de biomasa y 500 cm³ de disolución diluida de ácido oxálico a la concentración que corresponda para cada ensayo, dejando así fijada la relación sólido-líquido en 1:10 para todos los experimentos realizados.

En primer lugar, se llevó a cabo la hidrólisis ácida con la biomasa de poda de olivo de partida y posteriormente con la biomasa sólida residual obtenida tras los pretratamientos químicos propuestos con hidróxido de sodio (línea 1) y peróxido de hidrógeno (línea 2).

Para preparar la disolución de ácido oxálico se ha pesado la cantidad de ácido correspondiente en un vaso de precipitado de 100 cm^3 , dentro del cual se coloca un espín. Se añade una pequeña cantidad de agua destilada y con una placa de agitación se disuelve el ácido oxálico. Posteriormente se lleva la disolución a un matraz aforado de 500 cm^3 y se enrasa.

Finalmente se introducen los 500 cm^3 de disolución preparada en el vaso del reactor donde previamente se ha puesto el sólido y se procede al montaje del sistema.

Tras el cierre del equipo, se conecta la agitación, también con valor fijo para todos los ensayos, en 150 rpm. A continuación, se fija la temperatura de trabajo usando la pantalla destinada a tal fin y se conecta el sistema de calentamiento.

El tiempo de mantenimiento del tratamiento de hidrólisis ácida será de 30 minutos, tras los cuales se procederá al enfriamiento del equipo que se llevará a cabo, en primer lugar, haciendo circular agua de refrigeración hasta alcanzar los $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, aproximadamente, y posteriormente sumergiendo el cuerpo del reactor en un baño de hielo para finalizar el proceso de forma rápida.

Una vez abierto el equipo se separará la fracción sólida de la líquida mediante filtración por gravedad. Se lavará el sólido con agua destilada hasta pH neutro y se dejará secar a temperatura ambiente hasta una humedad inferior al 10% para su posterior caracterización. Por otra parte, la fracción líquida se conservará a una temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior fermentación.

En el proceso de hidrólisis ácida se debe considerar la severidad como un parámetro fundamental de estudio, por lo que para su cálculo será necesario anotar la temperatura del sistema a distintos tiempos de reacción durante las rampas de calentamiento y de enfriamiento, además de procurar la mayor estabilidad térmica posible durante la fase de mantenimiento del tratamiento.

4.4.4. Líneas de tratamientos químicos propuestas en el estudio experimental

4.4.4.1. Línea 1: Pretratamiento con hidróxido de sodio

Esta etapa, desarrollada como pretratamiento respecto a la hidrólisis con ácido oxálico, se ha llevado a cabo usando el agitador orbital descrito con en el apartado 4.2.3.

La finalidad principal de los diferentes ensayos establecidos en el diseño experimental propuesto se centra en el estudio de la influencia del hidróxido de sodio (NaOH) sobre la concentración de los grupos acetilo presentes en la biomasa de poda de olivo de partida, ya que su aparición en los hidrolizados obtenidos tras el tratamiento de hidrólisis con ácido oxálico podría suponer la reducción parcial o total de la actividad de los microorganismos durante la etapa fermentativa posterior.

Para elaborar el modelo estadístico utilizado en este tratamiento químico se utilizó una metodología de superficie de respuesta, comúnmente utilizada en el modelado y optimización de procesos de reacción complejos.

Se usó el software STATISTICA 6.0 (Statsoft, USA), escogiendo un diseño factorial 2^2 para dos variables independientes: tiempo (de 8 a 92 minutos) y concentración de hidróxido de sodio (de 0,08 a 0,92%) con 4 puntos axiales y 3 réplicas en el punto central. Resultando un total de 11 experimentos a realizar, denominados como "HS" seguido del correspondiente número, el diseño queda recogido en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Diseño de experimentos para el pretratamiento con hidróxido de sodio

Ensayo	Tiempo (min)	NaOH (%)
HS-1	50	0,50
HS-2	50	0,50
HS-3	50	0,50
HS-4	80	0,80
HS-5	20	0,80
HS-6	80	0,20
HS-7	20	0,20
HS-8	50	0,92
HS-9	92	0,50
HS-10	50	0,08
HS-11	8	0,50

El proceso experimental consiste en la introducción de 20 g de biomasa de poda de olivo de partida en un matraz Erlenmeyer de 500 cm³, al cual se añaden 200 cm³ de disolución de NaOH (de concentración determinada por el diseño de experimentos para cada ensayo), manteniendo por tanto fija la relación sólido/líquido en proporción 1:10 (p/v).

Dicho matraz se llevará al agitador orbital con unas condiciones fijas de temperatura de 60 °C y una velocidad de agitación de 150 rpm.

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento establecido para cada experimento, las muestras se filtran, para separar las fracciones sólidas y líquidas obtenidas, usando un filtro de malla metálico de tamaño inferior a 0,3 mm. El líquido se conservará en el congelador a -18 °C para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución.

La fracción sólida, por otra parte, se lavará, primero con agua corriente y después con agua destilada, hasta llevarla a pH neutro, dejándola finalmente secar sobre papel de filtro a temperatura ambiente durante el tiempo suficiente para garantizar una humedad final inferior al 10%, tras el cual se pesará y caracterizará el sólido recuperado en cuanto a composición de azúcares y grupos acetilo se refiere siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.5.1., que se tratará con posterioridad.

Cada ensayo del diseño experimental establecido se realizará por triplicado y una vez llevados a cabo todos ellos, se obtendrá la optimización del modelo estadístico y su posterior comprobación.

Por último, una vez seleccionados los mejores valores de las variables estudiadas para el pretratamiento con NaOH, se realizarán diferentes réplicas en las condiciones optimizadas con el fin de obtener cantidad suficiente de residuo pretratado para realizar los ensayos de hidrólisis ácida posteriores en las condiciones óptimas seleccionadas según el diseño de experiencias establecido en el apartado 4.4.3.

4.4.4.2. Línea 2: Pretratamiento con peróxido de hidrógeno

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) surge con una doble finalidad: por un lado, atacar la estructura de la biomasa lignocelulósica y por otro, estudiar el posible efecto de deslignificación y desacetilación de diferentes disoluciones básicas diluidas de peróxido de hidrógeno sobre la biomasa de poda de olivo de partida.

Los ensayos se han desarrollado en un baño termostatzado dentro del cual se ha dispuesto una placa de agitación de seis posiciones con un módulo de control, como se muestra en el apartado 4.2.4.

Para el diseño de experimentos de este pretratamiento se usó el software Design Expert (v. 6.0), escogiendo un modelo factorial (2^3) con tres repeticiones del punto central, para cuatro variables independientes:

- Temperatura: entre 50 y 90 °C
- Tiempo: entre 60 y 120 minutos
- Concentración: entre un 2% y un 10% de H_2O_2 (peso/volumen)
- pH: entre 8 y 12 (medido a 25 °C)

Teniendo en cuenta estas consideraciones, las condiciones de los 19 ensayos del diseño experimental establecido, denominados bajo las siglas “PER” seguidas del número correspondiente a cada ensayo, quedan recogidas en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Diseño de experimentos para el pretratamiento con peróxido de hidrógeno

Ensayo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración H ₂ O ₂ (%)	pH
PER-1	50	60	2	8
PER-2	50	120	2	8
PER-3	90	60	2	8
PER-4	90	120	2	8
PER-5	50	60	10	8
PER-6	50	120	10	8
PER-7	90	60	10	8
PER-8	90	120	10	8
PER-9	50	60	2	12
PER-10	50	120	2	12
PER-11	90	60	2	12
PER-12	90	120	2	12
PER-13	50	60	10	12
PER-14	50	120	10	12
PER-15	90	60	10	12
PER-16	90	120	10	12
PER-17	70	90	6	10
PER-18	70	90	6	10
PER-19	70	90	6	10

El procedimiento experimental consiste en añadir en un Erlenmeyer de 1 dm³ un espín agitador, 10 mg de biomasa de poda de olivo de partida y 100 cm³ de disolución de H₂O₂ de concentración y pH establecidos según el ensayo que se esté realizando.

Para preparar la disolución de peróxido de hidrógeno se usará un vaso de 250 cm³ donde se pondrá el volumen correspondiente de este compuesto (según riqueza del mismo y concentración que se quiera obtener) junto con una pequeña cantidad de agua ultrapura. Posteriormente se colocará el vaso sobre una placa agitadora y se irá añadiendo disolución de NaOH 10 M hasta ajustar al pH deseado mediante el uso del pH-metro descrito previamente

en el apartado 4.2.5. Finalmente, la disolución se llevará a un matraz aforado de 100 cm³ hasta su enrase.

Se debe tener en consideración que para pH elevado la preparación de la disolución puede ser algo compleja, debido a la efervescencia de los compuestos.

Una vez preparada la citada disolución se vierte en el Erlenmeyer que contiene la biomasa de poda de olivo de partida y el espín agitador, se introduce en el baño a la temperatura indicada y se conecta la agitación a 150 rpm.

Transcurrido el tiempo del ensayo se saca el Erlenmeyer del baño y se realiza la separación sólido-líquido por filtración.

La fracción líquida se preservará mediante congelación a – 18 °C para su posterior análisis, en el cual se determinará su contenido en D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido acético, ácido fórmico, furanos y compuestos fenólicos totales, según se establece en los protocolos propuestos que recoge el epígrafe 4.5.2., el cual se trata posteriormente.

Por otro lado, la fracción sólida se dejará secar sobre papel de filtro a temperatura ambiente hasta que su humedad sea inferior al 10%, tras lo cual también será caracterizada, en esta ocasión siguiendo los procedimientos de caracterización recogidos en el apartado previo 4.5.1.

Con los datos experimentales obtenidos se llevará a cabo la optimización del modelo y se procederá a la realización de varias réplicas de los ensayos en estas condiciones óptimas hasta obtener cantidad de sólido tratado con peróxido de hidrógeno suficiente para realizar la posterior hidrólisis con ácido oxálico, también bajo condiciones optimizadas de acuerdo al diseño experimental recogido en el apartado 4.4.3.

4.4.4.3. Línea 3: Tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio

La línea 3, correspondiente al tratamiento con borohidruro de sodio (NaBH_4), surge con el fin de estudiar la influencia de este compuesto sobre la concentración de inhibidores que aparecen en los hidrolizados obtenidos tras el tratamiento de degradación con ácido oxálico en condiciones optimizadas (según recoge el apartado 4.4.3.) que se realiza a la biomasa de poda de olivo de partida.

En el diseño de experimentos se aplicó una metodología de superficie de respuesta usando el software Statistica 6.0 (Statsoft, USA). En dicha metodología se tuvieron en cuenta tres variables de operación, tiempo, concentración de NaBH_4 y pH, atendiendo a un diseño 2^3 central compuesto, que dio lugar a 16 ensayos tratados bajo la denominación “BH”, seguida del número correlativo correspondiente en función del valor de las variables citadas, como queda recogido en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Diseño de experimentos para el tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio

Ensayo	Tiempo (min)	NaBH_4 (mM)	pH
BH-1	10	30	4
BH-2	10	30	6
BH-3	10	90	4
BH-4	10	90	6
BH-5	30	30	4
BH-6	30	30	6
BH-7	30	90	4
BH-8	30	90	6
BH-9	3,2	60	5
BH-10	36,8	60	5
BH-11	20	9,6	5
BH-12	20	110,4	5
BH-13	20	30	3,32
BH-14	20	30	6,68
BH-15	20	30	5
BH-16	20	30	5

El proceso consiste en la introducción de 50 cm³ de hidrolizado ácido (al que previamente se le ajusta el pH al valor correspondiente con una disolución de NaOH 10 M) en un recipiente de vidrio equipado con un agitador magnético colocado a su vez sobre una placa agitadora, con una velocidad de agitación de 150 rpm.

A continuación, se añade la cantidad pertinente de NaBH₄ en polvo directamente y se deja agitando el tiempo establecido en cada caso. Transcurrido el mismo, el recipiente de vidrio se coloca en hielo a fin de parar la reacción ya que, aunque el proceso se desarrolla a temperatura ambiente, debido a las interacciones química la mezcla alcanza temperaturas elevadas.

Por último, se realiza la medida de inhibidores en el hidrolizado ácido. Se hará especial hincapié en el estudio de compuestos fenólicos y furánicos totales, con el fin de estudiar la eficacia para la detoxificación de los experimentos con borohidruro de sodio planteados.

Todos los experimentos se realizarán por triplicado y una vez llevados a cabo se procederá a la optimización y comprobación del modelo propuesto.

4.4.5. Acondicionamiento del hidrolizado

Las fracciones líquidas obtenidas tras los tratamientos de hidrólisis con ácido oxálico deben ser acondicionadas para su posterior fermentación, ya que poseen un pH demasiado ácido para el desarrollo de las levaduras y además deben ser complementadas con nutrientes esenciales.

El acondicionamiento consiste en la descongelación de la muestra, si se encontraba conservada a -18 °C, y un proceso de centrifugación posterior para obtener hidrolizados exentos de partículas sólidas. Esta operación unitaria se lleva a cabo distribuyendo el líquido en tubos Falcon de 50 cm³ y usando un programa de 10 minutos y 7000 rpm de velocidad.

Tras la retirada del precipitado de color pardo- oscuro obtenido se procede al ajuste de pH del sobrenadante a valores entre 5,0 y 5,5 usando disoluciones concentradas de NaOH o HCl, según sea necesario.

En último lugar, a estos hidrolizados ácidos centrifugados y con pH ajustado se le añaden los nutrientes necesarios para el proceso fermentativo, según queda recogido en el siguiente apartado 4.4.6., de fermentación.

4.4.6. Fermentación

Las fermentaciones se han llevado a cabo con las levaduras *Pichia Stipitis* CBS 6054 y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691, cuyas principales características quedan recogidas en el apartado 4.3. de la presente memoria, sobre microorganismos empleados. El desarrollo de los experimentos de fermentación ha seguido una serie de etapas que se describen a continuación.

• Precultivo en medio sólido

La primera etapa para el inicio de cada proceso fermentativo consiste en la preparación de medio sólido en tubos de ensayo de 100 cm³ y la posterior inoculación de los microorganismos en dicho medio.

La composición del medio de cultivo sólido se recoge en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Composición del medio de cultivo sólido (kg/m³)

Extracto de levadura	3,0
Extracto de malta	3,0
Peptona	5,0
D-Xilosa	10,0
Agar-agar	20,0

Para su preparación se pesan en un vaso todos los componentes (dejando aparte el agar-agar) y se disuelven en agua ultrapura, introduciendo un spin y colocando el vaso sobre una placa agitadora. Se ajusta el pH a 7,00 y se pone a calentar la mezcla. Una vez producida la ebullición de la mezcla, se añade el agar-agar y se mantiene la agitación.

Seguidamente, se vierten aproximadamente 25 cm³ del medio preparado en cada tubo de ensayo, tapándolos con algodón graso y esterilizándolos en un autoclave Raypa, Mod. Stericlav-S, mostrado anteriormente en el apartado 4.2.7., durante 30 minutos a una sobrepresión comprendida entre 58,8 y 78,5 kPa.

Finalmente, este medio se deja solidificar colocando los citados tubos de forma inclinada para lograr una mayor superficie de medio, como se muestra en la Figura 4.14.



Fig. 4.14. Medio de cultivo sólido

Sobre este medio de cultivo sólido se inoculará la levadura en una cabina de flujo laminar, Telstar, Mod. Micro-V/PCR (descrita en el apartado 4.2.12), en condiciones de esterilidad y empleando un asa de platino para tal fin.

Los tubos inoculados se mantendrán 24 h aproximadamente en una estufa de cultivo, Memmber, Mod BE 400 a una temperatura próxima a los 30 °C, para ser finalmente utilizados en la fermentación.

• **Medio de cultivo**

Para el inicio del proceso de fermentativo será necesario preparar medio líquido tanto para el preinóculo como para realizar los blancos de las medidas de absorbancia. Este medio tendrá la composición descrita por Lindegren *et al.* (1958) [108]. Además, los hidrolizados deben ser enriquecidos con los mismos nutrientes, aunque en este caso se opte por el uso de la concentración al 50% según describe Cuevas (2007) [53]. Esta información queda recogida en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Composición del medio de cultivo líquido, kg/m³

	Lindegren <i>et al.</i> (1958) [108]	Cuevas (2007) [53]
Extracto de levadura	4,00	2,00
Peptona	3,60	1,80
MgSO ₄ 7H ₂ O	2,05	1.03
KH ₂ PO ₄	2,00	1,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00	1,50

• **Inóculo líquido**

El medio de cultivo líquido, descrito anteriormente, se esterilizará haciéndolo pasar por un prefiltro de lana de vidrio, seguido de una membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm de tamaño de poro, mediante una bomba peristáltica utilizando portafiltros de policarbonato (previamente esterilizados en autoclave).

Se añadirá una pequeña cantidad de medio líquido a cada tubo de precultivo agitando suavemente con el fin de resuspender los microorganismos.

Este proceso se repetirá con el número de tubos de precultivo que se consideren necesarios en cada caso para conseguir las concentraciones deseadas de microorganismo en la fermentación.

• **Bioproceso**

Para comenzar la fermentación se esterilizará el material necesario (matraces Erlenmeyer de 100 cm³, vasos de cultivo, pipeta de vidrio, etc.) en autoclave a una sobre presión de 117,7 kPa durante 30 minutos.

El proceso se inicia, dentro de la cabina de flujo laminar, añadiendo a cada Erlenmeyer 40 cm³ de hidrolizado (ya acondicionado) y la cantidad calculada de inóculo líquido para alcanzar la concentración de biomasa establecida. Dicha cantidad de inóculo se calculará con la

correspondiente recta patrón de cada levadura que relaciona absorbancia a 620 nm (A_{620}) con la concentración de microorganismos (x , g/dm³), ecuaciones 4.1 y 4.2 para las levaduras *P. stipitis* y *P. tannophilus*, respectivamente. Estas rectas patrón se han tomado de un trabajo previo, Moya (1997) [127].

$$Pichia stipitis: \quad x = 0,200 A_{620} - 0,02 \quad r^2 = 0,999 \quad (4.1)$$

$$Pachysolen tannophilus: \quad x = 0,2095 A_{620} + 2,04 \cdot 10^{-4} \quad r^2 = 0,991 \quad (4.2)$$

La duración del experimento dependerá de las condiciones elegidas, así como de la levadura empleada.

Durante el proceso se realizará la toma de muestras periódica según las necesidades de análisis. Esta toma de muestras consistirá en la extracción con micropipeta, dentro de una cabina de flujo y siguiendo las más rigurosas medidas de esterilidad posibles, de 1 a 2 cm³ de muestra, recogiénola dentro de un tubo Eppendorf.

Puntualizar que, durante la fermentación, el volumen total de muestra extraída de cada matraz Erlenmeyer de fermentación nunca debe superar el 20% del volumen de líquido total puesto en el mismo, pues disminuir en mayor medida este volumen total alteraría parámetros fermentativos como la aeración, concentración de inóculo, etc. Para evitar esta circunstancia, al inicio del proceso fermentativo, se pondrán un mínimo de 4 matraces Erlenmeyer por réplica realizada.

Una vez tomada la muestra, para un determinado tiempo de fermentación, se realizará la dilución de la misma con medio de cultivo para medir la absorbancia a 620 nm. Con esta medida, y empleando las rectas patrón correspondientes para cada levadura, se determinará la concentración de biomasa en cada tiempo de fermentación testado.

Conocida tanto la concentración de biomasa, como el pH, las muestras serán centrifugadas y se conservarán congeladas a -18 °C para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución, con el fin de determinar las concentraciones de los principales azúcares simples, ácidos acético y fórmico y etanol presentes en cada una de ellas.

4.5. Métodos de análisis

4.5.1. Caracterización de sólidos

Bajo la denominación de “sólidos” quedarán englobados tanto la biomasa de poda de olivo de partida, con la que se han llevado a cabo los pretratamientos químicos con hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno, como el material lignocelulósico tratado obtenido tanto de ellos como del tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio; además del material recuperado de los procesos hidrolíticos llevados a cabo con ácido oxálico.

4.5.1.1. Humedad y materia volátil

El contenido en humedad y materia volátil, denominado como *HMV*, se ha determinado calculando la pérdida de peso experimentada por la muestra sólida cuando se somete a una temperatura de 105 ± 1 °C, durante el tiempo suficiente para alcanzar pesada constante, según regula la norma TAPPI T 11 m-59.

El procedimiento consiste en dejar el material, cuya humedad se va a determinar, sobre un papel de filtro hasta alcanzar la humedad ambiente de equilibrio, para posteriormente pesar una muestra de aproximadamente 1 g e introducirla para su secado en una estufa Memmert (mod. UE 500) a 105 ± 1 °C hasta pesada constante, es decir, repitiendo pesadas cada 24 horas hasta que la variación de peso no sea significativa. Para ello se ha utilizado una balanza de precisión y un vaso de precipitado previamente secado también en estufa a 105 ± 1 °C.

Cada vez que vaya a realizarse una pesada la muestra contenida en el vaso de precipitado debe pasar de la estufa de secado a un desecador durante 15 minutos y posteriormente a la balanza de precisión.

El contenido en humedad y materia volátil, *HMV* (%), se ha determinado finalmente mediante la ecuación 4.3.

$$HMV (\%) = \frac{m_h - m_s}{m_h} 100 \quad (4.3)$$

Donde:

m_s : peso de la muestra seca, g

m_h : peso húmedo inicial de la muestra, g

4.5.1.2. Determinación de polímeros fundamentales. Celulosa, hemicelulosa y lignina

Tanto la biomasa de poda de olivo de partida como los sólidos obtenidos del resto de tratamientos han sido caracterizados determinando su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina siguiendo la metodología descrita por Browning (1967) [32] y Rocha (2000) [159].

Se trata de un proceso en el que se producen dos hidrólisis sucesivas, una con ácido concentrado en un corto periodo de tiempo y otra diluyendo dicho ácido y alargando el tiempo de ataque sobre la materia lignocelulósica.

El procedimiento consiste en añadir aproximadamente 2 g de biomasa, de tamaño comprendido entre 0,425 - 0,600 mm, en un vaso de precipitado de 50 cm³, adicionando sobre él 10 cm³ de ácido sulfúrico (72% p/p). La mezcla se introduce en un baño termostatzado (Microcanal modelo B.15) a 60 °C durante 7 minutos, agitando constantemente con una varilla de vidrio. Finalizado el tiempo se transfiere el contenido del vaso a un matraz Erlenmeyer de 1 dm³, diluyendo con 275 cm³ de agua destilada para interrumpir de esta manera la primera reacción de hidrólisis. Posteriormente se cerrará el matraz con papel de aluminio y gomas y se autoclavará a 1 atm de presión, 121 °C, durante 45 minutos, para realizar una segunda hidrólisis completa de los oligómeros residuales.

Tras el tiempo establecido el Erlenmeyer se enfriará a temperatura ambiente y se procederá a la separación del sólido-líquido por filtración usando un embudo de vidrio sobre el cual se colocará un papel de filtro previamente tarado. Dicho embudo se pondrá sobre un matraz aforado de 500 cm³, de manera que la fracción líquida pase al matraz, completando el resto del volumen del mismo con agua ultrapura, una vez que esta ha pasado por el sólido a modo de lavado. Tras el enrase del matraz de 500 cm³ se guardarán unos mililitros de esta muestra para su posterior análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución, a fin de determinar las concentraciones de D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa y ácido acético que serán necesarias para el cálculo de los porcentajes de celulosa, *CEL*, (ecuación 4.4), hemicelulosa, *HEM*, (ecuación 4.5) y grupos acetilo, *GA*, (ecuación 4.6) existentes.

$$CEL, \% = \frac{M_G}{M_{PA}} F_C F_{ph} 100 \quad (4.4)$$

$$HEM, \% = \frac{M_X + M_A}{M_{PA}} F_C F_{ph} 100 \quad (4.5)$$

$$GA, \% = \frac{M_{HAc}}{M_{PA}} F_C 100 \quad (4.6)$$

Donde:

M_{PA} : masa seca de biomasa de poda de olivo de partida, g

M_G : concentración de D-glucosa (g/ dm³) x 0,5 dm³

M_X : concentración de D-xilosa (g/ dm³) x 0,5 dm³

M_A : concentración de L-arabinosa (g/ dm³) x 0,5 dm³

M_{HAc} : concentración de ácido acético (g/ dm³) x 0,5 dm³

F_{ph} : factor de pérdida de hidrólisis: celulosa (1,055) y hemicelulosa (1,155)

F_C : factor de conversión: celulosa (0,9), hemicelulosa (0,88) y grupos acetilo (0,72)

El residuo sólido retenido en el papel de filtro (lignina insoluble) se seguirá lavando hasta llevarlo a pH neutro, con aproximadamente 1,5 dm³ de agua destilada. Finalmente, se

introducirá el papel de filtro con el sólido en estufa a 105 °C hasta pesada constante, aproximadamente 24-48 horas. Tras esto, se determinarán las cenizas por calcinación siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.5.1.3. El porcentaje de lignina insoluble, LIG_i , vendrá dado por la ecuación 4.7.

$$\% LIG_i = \frac{M_{RS}}{M_{PA}} 100 \quad (4.7)$$

Donde:

M_{RS} : masa seca de biomasa sólida – masa de cenizas, g

M_{PA} : masa seca de biomasa de poda de olivo de partida, g

4.5.1.3. Cenizas

El contenido en cenizas totales fue determinado siguiendo el protocolo que dicta la norma TAPPI T 15 os-58.

Bajo el término de “cenizas” se entenderá el residuo resultante del proceso de incineración de la materia orgánica, constituyendo una medida del contenido en sales minerales de la muestra.

Esta operación se realiza a una temperatura de 575 ± 25 °C durante un tiempo de 3 horas, usando el horno de mufla Thermolyne (mod. 1300) con selector de temperatura y rampa de calentamiento descrito en el apartado 4.2.8.

El procedimiento consiste en poner aproximadamente un gramo de muestra seca, o de humedad adecuada, en un crisol de porcelana previamente incinerado para la eliminación de posibles errores por incrustaciones. Dicho crisol con la muestra a analizar se introduce en el horno de mufla a la temperatura establecida durante 3 horas, pudiendo ampliar este tiempo hasta garantizar la completa calcinación.

Una vez finalizado el tiempo de análisis, el crisol con las cenizas se dejará enfriar en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se tomará la pesada en una balanza de precisión. El contenido en cenizas, CEN (%), se determinará mediante la expresión 4.8.

$$CEN(\%) = \frac{M_c}{M_s} 100 \quad (4.8)$$

Donde:

M_c : peso de las cenizas, g

M_s : peso de la muestra seca inicial, g

4.5.1.4. Extractos acuosos y etanólicos

La biomasa de poda de olivo de partida fue caracterizada en contenido en extractos tanto en base acuosa como etanólica siguiendo el protocolo establecido por la norma NREL/TP-510-42619 (2008).

Este procedimiento utiliza un proceso de extracción en dos pasos consecutivos para eliminar, en primer lugar, el material soluble en agua, donde se incluyen materia inorgánica, azúcares no estructurales y material nitrogenado, entre otros, y en segundo lugar el material soluble en etanol, que engloba clorofila, ceras y otros componentes menores, obteniendo como resultado final el porcentaje global de extractos en base seca.

Inicialmente, se llevó a cabo la extracción acuosa de la biomasa de poda de olivo de partida y, con el residuo seco extraído, se repitió el procedimiento usando etanol en la segunda extracción.

Para comenzar se secarán tanto los matraces de fondo redondo de 250 cm³ como los refrigerantes Soxhlet, el resto de material de vidrio a usar y los cartuchos de extracción en una estufa de secado a 105 °C.

A continuación, se dejarán enfriar los matraces y los cartuchos a temperatura ambiente en un desecador para su posterior pesada.

Luego, se añadirán a cada cartucho entre 6-10 g de biomasa de poda de olivo de partida de humedad adecuada conocida y se introducirá dicho cartucho en el cuerpo del extractor Soxhlet. A continuación, se añadirán a cada matraz $190 \pm 5 \text{ cm}^3$ de agua ultrapura y se procederá a ensamblar el montaje, ajustando la calefacción de las placas para que se produzcan de 4 a 5 ciclos de sifón por hora y manteniendo la extracción durante 24 horas.

Pasado este tiempo de extracción se introducirán los cartuchos en una estufa de secado a 105°C , y los matraces en otra estufa a 40°C hasta pesada constante. Una vez conseguida dicha estabilidad en la pesada, se usarán los cartuchos con el residuo seco, ya sin extractos acuosos, para la extracción con etanol.

Para la extracción etanólica se repetirá el mismo proceso, pero poniendo, en esta ocasión, $190 \pm 5 \text{ cm}^3$ de etanol absoluto y controlando el sistema de calefacción para intentar que se produzcan entre 6 y 10 ciclos por hora.

Transcurridas las 24 horas de extracción, los matraces y los cartuchos se introducirán en las respectivas estufas de secado hasta pesada constante, como en el caso de la extracción con agua.

El cálculo de los extractos, $EXT(\%)$, se realizará mediante la expresión 4.9.

$$EXT(\%) = \frac{E}{M_s} 100 \quad (4.9)$$

Donde:

E : peso de los extractos una vez terminado el proceso de extracción, g

M_s : peso de la masa biomásica seca inicial puesta, g

Esta expresión se usará tanto para extractos acuosos como etanólicos, aclarando que el peso de los extractos se calculará como la diferencia entre el matraz con extractos tras el secado en estufa hasta obtener la pesada constante, menos el peso del matraz vacío.

4.5.1.5. Estructura interna de la biomasa.

Para el estudio de la morfología superficial de los materiales biomásicos, con el fin de comprender mejor cómo se estructuran y cómo afectan a los mismos cada una de las etapas de tratamiento, se tomaron una serie de imágenes usando el microscopio electrónico de barrido de alta resolución (FESEM) descrito en el apartado 4.2.10.

De esta forma, los efectos de algunos pretratamientos sobre las características morfológicas de las fibras se evaluaron comparando las imágenes obtenidas para la biomasa de poda de olivo de partida con las correspondientes a la biomasa pretratada en condiciones optimizadas.

Antes de la toma de imágenes, las muestras, colocadas sobre una placa, fueron sometidas a un metalizado con oro, como muestra la Figura 4.15., usando un recubridor de pulverización a vacío (modelo Q150T 190 ES, Quorum Technologies). El análisis de las muestras se realizó a una tensión de 15 kV.



Fig. 4.15. Muestras con metalizado de oro para microscopio electrónico de barrido

4.5.2. Caracterización de corrientes líquidas procedentes de procesos hidrolíticos y fermentativos

El análisis químico de las corrientes a las que se refiere este apartado se centra, concretamente, en el estudio de los líquidos que provienen de la caracterización de sólidos según el método de Browning y Rocha descrito en el apartado 4.5.1.2., los hidrolizados obtenidos de los tratamientos ácidos y las diferentes muestras tomadas en los ensayos de fermentación.

4.5.2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución

Esta técnica se usa para la determinación de las concentraciones de azúcares (D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa), ácidos fórmico y acético y etanol presentes en las corrientes líquidas procedentes tanto de los procesos de hidrólisis como de los fermentativos; el análisis se llevó a cabo con el cromatógrafo descrito en el apartado 4.2.11.

Dicho cromatógrafo está equipado con un software encargado de realizar el cálculo de las concentraciones de los diferentes compuestos mediante la integración del área que contiene el pico, detectado a partir de las rectas de calibrado obtenidas con patrones puros de concentración conocida, oscilando estos entre 0,00 y 0,05 g/dm³. La Tabla 4.7. muestra como ejemplo los tiempos de retención de los azúcares analizados.

Tabla 4.7. Tiempos de retención de azúcares analizados

Compuesto	Tiempo de retención (min)
D-Glucosa	11,650
D-Xilosa	13,900
L-Arabinosa	7,817

El procedimiento sería similar para la detección y análisis de inhibidores (ácidos acético y fórmico) y para el etanol como bioproducto, introduciendo para cada compuesto las rectas de calibrado correspondientes y fijando los respectivos tiempos de retención.

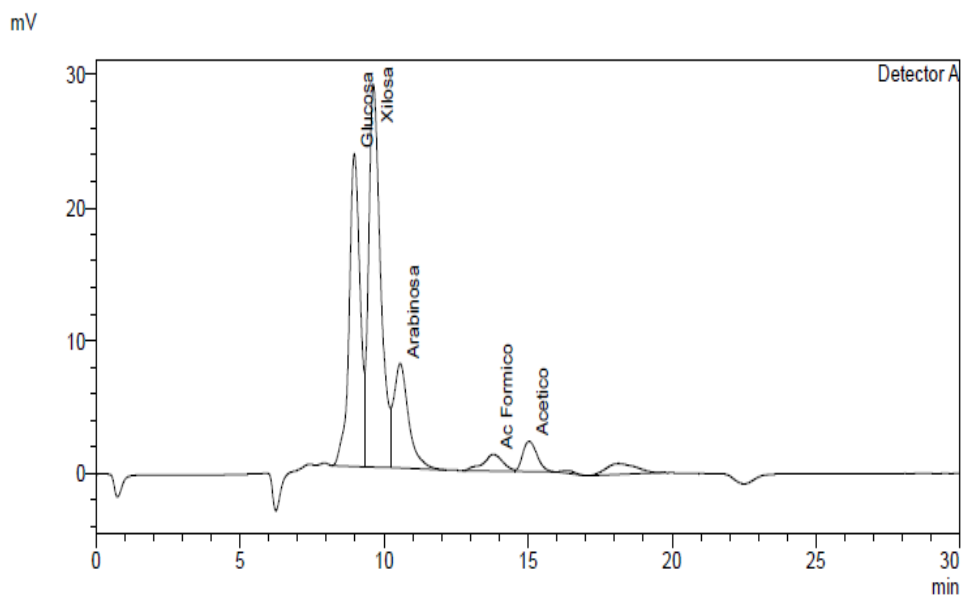
Para la realización del análisis se deberá preparar, por un lado, el eluyente, una disolución de ácido sulfúrico 0,01 N, en un matraz de 2 dm³ (555 mm³ de ácido sulfúrico y agua ultrapura hasta completar el volumen) y por otro, las muestras a analizar, realizando si procede una dilución de las mismas y su posterior filtrado con membrana de nylon de 0.22 µm. Dicha operación de filtración será de carácter obligatorio e imprescindible para garantizar el buen funcionamiento del equipo y la integridad de la columna.

La muestra filtrada se introducirá en un vial de 2 cm³ con tapón de goma convenientemente rotulado y se colocará en la bandeja portamuestras del equipo.

Una vez cargadas todas las muestras se arrancará el equipo encendiendo los instrumentos a usar, comprobando la conexión correcta del detector de trabajo (RID10-A), el régimen isocrático establecido y abriendo el software utilizado (Chromeleon).

La metodología de análisis considerará una fase de estabilización del equipo, de entre 20-30 minutos durante la cual se procederá a la purga del mismo con el eluyente establecido, el aumento progresivo del flujo de la bomba, un balance entre las células del detector y la creación de un "Batch" de trabajo que recoja el nombre, factor de dilución, método de trabajo y otras características de cada muestra.

Finalmente se obtendrá un cromatograma por muestra y una tabla de concentraciones asociadas, como el ejemplo que se muestra en la Fig. 4.16.



<Peak Table>

Peak Table				
Peak#	Name	Area	Conc.	Unit
1	Glucosa	621614	2.316	g/L
2	Xilosa	831903	3.232	g/L
3	Arabinosa	287286	1.108	g/L
4	Ac Formico	61162	0.724	g/L
5	Acetico	77630	0.630	g/L

Fig. 4.16. Cromatograma y tabla asociada de concentraciones, HPLC

4.5.2.2. Determinación de furanos y compuestos fenólicos totales

Los furanos totales se determinaron por espectrofotometría según la metodología descrita por Martínez *et al.* (2000) [120], que desarrolla un procedimiento simple basado en espectros de radiación ultravioleta (UV) para la estimación de furfural e hidroximetil furfural en hidrolizados hemicelulósicos.

Experimentalmente consiste en realizar una dilución 1:1000 del hidrolizado, filtrándolo posteriormente con membranas de nailon de 0,45 μm de diámetro de poro. Para terminar, se toman medidas de absorbancia en las regiones de 285 y 320 nm, haciendo blanco con agua destilada antes de comenzar las medidas.

Los hidrolizados hemicelulósicos contienen un solo pico dominante alrededor de 285 nm, del cual aproximadamente dos tercios se atribuyen a los furanos totales. Esto junto con las determinaciones por cromatografía líquida de alta resolución, permitieron establecer una ecuación simple para el cálculo preciso de la concentración de furanos, *FUR*, basada en la diferencia de absorbancia a 285 y 320 nm, ecuación 4.10.

$$FUR \text{ (mg/dm}^3\text{)} = (ABS_{285} - ABS_{320}) - 0,056 / 0,127 \quad (4.10)$$

Donde:

ABS_{285} : Absorbancia a 285 nm

ABS_{320} : Absorbancia a 320 nm

Por otra parte, el contenido total de compuestos fenólicos totales fue calculado por el método descrito por Folin-Ciocalteu, modificado por Fonseca *et al.* (2013) [65] donde se usa ácido cafeico como estándar.

El proceso consiste en la preparación, en primer lugar, de una curva patrón de calibrado con ácido cafeico (con diferentes disoluciones de concentraciones conocidas) que permitirá relacionar la concentración con la absorbancia a 760 nm, (ABS_{760}).

La Tabla 4.8. y la Figura 4.17. muestran los datos recogidos para la elaboración de la curva de calibrado.

Tabla 4.8. Tabla concentración-absorbancia (ABS₇₆₀) para la curva patrón de ácido cafeico

Concentración (mg/dm ³)	ABS ₇₆₀
2,0	0,111
2,5	0,134
3,0	0,168
3,5	0,218
4,0	0,263
4,5	0,299
5,0	0,332
5,5	0,362
6,0	0,398
6,5	0,445
7,0	0,482
7,5	0,533

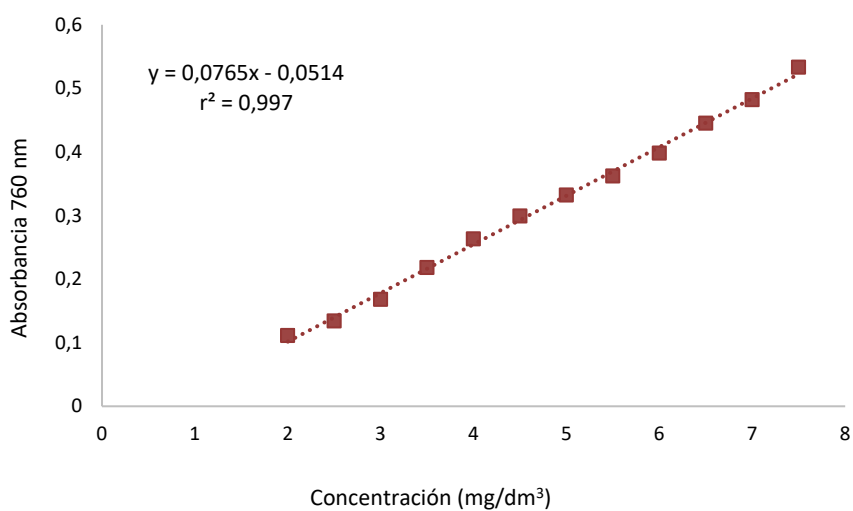


Fig. 4.17. Curva patrón de ácido cafeico- compuestos fenólicos totales

Con la ecuación obtenida (Ecuación 4.11) se calculará la concentración de compuestos fenólicos totales, FEN, de las muestras por colorimetría a partir de su absorbancia.

$$ABS_{760} = 0.0765 CFT - 0,0514 \quad (4.11)$$

Donde:

ABS_{760} : Absorbancia a 760 nm tras el procedimiento de preparación de la muestra

CFT : Concentración de compuestos fenólicos totales en mg/dm^3

Para la medición del contenido de compuestos fenólicos totales en los hidrolizados ácidos el procedimiento consistió en tomar en un tubo de ensayo 3 cm^3 de muestra, a la que se añadieron $0,2\text{ cm}^3$ de reactivo de Folin-Ciocalteu, homogeneizando la mezcla con un agitador tipo vórtex y dejándola en reposo durante 5 minutos.

Posteriormente, se añaden $0,8\text{ cm}^3$ de carbonato cálcico de concentración 150 g/dm^3 , se vuelve a agitar con vórtex y se deja reposar la muestra durante 30 minutos en ausencia de luz. Finalmente se mide la absorbancia a 760 nm y se usa la ecuación de la recta patrón para calcular la concentración de compuestos fenólicos totales.

Para la elaboración del blanco necesario se prepara un tubo adicional en el que en lugar de muestra de hidrolizado se introduce agua destilada.

4.5.3. Evaluación del crecimiento celular.

En el estudio realizado se ha evaluado el crecimiento celular a partir de la concentración de biomasa, denominada como “x”, en muestras tomadas de los matraces Erlenmeyer de fermentación a distintos tiempos en el transcurso de los experimentos.

Para calcular la concentración de biomasa a partir de la absorbancia es necesario obtener una recta de calibrado mediante la cual se ponga de manifiesto la relación lineal existente entre el peso seco y la absorbancia de la suspensión de células a 620 nm (A_{620}), cuando la absorbancia está comprendida entre los valores de 0,02 y 0,60, Bravo *et al.* (1995) [31].

Dichas rectas patrón, recogidas de investigaciones previas, vienen establecidas en el apartado 4.4.6, donde se explica el bioproceso fermentativo; no obstante, se realizó la comprobación de las mismas.

A modo de ejemplo, se explica el cálculo de la recta patrón de la levadura *Pichia stipitis*, repitiendo el proceso posteriormente de forma similar con *Pachysolen tannophilus*.

Para ello se tomaron datos en distintas muestras, tanto de la absorbancia a la longitud de onda de 620 nm, como del peso seco correspondiente. El procedimiento seguido para la determinación de este último implicó los siguientes pasos:

- Coger una muestra de 50 cm³ de cada matraz Erlenmeyer y centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos
- Lavar el residuo sedimentado obtenido dos veces con agua ultrapura para disolver las sales minerales del medio que hayan podido quedar ocluidas en el mismo
- Resuspender el residuo con el menor volumen posible de agua ultrapura (5 a 10 cm³), depositándolo en un pesasustancias previamente tarado
- Secar en estufa hasta pesada constante. La temperatura inicial de secado será de 95 °C, para evitar arrastres de material celular, pasando posteriormente a 105 °C

Los datos de absorbancia a 620 nm (ABS_{620}) y peso seco (kg/m^3) obtenidos para *Pichia stipitis* quedan recogidos en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Relación entre absorbancia de la suspensión celular a 620 nm y peso seco para *Pichia stipitis*

<i>Pichia stipitis</i>	
ABS_{620}	Peso seco (kg /m^3)
0,092	0,016
0,127	0,023
0,136	0,025
0,155	0,028
0,167	0,031
0,189	0,035
0,212	0,039
0,246	0,048
0,268	0,051
0,307	0,059
0,322	0,062
0,354	0,068
0,387	0,077
0,421	0,085
0,578	0,113

A partir de estos datos, las ecuaciones de las rectas de calibrado para la determinación del crecimiento celular se obtienen por ajuste de mínimos cuadrados, según se ejemplifica en la representación gráfica de la Figura 4.18.

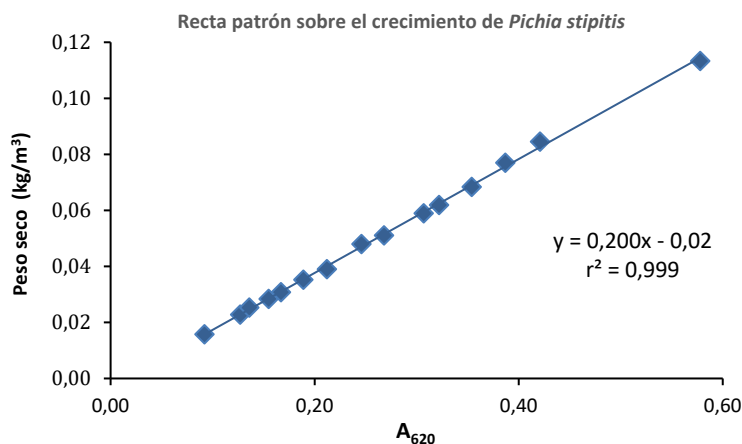


Fig. 4.18. Concentración de biomasa en peso seco frente a absorbancia a 620 nm, para *P. stipitis*

Establecidas las rectas patrón para la obtención de la concentración de biomasa, el método llevado a cabo consiste en la toma de una alícuota de muestra de entre 1 y 2 dm³, en la mayoría de los casos, de la cual se preparará una dilución (establecida según las necesidades de cada ensayo y tiempo) para la que se medirá la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm.

Tanto las diluciones como el blanco de referencia se harán con el medio de cultivo propuesto por Lindegren *et al.* (1958) [108] y modificado por Cuevas (2007) [53]. La muestra se depositará en una microcubeta de plástico que se introducirá en el espectrofotómetro Thermo Spectronic descrito con anterioridad en el apartado 4.2.13.

Una vez tomada la medida de absorbancia de la muestra diluida preparada, el resto de muestra se centrifugará a fin de separar la parte sólida del caldo de cultivo para poder analizar con posterioridad por cromatografía líquida los azúcares que se van consumiendo y la producción de etanol en cada tiempo de toma de muestra fermentativa.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5.1. Caracterización de la biomasa de poda de olivo de partida.

Para poder tener en cuenta cómo afectan los distintos tratamientos propuestos en esta tesis doctoral sobre la biomasa de poda de olivo de partida será necesario primero estudiar sus características, pues sobre ella se llevarán a cabo todos los ensayos experimentales.

Toda la biomasa de poda de olivo usada para los ensayos descritos anteriormente pertenece al mismo lote recogido en una finca de la localidad de Arjona, Jaén. La poda fue secada a temperatura ambiente, se separaron las hojas y la fracción de madera fue molida y tamizada según se describe en el apartado 4.4.2.

Una vez establecido como tamaño de trabajo el comprendido entre 0,425 y 0,600 mm (30–40 mallas ASTM), se caracterizó la biomasa de poda de olivo de partida determinando su contenido en humedad y materia volátil, y los porcentajes de celulosa, hemicelulosa, lignina, así como de grupos acetilo, siguiendo las metodologías descritas en el apartado 4.5.1.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Caracterización de la biomasa de poda de olivo de partida

	HMV %	Celulosa %	Hemicelulosa %	LIG_i (%)	Grupos acetilo %
	5,67	36,25	20,53	22,78	2,30
	5,94	36,55	20,06	22,19	2,51
	5,97	36,69	19,98	22,56	2,48
Valor Medio	5,86 ± 0,17	36,50 ± 0,41	20,19 ± 0,13	22,51 ± 0,42	2,43 ± 0,11

Humedad y material volátil (HMV) y lignina insoluble (LIG_i)

Aclarar que, como señalan algunos autores, en función del método elegido para la determinación de la fracción celulósica pueden existir variaciones en los valores de la concentración de celulosa obtenidos para biomasa de poda de olivar. Esto es debido a que, en algunos métodos de caracterización, parte de los azúcares monoméricos que se contabilizan para calcular el contenido en celulosa provienen de la fracción hemicelulósica o incluso del parénquima celular, Mateo *et al* (2013b) [123].

La biomasa de poda de olivo de partida muestra algunas características comparables con otros cultivos agrícolas y especies leñosas ampliamente difundidas industrialmente.

En el presente trabajo experimental, la hemicelulosa de la materia prima considerada representó un $20,19 \pm 0,13\%$ en base seca (Tabla 5.1.), contenido inferior a los valores publicados para los residuos de mazorca de maíz (25-35%) o paja de trigo (26-32%), Howard *et al.* (2003) [80], Cherubini y Ulgiati (2010) [44], pero con un alto porcentaje del componente mayoritario, la celulosa, $36,50 \pm 0,41\%$, en este caso representando un porcentaje similar a otras biomásas lignocelulósicas como el carrizo (35%), Scordia *et al.* (2012) [173], ampliamente utilizadas industrialmente para la obtención de biocombustibles mediante procesos hidrolíticos y fermentativos.

Por lo tanto, considerando la posibilidad de obtención de azúcares monoméricos mediante hidrólisis ácida, tanto de la fracción celulósica como hemicelulósica, la biomasa de poda de olivar se postula como una materia prima interesante para la producción de etanol por vía fermentativa.

Por otra parte, el contenido de lignina insoluble en ácido en base seca ($22,51 \pm 0,42\%$) de la biomasa de poda de olivar de partida se encuentra en el rango de concentración publicado por otros autores para otras biomásas lignocelulósicas como es el caso del bagazo de caña de azúcar (15-25%), Kumar *et al.* (2009) [96] o la paja de arroz (12-23%), Saha (2003) [163].

Con respecto a la presencia de grupos acetilo, se ha encontrado que estos dificultan los procesos de deconstrucción de la biomasa ya que tienen un papel importante en los mecanismos de inhibición de microorganismos, al contribuir a la toxicidad de los hidrolizados.

Uno de los inhibidores más importantes sería el ácido acético, que se formaría por desacetilación de las hemicelulosas de la biomasa original durante el tratamiento de hidrólisis acida. La presencia de grupos acetilo en la biomasa de poda de olivo de partida es de un $2,43 \pm 0,11\%$, por lo que la aplicación de pretratamientos que eliminen total o parcialmente estos grupos de la biomasa podrían mejorar, en última instancia, la etapa fermentativa.

Se determinó, además, tanto el contenido en cenizas como en extractos acuosos y etanólicos, recogidos en las Tablas 5.2 y 5.3. respectivamente:

Tabla 5.2. Cenizas totales de la biomasa de poda de olivo de partida

	Residuo seco (g)	Cenizas (g)	% Cenizas
	1,00	0,026	2,55
	0,96	0,024	2,41
	0,98	0,026	2,64
Valor Medio	$0,98 \pm 0,02$	$0,025 \pm 0,01$	$2,53 \pm 0,1\%$

Tabla 5.3. Extractos acuosos y etanólicos de la biomasa de poda de olivo de partida

	Extractos acuosos (%)	Extractos etanólicos (%)
	14,75	1,51
	14,09	1,63
	16,81	1,55
Valor Medio	$15,22 \pm 1,42\%$	$1,56 \pm 0,06\%$

Finalmente, hay que indicar, para completar el estudio relacionado con aspectos sobre la caracterización de la materia prima, que este material podría presentar un contenido significativo de compuestos fenólicos (no determinados en la presente investigación) al analizar la información recogida en trabajos previos por otros autores, Salido *et al.* (2015) [165], para una materia de partida similar a la empleada en este trabajo experimental, los citados datos vienen reflejados en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Compuestos fenólicos en poda de olivo de variedad 'Picual'

Compuesto fenólico	Concentración, g/kg
Oleuropeína	42,30
(+)-1-hidroxipinoresinol 1-O-β-D-glucopiranosido	38,99
Jaspoliósido	38,32
Ligustrósido	35,00
Jaspolianósido	26,31
(-)-olivil	20,70
(-)-olivil 4-O-β-D-glucopiranosido	19,20
Forma aldehídica de la oleuropeínaaglicona	17,92
2''-hidroxioleuropeína	15,57
Eriodictiol	7,420
Tirosol	0,92
Hidroxitirosol	0,34

Además de realizar la caracterización en cuanto a composición química de la biomasa de poda de olivo de partida, fueron tomadas una serie de imágenes en el microscopio electrónico de barrido de alta resolución para tener más información acerca de la morfología de la misma y así poder observar cómo los diferentes tratamientos afectan a su integridad.

En la Figura 5.1. se muestra la estructura superficial de la materia prima estudiada observada considerando diferentes aumentos y bajo distintas perspectivas.

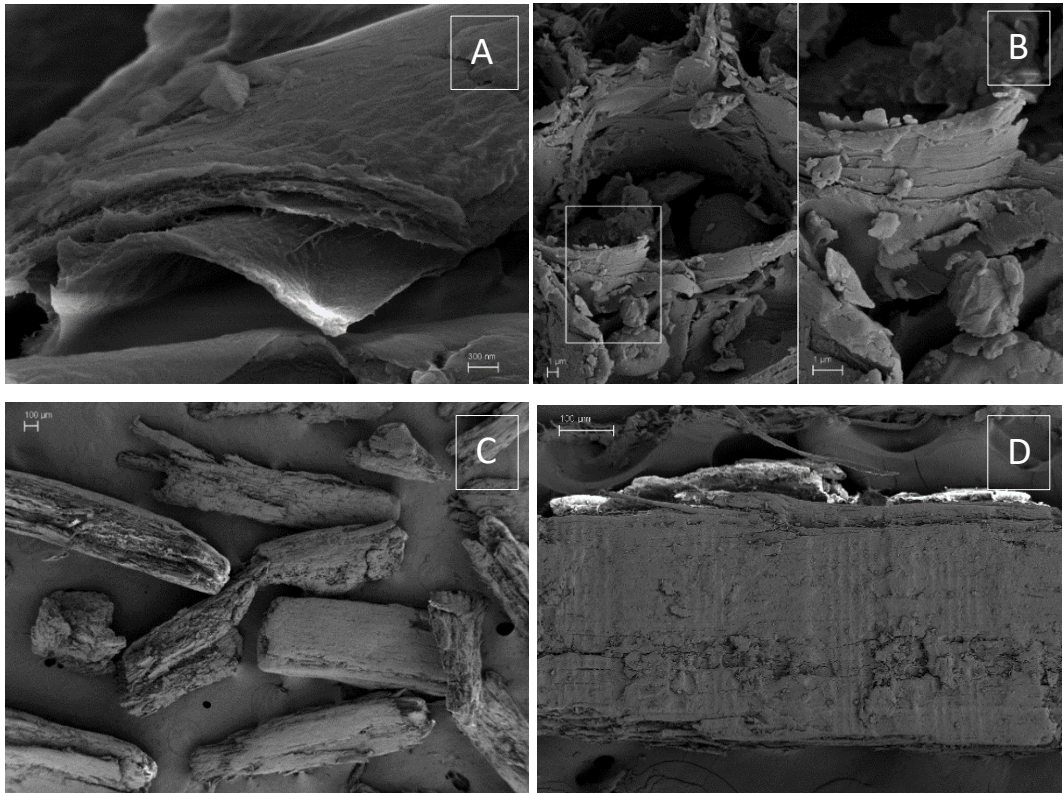


Fig. 5.1 A) Biomasa de poda de olivo en polvo; B) biomasa de poda de olivo de partida (0,425-0,600 mm); C) superficie de la viruta de poda de olivo de partida; D) compactación de la estructura interna

La microscopía electrónica evidenció una estructura superficial de la biomasa de poda de olivo bastante compacta (B y D), con zonas de aspecto irregular (C) y en la que se diferenciaban capas altamente comprimidas, rígidas y bien definidas (A).

5.2. Hidrólisis ácida de la biomasa de poda de olivo de partida

Para llevar a cabo los tratamientos de hidrólisis con ácido oxálico de la biomasa de poda de olivo de partida se utilizó el diseño experimental modelo Box-Behnken 3² y la metodología descritos en el apartado 4.4.3.

Para establecer el rango de valores en las variables de estudio fijadas, concentración de ácido oxálico (de 0,050 a 0,100 M) y temperatura (de 130 a 170 °C), se tuvieron en cuenta los ensayos realizados por otros investigadores, Chimentão *et al.* (2014) [45], Scordia *et al.* (2011) [173] y Zhang *et al.* (2013) [209], los cuales trabajaron con celulosa comercial y distintos tipos de biomásas como son el carrizo o caña gigante y la madera de arce, respectivamente. En la citada bibliografía los valores para las variables concentración de ácido oxálico y temperatura oscilaron entre 3%-6% en peso de concentración de ácido oxálico y 100 °C para la celulosa comercial; del 2% al 10% de ácido y entre 150 y 190 °C para el carrizo y se trabajó en el rango de 0,5% al 2% de concentración del mencionado ácido y 160 °C en el caso de la madera de arce.

Por otra parte, a la hora de trabajar con procesos hidrolíticos se considera adecuado el uso de una variable denominada “Factor de Severidad”, R_o , como medida de la severidad de los tratamientos en base a las condiciones experimentales empleadas.

El factor de severidad es un parámetro que trata de unir en una sola variable los efectos sinérgicos que producen de forma conjunta la temperatura y el tiempo usados durante el tratamiento. El objetivo es la simplificación de la interpretación de los datos experimentales a través de las dos variables operacionales más influyentes.

Fue descrita por Overend y Chornet (1987) [222] mediante la expresión 5.1.

$$R_0 = \int_0^t e^{\frac{T(t)-T_{ref}}{w}} dt \quad (5.1)$$

Donde:

T = temperatura del sistema de reacción, °C

t = tiempo de tratamiento en minutos

T_{ref} = temperatura de referencia, 100 °C.

w = parámetro empírico relacionado con la energía de activación.

La temperatura de referencia empleada para el cálculo del factor severidad comúnmente aceptada es de 100 °C, Abatzoglou *et al.* (1992) [1], Lloyd y Wyman (2005) [113].

En cuanto al parámetro “ w ” en función del material a tratar puede tomar diferentes valores. En la Tabla 5.5. se muestran algunos de estos valores para diferentes materiales biomásicos.

Tabla 5.5. Valores del parámetro “ w ” para diferentes materiales lignocelulósicos

Material	w	Referencia
Tallo de maíz	10,00	Abatzoglou <i>et al.</i> (1992) [1]
Rastrojo de maíz	14,75	Lloyd y Wyman (2005) [113]
Bagazo de caña de azúcar	14,75	Carvalho <i>et al.</i> (2017) [37]
Paja de caña de azúcar	14,75	Carvalho <i>et al.</i> (2017) [37]
Esparto	9,40	Abatzoglou <i>et al.</i> (1992) [1]
Madera de eucalipto	14,75	Carvalho <i>et al.</i> (2017) [37]
Madera de álamo	8,34	Abatzoglou <i>et al.</i> (1992) [1]
Madera de abedul	9,60	Abatzoglou <i>et al.</i> (1992) [1]
Hueso de aceituna	14,75	Fernández-Bolaños <i>et al.</i> (2001) [63] Cuevas <i>et al.</i> (2009) [54]
Poda de olivo	14,75	Moya (1997) [127], García <i>et al.</i> (2010) [69], Mateo (2011) [121]

Teniendo en cuenta la bibliografía mencionada en la Tabla 5.5, para el cálculo del factor de severidad del tratamiento se ha considerado un valor del parámetro “w” de 14,75.

En algunos estudios, en lugar de utilizar el término “factor de severidad” referido a R_0 , este se usa en su forma logarítmica, $\log R_0$, que será también una expresión muy habitual para tratar dicho factor.

Con objeto de mejorar el análisis de datos, muchos autores como, Chum *et al.* (1990b) [47], Abatzoglou *et al.* (1992)[1], Lloyd y Wyman (2005)[113], Lee y Jeffries (2011)[104] o Moya *et al.* (2016b)[130], introducen en sus estudios el denominado **factor de severidad combinado o CSF** (empleando sus siglas en inglés: combined severity factor), el cual permite la comparación de un amplio número de datos a través de la combinación de las variables de operación: tiempo, temperatura y, adicionalmente, introducen el efecto de la concentración de ácido de manera indirecta a través de la medida del pH. De esta forma, la ecuación 5.1 quedaría según se establece en la ecuación 5.2.

$$CSF = \log R_0 - pH \quad (5.2)$$

Además, de acuerdo con autores como Mateo (2011) [121], el factor de severidad combinado debe ser adaptado para un sistema donde se considera la temperatura en función del tiempo de residencia en el reactor, quedando por tanto la ecuación 5.2 como:

$$CSF = \log \left(\int_0^t e^{\frac{T_s(t) - T_{ref}}{w}} dt \right) - pH \quad (5.3)$$

Donde:

$T_s(t)$: temperatura del sistema de reacción para un determinado tiempo de tratamiento.

Para trabajar con el factor de severidad combinado o severidad combinada es necesario realizar la toma de datos de temperatura a diferentes tiempos durante el desarrollo del ensayo de hidrólisis ácida, en el cual aparecerán tres etapas: calentamiento, mantenimiento y enfriamiento, además de la medida del pH del hidrolizado obtenido.

Esos datos serán tratados matemáticamente obteniendo ajustes lineales y polinómicos que darán lugar a tres ecuaciones para obtener el valor del factor de severidad en cada una de las etapas.

La Figura 5.2. muestra un ejemplo de las gráficas y datos obtenidos en una de las hidrólisis ácidas realizadas con la biomasa de poda de olivo de partida, concretamente la llevada a cabo a 130 °C y 0,05 M de concentración de ácido oxálico, correspondiente al ensayo OXA-1 en el cual se obtuvo un $\log R_0$ de 2,29 y un CSF de 0,98; el resto de los ensayos del diseño de experimentos, junto con los cálculos realizados, quedan recogidos en el Apéndice A, de datos experimentales de hidrólisis.

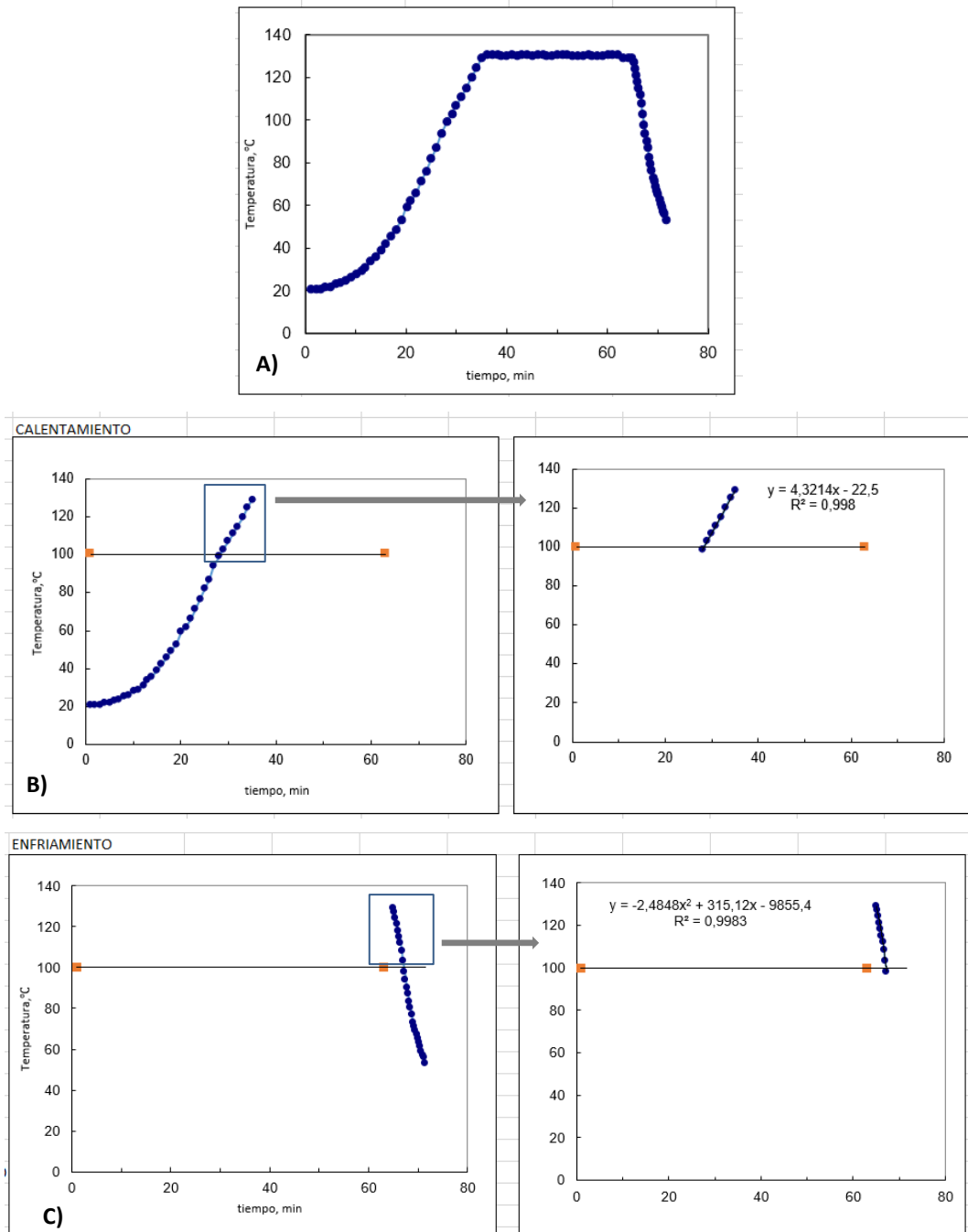


Fig. 5.2. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-1. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

En la Fig. 5.2. A) se observa el proceso general con las tres etapas descritas bien diferenciadas, una etapa inicial de ascenso de temperatura con una duración aproximada de 35 minutos, la etapa de hidrólisis propiamente dicha, de temperatura estable y 30 minutos de duración y, por último, la etapa de enfriamiento mucho más corta que las anteriores, de unos 10 a 12 minutos, donde la temperatura cae rápidamente gracias al sistema de refrigeración y la inmersión del cuerpo del reactor en hielo.

En las Figuras 5.2. B y C se puede observar como para la obtención de las ecuaciones que proporcionarán el valor del factor de severidad combinado junto con el valor de la bondad del ajuste obtenido, se toma la parte del gráfico ampliada, a partir de la temperatura de referencia de 100 °C. Dichas ecuaciones permitirán obtener el valor final para cada una de las diferentes etapas del proceso, la suma de los factores de severidad parciales para cada etapa proporcionará el valor final del factor de severidad para el proceso hidrolítico.

Una vez calculado el factor de severidad combinado de cada ensayo contemplado en el diseño experimental propuesto, se procedió a la caracterización tanto de cada sólido recuperado como de cada uno de los hidrolizados ácidos obtenidos.

En este sentido, la Tabla 5.6. recoge los datos correspondientes a la caracterización en cuanto a los contenidos en D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa y azúcares totales presentes en los hidrolizados ácidos obtenidos de cada uno de los ensayos del diseño experimental (Tabla 4.1.).

Tabla 5.6. Caracterización de hidrolizados en contenido en azúcares simples (g/dm³)

Ensayo	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	Azúcares totales
OXA -1	8,325	5,175	4,740	18,240
OXA -2	9,650	9,155	5,965	24,770
OXA -3	12,236	13,281	6,261	31,778
OXA -4	15,675	16,135	5,620	37,430
OXA -5	16,640	16,575	5,165	38,380
OXA -6	15,800	16,995	5,100	37,895
OXA -7	13,080	16,860	5,540	35,480
OXA -8	10,828	16,180	5,248	32,256
OXA -9	8,783	15,535	5,898	30,216

Además del contenido de los azúcares simples más relevantes, de cada hidrolizado ácido fueron determinadas las concentraciones de los principales inhibidores presentes, entendiendo como tales a los compuestos furánicos totales, compuestos fenólicos totales y ácidos acético y fórmico.

La Tabla 5.7. recoge las concentraciones obtenidas de cada inhibidor junto con los valores del factor de severidad y el factor de severidad combinado para cada ensayo del diseño.

Tabla 5.7. Valor de CSF e inhibidores de los hidrolizados del diseño experimental

Ensayo	Condiciones		Severidad		Inhibidores, g/dm ³			
	T, °C	Ácido oxálico, M	log Ro	CSF	Furanos totales	CFT	Ácido acético	Ácido fórmico
OXA-1	130	0,050	2,29	0,88	0,20	2,79	0,845	0,405
OXA-2	130	0,075	2,30	1,01	0,29	2,83	1,745	0,685
OXA-3	130	0,100	2,56	1,11	0,38	2,92	2,284	1,049
OXA-4	150	0,050	2,76	1,51	0,44	3,49	2,825	1,910
OXA-5	150	0,075	2,88	1,56	0,63	3,69	2,870	2,345
OXA-6	150	0,100	3,02	1,66	0,84	3,77	2,910	2,475
OXA-7	170	0,050	3,63	1,77	2,24	4,62	3,150	3,620
OXA-8	170	0,075	3,80	1,84	3,00	4,63	3,256	3,852
OXA-9	170	0,100	3,95	1,97	3,63	4,85	3,119	4,450

CFT: compuestos fenólicos totales

La Figuras 5.3. y 5.4. muestran los ajustes para las concentraciones, en el primer caso, de los principales azúcares (D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa y azúcares totales) y en el segundo caso, de los inhibidores (furanos totales, compuestos fenólicos totales, ácido acético (AcH) y ácido fórmico) presentes en los hidrolizados ácidos, obtenidos de biomasa de poda de olivo de partida, frente al valor del CSF para los nueve ensayos del diseño experimental establecido.

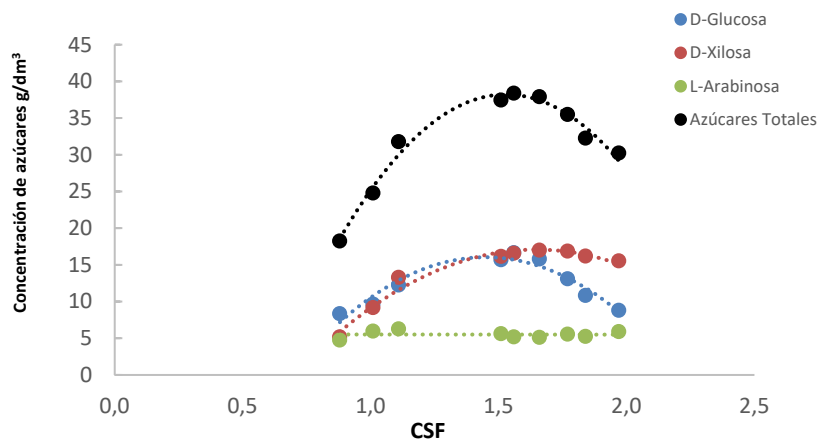


Fig. 5.3. Representación de la concentración de azúcares frente al factor de severidad combinado (CSF)

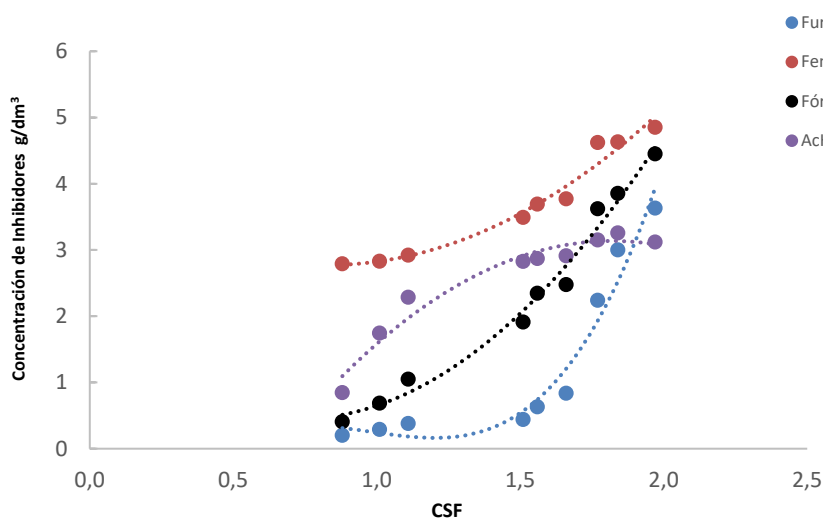


Fig. 5.4. Representación de la concentración de inhibidores frente al valor de CSF

Los ajustes establecidos en las Figura 5.3. y 5.4. han permitido estudiar la evolución tanto de la producción de azúcares simples como del contenido en azúcares totales y determinar el valor de CSF más adecuado con el fin de maximizar la solubilización de los principales azúcares analizados sin una producción excesiva de compuestos inhibidores.

Atendiendo a las representaciones recogidas la Figura 5.3., los máximos valores de azúcares se obtuvieron cuando se llevaron a cabo tratamientos con ácido oxálico con un valor de CSF en el rango 1.5–1.6. Para valores del factor de severidad combinado superiores a los establecidos en el rango anterior, se evidenció una caída muy pronunciada en la concentración de D-glucosa, como consecuencia de la degradación de este azúcar, mientras que la D-xilosa experimentó un menor proceso degradativo para valores de severidad superiores al intervalo comentado.

Por otra parte, según la Figura 5.4., la concentración de inhibidores aumentó significativamente para valores CSF superiores a 1,6, lo que implicaría, como se indicó con anterioridad, mecanismos de degradación de los azúcares predominantes (D-xilosa y D-glucosa) para originar compuestos furánicos en los hidrolizados ácidos. Además, se generaría ácido acético por la hidrólisis de los grupos acetilo de las hemicelulosas y aparecerían compuestos fenólicos como consecuencia de la degradación parcial de la lignina presente en la biomasa de poda de olivo de partida, Jönsson (2016) [85].

Mencionar también que, comparando el contenido en D-glucosa y D-xilosa obtenido en los hidrolizados ácidos de la presente investigación con otros trabajos previos de hidrólisis partiendo del mismo tipo de biomasa, pero con hoja, Mateo *et al.* (2014) [124], se evidencian menores diferencias entre las concentraciones de D-glucosa y D-xilosa en el presente estudio que en los trabajos llevados a cabo con biomasa de poda de olivo con hoja, en los que la D-glucosa siempre predomina claramente sobre la D-xilosa. Una posible explicación podría basarse en el hecho de la biomasa con fracción de hoja contaría con el aporte adicional de esta hexosa proveniente de fracción de extractos (bastante significativa) y/o partes no cristalinas de la celulosa de la hoja.

Además, la medida del pH de los correspondientes hidrolizados proporcionó un valor medio de pH de $1,4 \pm 0,3$; este bajo valor del parámetro, aparte de deberse a las características propias del ácido usado en el proceso hidrolítico, pudo ser causado por la despolimerización de oligómeros a formas monoméricas de azúcares y a la acumulación de compuestos de degradación tóxicos, como consecuencia de las condiciones de severidad alcanzadas, Scordia *et al.* (2011) [173].

Por tanto, atendiendo a los resultados experimentales derivados de los tratamientos hidrolíticos con ácido oxálico de la materia prima, las mejores condiciones de trabajo se alcanzaron para una temperatura de 150 °C y una concentración de ácido oxálico de 75 mM.

Por otra parte, los ensayos de confirmación de los valores más adecuados de las variables independientes permitieron obtener un hidrolizado con las siguientes concentraciones (g/dm³): 16,64 de D-glucosa, 15,05 de D-xilosa, 5,16 de L-arabinosa, 2,87 de ácido acético, 3,18 de compuestos fenólicos y 0,96 de furanos.

Además de caracterizar los hidrolizados ácidos también fueron caracterizados los sólidos resultantes (tras ser secados a temperatura ambiente hasta presentar un contenido en humedad inferior al 10%) a fin de determinar el contenido, en base seca, de celulosa, hemicelulosa y lignina presente en ellos tras el proceso hidrolítico al que habían sido sometidos, quedando los datos recogidos en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8. Caracterización de los sólidos resultantes de la hidrólisis con ácido oxálico de la biomasa de poda de olivo de partida

Sólido resultante del ensayo	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina %	Grupos acetilo %
OXA-1	49,95	10,50	33,16	0,00
OXA-2	49,59	9,01	32,13	0,00
OXA-3	49,06	6,36	32,45	0,00
OXA-4	50,95	0,68	31,89	0,00
OXA-5	49,60	0,27	31,71	0,00
OXA-6	52,78	0,00	31,83	0,00
OXA-7	50,87	0,00	32,07	1,83
OXA-8	50,38	0,00	32,26	0,36
OXA-9	50,99	0,00	32,24	0,00

De la caracterización de los sólidos resultantes de la hidrólisis ácida de la biomasa de poda de partida se puede observar como el contenido en celulosa de los mismos oscila entre un 49,06 y un 52,78%; el de hemicelulosa es inferior al 10% en la mayoría de los casos, haciéndose nulo por encima de las condiciones establecidas como más favorables (OXA-5) o lo que es lo mismo cuando el CSF supera el valor de 1,56 y la lignina se mantiene estable en un rango entre 31,71% y 33,16%. Por otra parte, se puede ver como la citada hidrólisis consigue la eliminación del ácido acético presente prácticamente en todos los sólidos obtenidos de los ensayos que conforman el diseño experimental, apareciendo de forma vestigial solo en dos casos.

Una vez realizado el tratamiento de hidrólisis ácida y caracterizados tanto los sólidos como los líquidos, los primeros fueron guardados en bolsas antihumedad para su uso en ensayos de otra índole, mientras que con los hidrolizados obtenidos se procedió a su fermentación.

5.2.1. Fermentación de hidrolizados ácidos de la materia prima

Como se ha podido comprobar, los hidrolizados obtenidos mediante el tratamiento con ácido oxálico de la biomasa de poda de olivo de partida se caracterizan por ser ricos en D-xilosa y D-glucosa, principalmente, pero a la vez, se producen durante el proceso otros componentes no deseables. Por tal motivo, en ocasiones, al realizar determinados tratamientos se deberá realizar la selección de los hidrolizados a fermentar, llegando a un compromiso entre altos rendimientos en monosacáridos y bajas concentraciones de componentes inhibidores.

Los primeros ensayos fermentativos del presente trabajo experimental se realizaron tanto de los nueve hidrolizados que se obtienen al aplicar las condiciones establecidas en el diseño de experimentos, como del hidrolizado en las condiciones óptimas obtenidas.

Antes del inicio de la fermentación, los hidrolizados fueron sometidos al proceso de acondicionamiento descrito en los apartados 4.4.5. y 4.4.6., constando el mismo de una fase de centrifugación para la eliminación de sólidos en suspensión, un ajuste de pH y la adición de nutrientes, a fin de favorecer el proceso fermentativo.

Las Figuras 5.5. y 5.6. recogen los datos, a modo de ejemplo, de dos fermentaciones de hidrolizados, obtenidos a partir de poda de olivo de partida, que han sido seleccionados por los siguientes motivos: el hidrolizado correspondiente al ensayo OXA-4 (con un valor de CSF de 1,51) por poseer un factor de severidad límite para la obtención de líquidos fermentables (desde OXA-1 hasta OXA-4) con la levadura *P. stipitis* CBS 6054 y el hidrolizado ácido correspondiente al experimento OXA-5, con un factor de severidad combinado (1,56) que condicionó el que ni este hidrolizado ni los obtenidos para tratamientos con CSF superior (OXA-6 hasta OXA-9) se pudieran fermentar. Los datos del resto de ensayos se encuentran en el Apéndice B, de datos experimentales de fermentación.

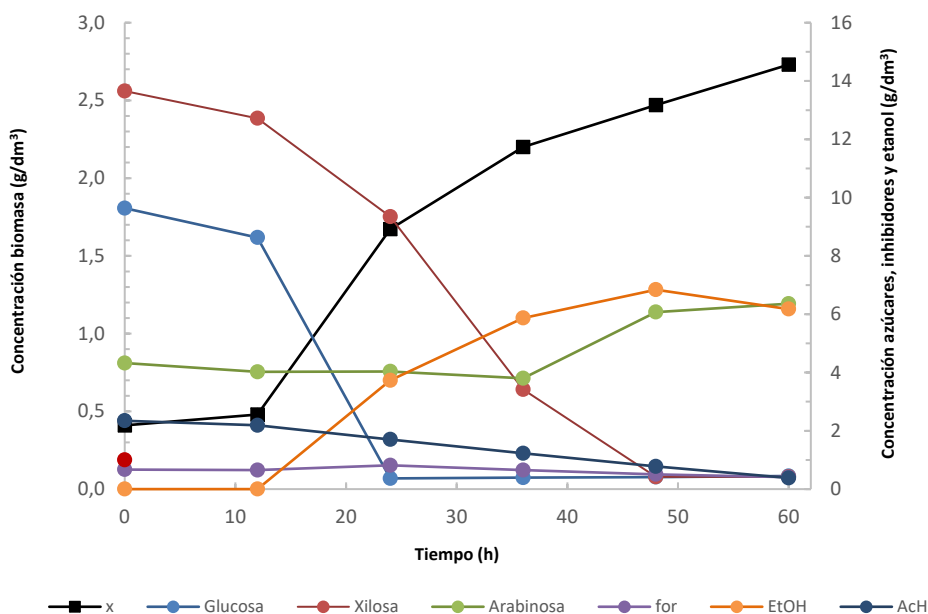
Los valores de concentración de azúcares, inhibidores y bioproductos fueron obtenidos mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, mientras que para calcular la concentración de biomasa (x) se seguirá el procedimiento descrito en el apartado 4.5.3., en el cual, mediante una medida del crecimiento celular a una absorbancia a 620 nm y la recta patrón de crecimiento propia de la levadura, se obtendrá la concentración correspondiente en g/dm^3 .

Tanto la Tabla 5.9. como la Figura 5.5. muestran la evolución de la cantidad de azúcares, inhibidores, concentración de etanol y el crecimiento de la biomasa a lo largo del tiempo durante el ensayo fermentativo del hidrolizado del tratamiento OXA-4, que se obtuvo usando biomasa de poda de olivo de partida y cuyo CSF es de 1,51.

Tabla 5.9. Evolución temporal de la concentración (g/dm^3) de biomasa, azúcares, inhibidores y bioetanol durante la fermentación del hidrolizado del ensayo OXA-4

t, h	x	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	For	AcH	Etanol	S_T
0	0,410	9,637	13,655	4,324	0,671	2,344	0,000	27,62
12	0,480	8,630	12,719	4,023	0,653	2,189	0,000	25,37
24	1,672	0,367	9,345	4,035	0,817	1,702	3,731	13,75
36	2,200	0,395	3,418	3,801	0,651	1,229	5,868	7,61
48	2,470	0,412	0,421	6,072	0,506	0,779	6,840	6,91
60	2,730	0,449	0,424	6,360	0,410	0,383	6,177	7,23

t: tiempo en horas, x: Concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3), S_T: azúcares totales (g/dm^3)



x: Concentración de biomasa (g/dm³), For: ácido fórmico (g/dm³), EtOH: etanol (g/dm³), AcH: ácido acético (g/dm³)

Fig. 5.5. Ensayo fermentativo del hidrolizado derivado del tratamiento OXA-4, (CSF= 1,51) obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida

De los datos recogidos en el ensayo OXA-4, con un CSF de 1,51, se puede observar cómo los principales azúcares (D-xilosa y D-glucosa) son prácticamente consumidos en un breve espacio de tiempo (60 horas) mientras que la L-arabinosa no es asimilada por la levadura *P. stipitis* CBS 6054. Además, mientras que el ácido acético ha servido como sustrato de la levadura, el ácido fórmico no ha sido asimilado en ninguna extensión.

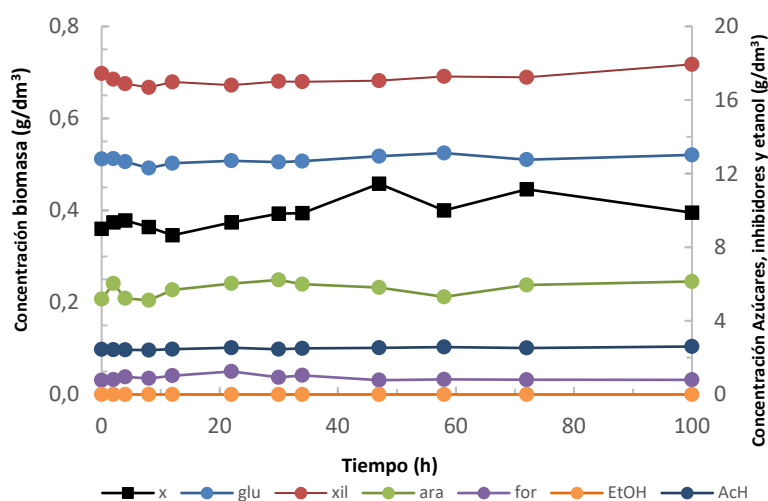
La concentración máxima de etanol obtenida en este ensayo de fermentación fue de 6,84 g/dm³, a las 48 horas de su inicio.

La Tabla 5.10. y la Figura 5.6. muestran los datos correspondientes a la fermentación de hidrolizados derivados del tratamiento OXA-5, que ha sido obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida y cuyo CSF fue de 1,56.

Tabla 5.10. Evolución temporal de la concentración (g/dm³) de biomasa, azúcares, inhibidores y bioetanol para la fermentación del hidrolizado del ensayo OXA-5

t, h	x	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	For	AcH	EtOH	St
0	0,360	12,799	17,441	5,178	0,770	2,454	0,000	35,42
2	0,374	12,815	17,121	6,030	0,811	2,433	0,000	35,97
4	0,378	12,652	16,882	5,221	0,957	2,427	0,000	34,76
8	0,364	12,298	16,686	5,121	0,873	2,410	0,000	34,10
12	0,346	12,564	16,981	5,683	1,022	2,461	0,000	35,23
22	0,374	12,698	16,804	6,030	1,252	2,541	0,000	35,53
30	0,393	12,628	17,012	6,223	0,931	2,455	0,000	35,86
34	0,394	12,678	16,991	5,989	1,040	2,504	0,000	35,66
47	0,458	12,946	17,050	5,814	0,777	2,537	0,000	35,81
58	0,400	13,118	17,278	5,302	0,820	2,579	0,000	35,70
72	0,446	12,758	17,233	5,948	0,802	2,528	0,000	35,94
100	0,395	13,014	17,937	6,137	0,798	2,608	0,000	37,09

t: tiempo en horas, x: concentración de biomasa (g/dm³), For: ácido fórmico (g/dm³), AcH: ácido acético (g/dm³), EtOH: etanol (g/dm³), St: azúcares totales (g/dm³)



x: Concentración de biomasa (g/dm³), glu: D-glucosa (g/dm³), xil: D-xilosa (g/dm³), ara: L-arabinosa (g/dm³), For: ácido fórmico (g/dm³), EtOH: etanol (g/dm³), AcH: ácido acético (g/dm³)

Fig. 5.6. Ensayo fermentativo del hidrolizado derivado del tratamiento OXA-5, (CSF= 1,56) obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida

Como ya se ha expuesto y se puede observar en los datos ofrecidos con anterioridad, las condiciones de severidad determinadas por las condiciones experimentales del ensayo OXA-5 (CSF= 1,56) ponen de manifiesto la incapacidad de la levadura *P. stipitis* CBS 6054 para fermentar dicho hidrolizado (conteniendo 2,9 g/dm³ de ácido acético, 0,63 g/dm³ de furanos y 3,69 g/dm³ de compuestos fenólicos totales), ya que no existe ni crecimiento celular, ni consumo de sustrato y por tanto no se genera bioproducto.

Kundu *et al.* (2014) [100], señalaron que para concentraciones de furanos y compuestos fenólicos totales de 5,5 g/dm³ y 4 g/dm³, respectivamente, *P. stipitis* mostró un descenso en su actividad catabólica.

Algunos estudios recogen, además, que la fermentación a etanol no es satisfactoria si las concentraciones de hidroximetil furfural, furfural y ácido acético en el hidrolizado son superiores a 1,0; 1,0 y 2,0 g/dm³, respectivamente, Guo *et al.* (2008) [75], Kim *et al.* (2016) [90].

En relación al resto de ensayos fermentativos de los hidrolizados ácidos obtenidos, cuyos datos, como ya se ha mencionado, se encuentran recogidos en el Apéndice B, cabe destacar que en la fermentación del hidrolizado correspondiente al ensayo OXA-1 (CSF= 0,88) la cantidad de etanol máxima producida fue de 5,3 g/dm³ a las 30 horas; en la fermentación del hidrolizado obtenido del ensayo OXA-2 (CSF= 1,01) esta cantidad fue de 5,1 g/dm³ a las 36 horas y en el ensayo fermentativo correspondiente al hidrolizado OXA-3 (CSF= 1,11) se obtuvo un máximo de 4,9 g/dm³ de etanol a las 34 horas. Estos datos fermentativos ponen de manifiesto cómo, en general, un mayor valor del CSF de los tratamientos ácidos implica la obtención de hidrolizados cuya fermentación genera una menor producción de etanol, empleándose para ello tiempos localizados en el intervalo de 30 a 36 horas.

En cuanto al tratamiento de los datos primarios obtenidos a partir de las Figuras 5.5. y 5.6. y Tablas de fermentación 5.9. y 5.10., se han calculado tanto el rendimiento como la productividad en bioetanol para realizar el estudio comparativo de resultados.

El rendimiento en etanol fue calculado mediante la ecuación (5.4) y el porcentaje sobre el rendimiento teórico máximo total (%RTT) usando la ecuación (5.5); el citado rendimiento teórico máximo que puede calcularse en función de la estequiometría de la reacción y cuyo valor se sitúa en 0,515.

$$Y_{E/S} = \frac{\text{Etanol producido (g)}}{\text{Sustrato total consumido (g)}} \quad (5.4)$$

$$\% RTM = \frac{Y_{E/S}}{Y_E^{Máx}} \quad (5.5)$$

La productividad en etanol, en g/(dm³ h), ha sido calculada mediante la ecuación (5.6).

$$q_E = \frac{\text{Concentración de etanol } (\frac{g}{dm^3})}{\text{Tiempo (h)}} \quad (5.6)$$

La Tabla 5.11. recoge, para los cultivos donde ha tenido lugar la fermentación, los datos de tiempo dónde la concentración de etanol fue máxima (horas), la concentración máxima de etanol (E_{max} , g/dm³), el porcentaje de azúcares totales consumidos (S_{cons} , %), el rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$, g/g) y la productividad de etanol (q_E , g/dm³ h), para las fermentaciones realizadas.

Tabla 5.11. Parámetros de fermentación en hidrolizados ácidos de biomasa de poda de olivo de partida

Ensayo	T, °C	Oxálico (M)	CSF	tiempo (h)	E_{max}	% S_{cons}	$Y_{E/S}$	q_E	%RTM
OXA-1	130	0,050	0,88	30	5,3	69,6	0,40	0,18	77,67
OXA-2	130	0,075	1,01	36	5,1	86,8	0,37	0,14	71,85
OXA-3	130	0,100	1,11	34	4,9	56,0	0,32	0,14	62,14
OXA-4	150	0,050	1,51	48	6,8	73,1	0,27	0,10	52,43

E_{max} : Concentración máxima de etanol, g/dm³; % S_{cons} : porcentaje de azúcares totales consumidos; $Y_{E/S}$: rendimiento de etanol (g/g) y q_E : productividad de etanol (g/dm³ h); %RTM: porcentaje sobre el rendimiento teórico máximo.

Como se puede observar, en general, al aumentar el CSF correspondiente al tratamiento hidrolítico, el tiempo de fermentación necesario para obtener una concentración máxima de etanol se incrementa, pasando de las 30 horas que tarda en alcanzar el máximo el ensayo con CSF= 0,88, a las 48 horas que tarda en alcanzarlo el ensayo con CSF=1,51.

La mayor concentración de etanol (6,8 g/dm³) se obtienen en el ensayo OXA-4, de mayor severidad, sin embargo, los mejores rendimientos en etanol (0,40 g/g) y su productividad (0,18 dm³ h) se obtienen en el tratamiento con ácido oxálico con CSF= 0,88, siendo el de menor severidad.

A partir de un CSF de 1,51, y probablemente debido a la cantidad de inhibidores presentes, el proceso fermentativo no puede llevarse a cabo.

5.3. Tratamientos químicos específicos empleados

5.3.1. Pretratamiento con hidróxido de sodio: hidrólisis y fermentación

En este apartado se recogen los resultados experimentales obtenidos en el proceso de hidrólisis con ácido oxálico y posterior fermentación con las levaduras *P. stipitis* CBS 6054 y *P. tannophilus* ATCC 32691, cuando la biomasa de poda de olivo de partida se sometió a un tratamiento con hidróxido de sodio previo a estas etapas.

El principal fin de dicho pretratamiento es obtener un material residual (sólido tratado), tras el proceso químico con NaOH, cuyas características sean las más adecuadas para ser este sometido posteriormente a un ataque ácido y, finalmente, a la fermentación del hidrolizado. El pretratamiento podría contribuir a la reducción y/o eliminación de algunos de los inhibidores en el hidrolizado de forma que se mejore la eficacia productiva de bioetanol por vía fermentativa.

El tratamiento se realizó sobre biomasa de poda de olivo de partida y siguiendo tanto el modelo estadístico como los procedimientos descritos con anterioridad en el apartado 4.4.4.1.

La concentración de ácido acético en la fase líquida obtenida después de realizar cada uno de los ensayos planteados por el diseño experimental queda recogida, junto con las condiciones de cada ensayo (codificadas por el modelo y sin codificar), en la Tabla 5.12.

Tabla 5.12. Concentración de ácido acético en la fase líquida tras realizar el pretratamiento con NaOH

Ensayo	X_1	$X_1 \text{ cod}$	X_2	$X_2 \text{ cod}$	Ácido acético (g/dm ³)
HS-1	50	0	0,5	0	3,095
HS-2	50	0	0,5	0	3,080
HS-3	50	0	0,5	0	3,255
HS-4	80	1	0,8	1	3,585
HS-5	20	-1	0,8	1	3,312
HS-6	80	1	0,2	-1	1,230
HS-7	20	-1	0,2	-1	0,730
HS-8	50	0	0,92	1,4	3,630
HS-9	92	1,4	0,5	0	2,970
HS-10	50	0	0,08	-1,4	0,190
HS-11	8	-1,4	0,5	0	2,250

X_1 = tiempo de tratamiento en minutos; $X_1 \text{ cod}$ = tiempo codificado según el modelo estadístico; X_2 = Concentración de NaOH en %; $X_2 \text{ cod}$ = Concentración codificada según el modelo estadístico

El análisis de la fase líquida obtenida tras el tratamiento con NaOH reveló que esta contenía la mayor parte del ácido acético (Tabla 5.12.) y cantidades insignificantes de azúcares (Tabla 5.13.). Todas las condiciones experimentales para el tratamiento alcalino condujeron a cantidades de L-arabinosa solubilizada ligeramente superiores a las de D-xilosa y D-glucosa.

Tabla 5.13. Concentración de azúcares en la fase líquida tras realizar los ensayos del diseño experimental para el pretratamiento con NaOH

Ensayo	D-Glucosa (g/dm ³)	D-Xilosa (g/dm ³)	L-Arabinosa (g/dm ³)
HS-1	0,430	0,050	1,850
HS-2	0,385	0,020	1,750
HS-3	0,435	0,030	1,915
HS-4	0,425	1,000	1,690
HS-5	0,420	0,245	1,755
HS-6	0,515	0,010	2,170
HS-7	0,610	0,070	2,165
HS-8	0,395	0,790	1,685
HS-9	0,465	0,270	2,060
HS-10	0,490	0,005	1,570
HS-11	0,485	0,060	1,335

Con estos datos se llevó a cabo la optimización del modelo estadístico propuesto, escogiendo como respuesta la mayor cantidad de ácido acético presente en los líquidos obtenidos del pretratamiento con NaOH, lo que supondría posiblemente una menor concentración de ácido acético en los hidrolizados producidos en una posterior hidrólisis ácida de los sólidos pretratados.

La Fig. 5.7. muestra un gráfico tridimensional de superficie de respuesta para la concentración de ácido acético en función de las dos variables ensayadas, concentración de hidróxido de sodio y tiempo de tratamiento. A partir de dicha superficie se podrá determinar la concentración de ácido acético eliminada en condiciones óptimas de pretratamiento.

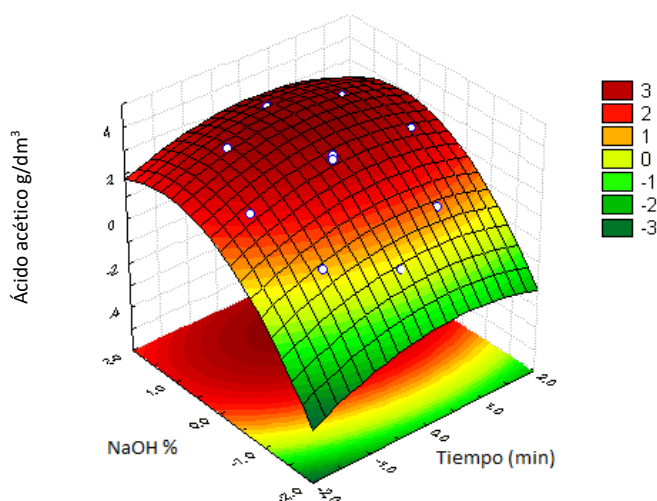


Fig. 5.7. Superficie de respuesta obtenida para la eliminación de ácido acético tras el pretratamiento con hidróxido de sodio

El análisis de varianza (ANOVA) se presenta en la Tabla 5.14., lo que permitiría determinar la bondad del ajuste entre los valores experimentales observados y los calculados mediante el modelo.

Tabla 5.14. Análisis de la varianza (ANOVA) del modelo ajustado para la concentración de ácido acético

	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F-valor</i>	<i>P-valor</i>
X_1	0,40	1	0,40	42,63	0,023
X_2	12,01	1	12,01	1276,49	<0,001
X_1^2	0,44	1	0,44	46,42	<0,001
X_2^2	2,23	1	2,23	236,79	0,004
Residual	0,03	5	0,01		
Falta de ajuste	0,02	3	0,01	0,67	0,017
Error puro	0,04	2	0,01		
SS total	14,74	10			

X_1 : tiempo de tratamiento en minutos; X_2 : Concentración de NaOH en %; *SS*: del inglés “sum of squares”, suma de cuadrados; *MS*: del inglés “mean squares”, cuadrados medios

El modelo de ajuste propuesto para el cálculo de la concentración de ácido acético se establece en la ecuación 5.7.

$$Y_1 = 3,143 + 0,224 X_1 + 1,225X_2 - 0,278 (X_1)^2 - 0,628 (X_2)^2 \quad (5.7)$$

donde:

Y_1 : concentración de ácido acético

X_1 : tiempo

X_2 : concentración de NaOH

(Para la realización de cálculos los valores de estas variables se introducirán codificados según el modelo)

El modelo obtenido fue significativo al 99% de nivel de confianza, presentando un valor del coeficiente de regresión lineal ajustado ($R_{ajustado}^2$) de 0,995, lo que implica un buen ajuste para el cálculo de la concentración de ácido acético en los líquidos obtenidos del tratamiento básico y que, por tanto, se traducirá en una pérdida de grupos acetilo presente en la biomasa de poda de olivo de partida.

Las condiciones optimizadas para obtener una concentración máxima de ácido acético en la fracción líquida tras el pretratamiento con NaOH implicaron un tiempo de reacción de 59 minutos y una concentración de 0,8% NaOH (para una temperatura de 60 °C) obteniéndose, según el modelo, una fase líquida con 3,78 g/dm³ de ácido acético. Experimentalmente, bajo estas condiciones optimizadas se consiguieron fases líquidas con 3,71 g/dm³ de ácido acético, lo que confirma la predicción obtenida por el modelo estadístico.

Por otra parte, la biomasa sólida desacetilada obtenida en cada ensayo fue caracterizada en cuanto a su contenido en celulosa, hemicelulosa, lignina y grupos acetilo, datos recogidos en la Tabla 5.15.

Tabla 5.15. Composición en % en peso de la biomasa de poda de olivo de partida (BPO partida) y de los sólidos obtenidos tras el pretratamiento con NaOH

Sólido resultante del ensayo	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina %	Grupos acetilo %
BPO partida	36,50	20,19	22,51	2,43
HS-1	33,25	10,17	22,41	0,00
HS-2	33,74	12,55	22,69	0,00
HS-3	24,51	9,38	22,79	0,00
HS-4	32,06	6,23	28,70	0,00
HS-5	32,38	8,00	22,89	2,34
HS-6	25,63	8,00	23,14	2,34
HS-7	33,88	12,89	21,88	2,51
HS-8	26,78	11,02	23,00	0,00
HS-9	26,88	10,35	23,50	0,00
HS-10	33,20	12,56	23,55	2,85
HS-11	24,78	8,63	21,42	1,89

En cuanto a las condiciones óptimas de pretratamiento con NaOH (0,8% de NaOH y 59 min), la composición (en base seca) de la biomasa sólida residual tras el pretratamiento alcalino de la materia prima, basada en ensayos llevados a cabo por triplicado, fue: $42,0 \pm 0,4\%$ de celulosa, $18,6 \pm 0,5\%$ de hemicelulosa y $20,0 \pm 0,2\%$ de lignina.

En estas condiciones, no se detectaron grupos acetilo en el sólido residual del pretratamiento óptimo por lo que en las hidrólisis ácidas que posteriormente se llevarán a cabo, se partirá de biomasa de poda de olivo residual completamente desacetilada.

Finalmente, es importante mencionar que después del pretratamiento alcalino en las mejores condiciones y de acuerdo a los residuos sólidos, se eliminó el $5,5 \pm 1,2\%$ de celulosa, $7,9 \pm 1,7\%$ de hemicelulosa y el $11,1 \pm 1,7\%$ de lignina, respecto del residuo de poda de olivo de partida; basando los datos obtenidos en 12 repeticiones que fueron llevadas a cabo para la obtención de materia desacetilada en condiciones óptimas suficiente para la posterior fase de hidrólisis con ácido oxálico.

Otros investigadores, como es el caso de Chen *et al.* (2012a) [42] al tratar biomasa de rastrojo de maíz a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0,4\%$ de NaOH, evidenciaron menores pérdidas de azúcares ($< 4\%$ de azúcares totales) y un 12% del contenido en lignina, aunque en su caso, el porcentaje de acetato eliminado fue sólo del 79% .

5.3.1.1. Hidrólisis ácida sobre biomasa pretratada con hidróxido de sodio

Una vez obtenida suficiente biomasa pretratada en condiciones óptimas con NaOH dicho material sólido residual se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel de filtro hasta conseguir una humedad inferior al 10% para realizar con él los ensayos de hidrólisis ácida planteados con anterioridad en el apartado 4.4.3.

Atendiendo a este planteamiento se obtuvieron hidrolizados, a partir de materia prima pretratada en condiciones óptimas ($0,8\%$ de NaOH y 59 min), cuyas características se muestran en la Tabla 5.16.

Tabla 5.16. Variables de operación y composición para los hidrolizados ácidos obtenidos a partir de materia prima pretratada con NaOH en condiciones óptimas (g/dm³)

Ensayo	CAO	T	CSF	Azúcares			Inhibidores			
				D-glu	D-xil	L-ara	AcH	For	Fu	CFT
OXA-1	0,050	130	0,84 ± 0,06	2,87	7,12	2,75	0,00	0,01	0,06	0,85
OXA-2	0,075	130	0,96 ± 0,08	4,14	8,80	2,89	0,00	0,00	0,07	0,99
OXA-3	0,100	130	1,05 ± 0,08	4,84	9,18	2,52	0,00	0,00	0,08	1,20
OXA-4	0,050	150	1,48 ± 0,05	8,03	16,00	2,82	0,15	1,35	0,63	2,34
OXA-5	0,075	150	1,53 ± 0,05	8,65	16,76	2,72	0,15	1,37	0,59	2,40
OXA-6	0,100	150	1,59 ± 0,11	8,37	16,43	2,74	0,17	1,54	0,77	2,36
OXA-7	0,050	170	1,70 ± 0,11	7,76	16,49	2,93	0,29	2,59	1,30	2,73
OXA-8	0,075	170	1,79 ± 0,08	7,68	16,82	2,77	0,31	2,69	2,72	2,90
OXA-9	0,100	170	1,92 ± 0,07	7,75	15,88	2,72	0,33	2,80	3,44	3,11

CAO= Concentración de ácido oxálico, mol/dm³; T= Temperatura, °C; D-glu= D-glucosa, g/dm³; D-xil= D-xilosa, g/dm³; L-ara= L-arabinosa, g/dm³; AcH= ácido acético, g/dm³; For= ácido fórmico, g/dm³; Fu= furanos totales, g/dm³; CFT= compuestos fenólicos totales, g/dm³

Tras el análisis, de los datos ofrecidos en la Tabla 5.16., tanto de azúcares simples como de inhibidores presentes en los hidrolizados con ácido oxálico sobre biomasa sometida al pretratamiento alcalino en condiciones óptimas, se aprecia como la cantidad de ácido acético es mínima para todos los ensayos, no superando los 0,33 g/dm³, mientras que en los hidrolizados obtenidos en las mismas condiciones de tratamiento con ácido oxálico, pero a partir de biomasa de poda de olivo de partida (Tabla 5.7.) la concentración oscila entre 0,85 g/dm³ a 3,3 g/dm³. Este hecho hace patente la efectividad del pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio con respecto a la capacidad desacetilante del mismo.

Además, la presencia de esta pequeña cantidad de ácido acético residual tras la hidrólisis con ácido oxálico sobre biomasa pretratada puede deberse a la presencia de lignina ácida (por su contenido en grupos acetilo) solubilizada en los hidrolizados durante condiciones más drásticas de tratamiento.

Este pretratamiento también implica reducciones de furanos totales, ácido fórmico y compuestos fenólicos totales, aunque los porcentajes de reducción dependen de las cantidades de inhibidor presentes en el hidrolizado.

En relación a los azúcares, la D-xilosa fue el azúcar más abundante en los hidrolizados obtenidos, ya que este proceso de tratamiento ácido influye, sobre todo, en la solubilización de la fracción hemicelulósica convirtiendo una determinada fracción de xilanos en D-xilosa, como azúcar monomérico.

La eliminación de dicho xilano es el principal indicador de la eficacia del tratamiento, siendo el ácido oxálico considerado lo suficientemente fuerte como para catalizar la hidrólisis de la hemicelulosa, con mayor efectividad que otros ácidos carboxílicos o inorgánicos (Alvira *et al.* 2010) [14].

Además, partiendo de los datos de la Tabla 5.16., vista anteriormente, se puede calcular qué porcentaje supone la D-glucosa sobre la D-xilosa generada, dividiendo la concentración de la primera entre la de la segunda y multiplicando por cien, este porcentaje quedaría representado en la Tabla 5.17.

Tabla 5.17. Porcentaje de D-glucosa sobre la D-xilosa generada en cada ensayo del diseño experimental

Ensayo	D-glucosa (g/dm ³)	D-xilosa (g/dm ³)	% D-glucosa sobre D-xilosa
OXA-1	2,87	7,12	40,31
OXA-2	4,14	8,80	47,05
OXA-3	4,84	9,18	52,72
OXA-4	8,03	16,00	50,19
OXA-5	8,65	16,76	51,61
OXA-6	8,37	16,43	50,94
OXA-7	7,76	16,49	47,06
OXA-8	7,68	16,82	45,66
OXA-9	7,75	15,88	48,80
Media	-	-	48,26±3,80

El hecho de que el porcentaje de D-glucosa en los hidrolizados represente aproximadamente un $48\pm4\%$ de media, sobre la D-xilosa generada, podría deberse en gran medida a que el tratamiento con ácido oxálico implicó la degradación de la hemicelulosa, primeramente.

Por otro lado, no se detecta influencia de las condiciones de hidrólisis ácida sobre la concentración de L-arabinosa, obteniendo un valor medio de $2,76 \pm 0,12 \text{ g/dm}^3$.

Se ha observado que, en comparación con la hidrólisis de biomasa de poda de olivo de partida, existe una ligera reducción de los azúcares totales en el hidrolizado ácido, recogida en la Tabla 5.18., posiblemente como consecuencia de una ligera pérdida de fracción hemicelulósica ($7,9\pm1,7\%$) y celulósica ($5,5\pm1,2\%$) debido a la aplicación del pretratamiento con NaOH sobre la biomasa de partida, según se comentó con anterioridad. No obstante, en muchas de las condiciones de tratamiento con ácido oxálico de los sólidos pretratados, se obtienen concentraciones de azúcares muy significativas.

Tabla 5.18. CSF y azúcares totales (g/dm^3) tras la hidrólisis ácida. Comparativa entre biomasa de poda de olivo de partida y biomasa pretratada con hidróxido de sodio en condiciones optimizadas

Ensayo	Biomasa de poda de olivo de partida		Biomasa pretratada con NaOH en condiciones optimizadas	
	CSF	Azúcares totales	CSF	Azúcares totales
OXA-1	0,88	18,24	0,84	12,74
OXA-2	1,01	24,77	0,96	15,83
OXA-3	1,11	31,78	1,05	16,54
OXA-4	1,51	37,43	1,48	26,85
OXA-5	1,56	38,38	1,53	28,12
OXA-6	1,66	37,90	1,59	27,54
OXA-7	1,77	35,48	1,70	27,18
OXA-8	1,84	32,26	1,79	27,27
OXA-9	1,97	30,22	1,92	26,35

Por otra parte, la concentración de azúcares totales se ha incrementado en ambas situaciones conforme aumentaba el coeficiente de severidad corregido de los tratamientos hasta alcanzar un valor de CSF de 1,56, a partir del cual la concentración de azúcares totales o bien se mantiene o desciende con la severidad más acusada del tratamiento (Tabla 5.16.).

Considerando el factor de severidad combinado (CSF), en general, se puede decir que cuanto mayor es dicho parámetro, menores son las diferencias de las concentraciones de azúcares totales entre biomasa pretratada con hidróxido de sodio y biomasa de poda de olivo de partida, con valores que oscilan entre el 13% y el 36%, para las condiciones establecidas en el diseño experimental de hidrólisis ácida.

Continuando con el análisis de los resultados obtenidos para la hidrólisis ácida de la biomasa desacetilada, la Fig. 5.8. muestra los ajustes correspondientes de los azúcares totales y los principales monómeros (D-xilosa, D-glucosa y L-arabinosa) obtenidos frente al factor de severidad combinado.

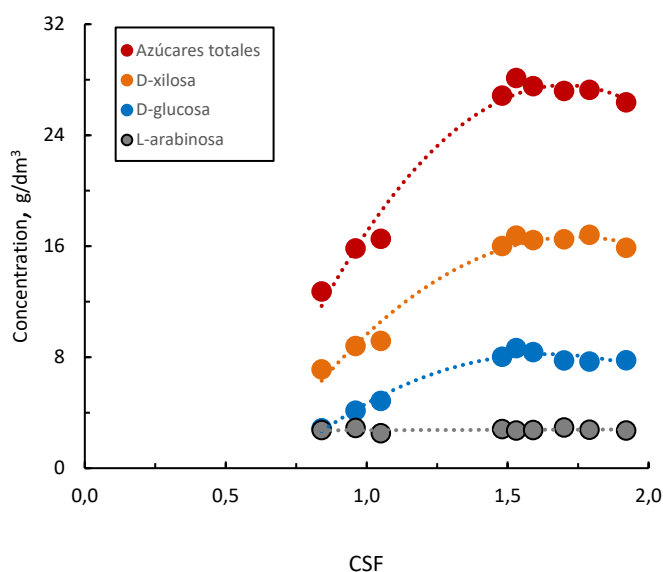
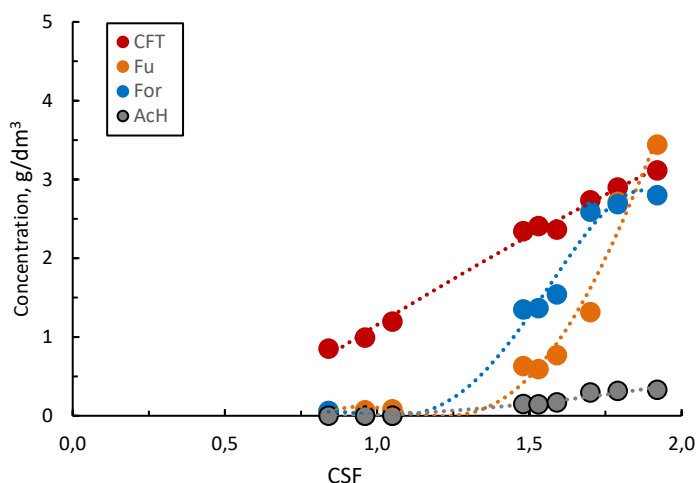


Fig. 5.8. Azúcares fermentables frente a CSF en hidrolizados de biomasa pretratada con hidróxido de sodio en condiciones óptimas

Las ecuaciones obtenidas a partir de esos datos nos permiten establecer teóricamente el valor óptimo de CSF para maximizar estas concentraciones, encontrándose que el valor del factor de severidad combinado del tratamiento hidrolítico ácido sobre biomasa pretratada, al igual que ocurrió para el tratamiento ácido sobre biomasa de partida, se encontraría en el rango 1,5-1,6.

Empíricamente el nivel más alto de azúcares fermentables totales ($28,1 \text{ g/dm}^3$) fue obtenido a 150°C , con una concentración de $0,075 \text{ M}$ de ácido oxálico y un $\text{CSF} = 1,53 \pm 0,05$, lo que permitiría conservar los resultados de azúcares obtenidos para estas condiciones previamente según el modelo experimental establecido.

En la citada Figura 5.8 se puede observar, además, como la producción de azúcares fermentables disminuye a partir del valor óptimo conforme aumentamos el CSF del proceso, esto es probablemente debido a la conversión de D-xilosa a furfural y D-glucosa a HMF; de hecho, la Fig. 5.9. muestra como la concentración de furanos aumenta considerablemente a partir de un $\text{CSF} = 1,6$.



CFT= compuestos fenólicos totales (g/dm^3), Fu= furanos totales (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3)

Fig. 5.9. Inhibidores frente a CSF en hidrolizados de biomasa pretratada con hidróxido de sodio en condiciones óptimas

En cuanto a las concentraciones de compuestos fenólicos totales y ácido acético, parecen tener una relación casi lineal con el factor de severidad combinado; cuanto mayor es el valor del CSF, mayor concentración de este tipo de compuestos inhibidores aparecerá en el hidrolizado ácido.

Considerando como base las condiciones experimentales óptimas ($CSF = 1,53 \pm 0,05$), se han determinado los porcentajes de reducción de las concentraciones de los principales inhibidores presentes en los hidrolizados ácidos: ácido fórmico, furanos totales y compuestos fenólicos, con respecto a la biomasa sin tratar, siendo estos del 41,5%, 6,3% y 35,0%, respectivamente.

Además de los hidrolizados ácidos, los residuos sólidos obtenidos tras el ataque ácido de la biomasa pretratada con NaOH fueron caracterizados por triplicado en cuanto a su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina obteniendo los datos recogidos en la Tabla 5.19.

Tabla 5.19. Composición en % de los sólidos residuales obtenidos tras la hidrólisis ácida de biomasa pretratada con NaOH en condiciones óptimas

Sólido resultante del ensayo con biomasa pretratada	CSF	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina %
OXA-1	$0,84 \pm 0,06$	$47,55 \pm 0,08$	$13,56 \pm 0,11$	$30,00 \pm 0,22$
OXA-2	$0,96 \pm 0,08$	$48,77 \pm 0,12$	$12,48 \pm 0,10$	$31,54 \pm 0,17$
OXA-3	$1,05 \pm 0,08$	$50,98 \pm 0,22$	$10,02 \pm 0,05$	$31,88 \pm 0,10$
OXA-4	$1,48 \pm 0,05$	$55,32 \pm 0,32$	$2,57 \pm 0,03$	$35,34 \pm 0,31$
OXA-5	$1,53 \pm 0,05$	$54,98 \pm 0,28$	$2,34 \pm 0,06$	$35,21 \pm 0,24$
OXA-6	$1,59 \pm 0,11$	$54,20 \pm 0,41$	$1,55 \pm 0,03$	$34,79 \pm 0,17$
OXA-7	$1,70 \pm 0,11$	$55,55 \pm 0,74$	$0,00 \pm 0,00$	$36,38 \pm 0,21$
OXA-8	$1,79 \pm 0,08$	$54,92 \pm 0,36$	$0,00 \pm 0,00$	$37,26 \pm 0,37$
OXA-9	$1,92 \pm 0,07$	$54,72 \pm 0,27$	$0,00 \pm 0,00$	$36,97 \pm 0,40$

Como se puede observar, el contenido en celulosa de estos sólidos residuales tratados osciló entre 47,6% y 55,6%. La hemicelulosa, por su parte, presentó muy bajos porcentajes llegando incluso a desaparecer, ya que es conocida su capacidad de solubilizarse totalmente en condiciones de mayor severidad ($CSF: 1,70-1,92$), pasando a la fase líquida. El contenido en lignina osciló entre el 30,0 y 37,3%.

La composición de estos sólidos tras el pretratamiento con hidróxido de sodio y la hidrólisis ácida puede ser comparada, en primer lugar, con la de los sólidos procedentes de biomasa de poda de olivo de partida obtenidos en las mismas condiciones de hidrólisis, datos recogidos en la Tabla 5.8. En este caso, para los sólidos procedentes de la hidrólisis de biomasa de poda de olivo de partida (no tratados con hidróxido de sodio previamente), su contenido en celulosa fue, salvo en los dos primeros ensayos (OXA-1 y OXA-2), de menor CSF, un 7,36% inferior de media con respecto a los sólidos obtenidos de biomasa pretratada. La hemicelulosa mantuvo porcentajes ligeramente superiores en biomasa residual pretratada, desapareciendo para tratamientos más severos. Finalmente, en el caso de la lignina, salvo en los ensayos con CSF por debajo de 1,11, se obtuvieron porcentajes de aumento de un 8,31% de media en biomasa sometida al pretratamiento alcalino.

Por otra parte, los sólidos residuales obtenidos de la hidrólisis ácida de material pretratado con NaOH se pueden comparar con la biomasa de poda de olivo de partida sin realizar sobre ella ni pretratamiento ni hidrólisis ácida (datos recogidos en la Tabla 5.1.), apreciándose en los sólidos pretratados importantes incrementos del contenido en celulosa (en rangos entre el 30,27%-49,92%) y lignina (33,27%-64,24%) y disminuciones en el contenido de hemicelulosa en el rango entre el 32,84% y el 100%.

Por tanto, en general, los diferentes tratamientos aplicados sobre la biomasa de poda de olivo (primero usando NaOH y luego mediante hidrólisis, con ácido oxálico, de los materiales biomásicos) han conducido a sólidos residuales enriquecidos básicamente en celulosa, en menor medida en lignina, y contenidos en hemicelulosa bajos e incluso nulos (para condiciones experimentales de mayor severidad), poniendo de manifiesto cómo dichos tratamientos atacan la estructura original de la materia prima.

La Figura 5.10. muestra los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina extraídos de la biomasa de partida, al aplicar a esta un pretratamiento alcalino con NaOH y una posterior hidrólisis del material sólido obtenido con ácido oxálico, representados frente al factor de severidad combinado.

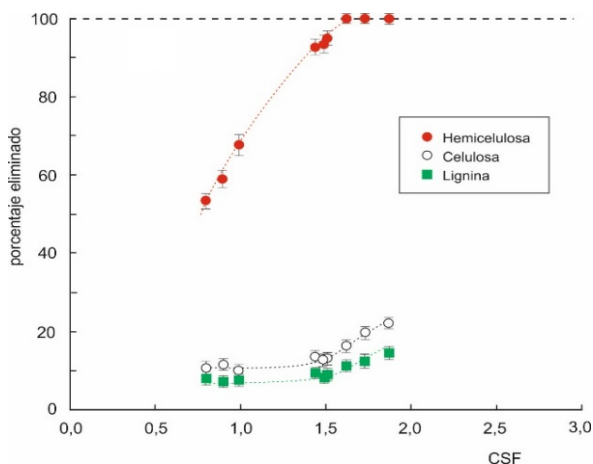


Fig. 5.10. Porcentajes eliminados de celulosa, hemicelulosa y lignina referidos a la biomasa de partida frente al CSF

Se puede observar cómo en un entorno próximo a $CSF=1,6$ se hidroliza toda la hemicelulosa; esta observación empírica también es consistente con los resultados calculados. Por otra parte, la eliminación de las fracciones de celulosa y lignina parece no verse afectada hasta un CSF de 1,5; a partir de este valor su eliminación aumenta de forma significativa.

La caracterización tanto de líquidos como de sólidos ha permitido llevar a cabo un balance de masa total del proceso en condiciones óptimas, es decir, para el tratamiento alcalino, donde se eliminan completamente los grupos acetilo presentes en la biomasa de partida (60 °C, 59 minutos y 0,8% de NaOH) y para la hidrólisis ácida en aquellas condiciones donde las concentraciones de azúcares son más altas, haciendo mínimas las de inhibidores, con un rango de factor de severidad combinado de 1,5 a 1,6 (150 °C, 30 minutos, 0,075 M de ácido oxálico y $CSF= 1,53$). Dicho balance de masa se muestra en la Figura 5.11.

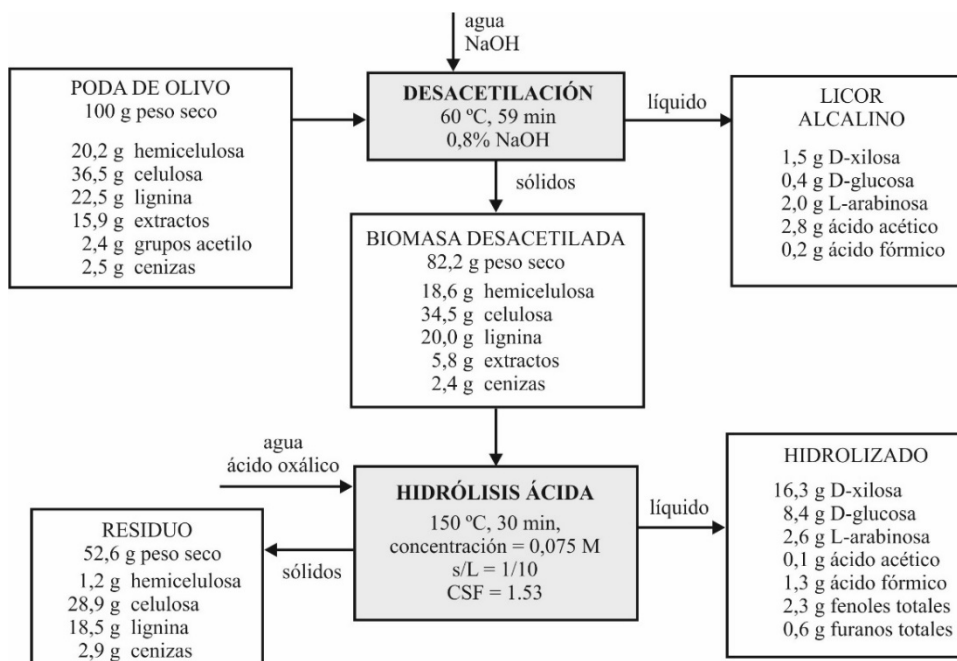


Fig. 5.11. Balance de masa del proceso general con pretratamiento alcalino con NaOH más hidrólisis ácida

Para el estudio del efecto del pretratamiento con NaOH y la posterior hidrólisis con ácido oxálico del material resultante, se han observado los cambios estructurales del residuo sólido final obtenido, comparado con el material de partida, mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido.

Mientras que la materia prima de partida reveló una estructura intacta, formada por capas rígidas con superficie compacta y altamente comprimida, Figura 5.12. (A), según se comentó con anterioridad en el apartado 5.1. de esta memoria, los sólidos residuales recuperados de los pretratamientos con NaOH mostraron una estructura notablemente alterada y más porosa, Figura 5.12. (B), posiblemente por la eliminación parcial del contenido de lignina soluble y la reducción de la cristalinidad de la celulosa que se produce durante el pretratamiento alcalino.

Cambios de estructura similares en sustratos lignocelulósicos tratados fueron observados por otros investigadores, Jabasingh y Nachiyar (2011) [82].

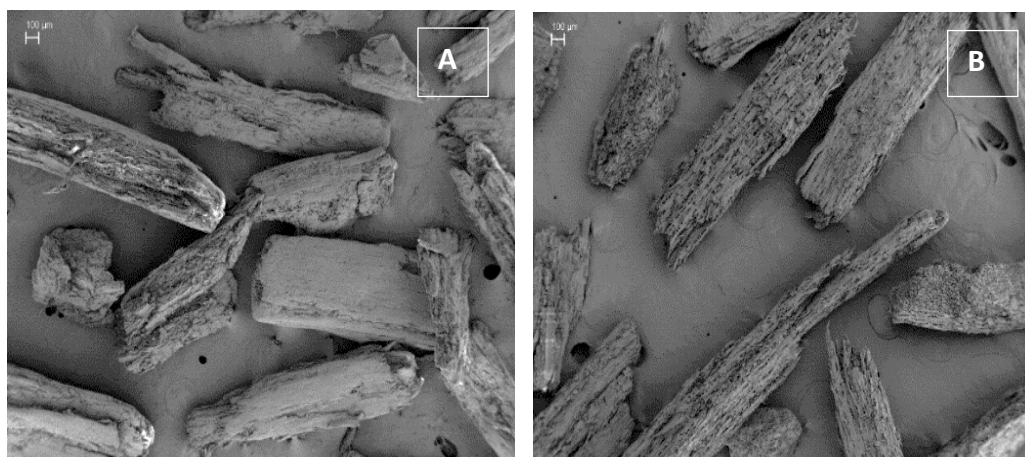


Fig. 5.12. A) Biomasa de poda de olivo de partida; B) materia prima pretratada con hidróxido de sodio en condiciones optimizadas

Por otro lado, la matriz lignocelulósica aparece con una estructura compacta en la biomasa de partida, Fig.5.13. (A), reduciendo su integridad estructural al realizar un doble tratamiento sobre ella, el alcalino, con NaOH y la posterior hidrólisis con ácido oxálico del sólido recuperado.

En la Figura 5.13., se recogen tres imágenes del microscopio electrónico de barrido que comparan la biomasa en las tres situaciones que componen el proceso, en primer lugar, una muestra de biomasa de poda de olivo de partida, A), en segundo lugar, una muestra desacetilada en las condiciones óptimas definidas, B) y por último el resultado de los procesos de pretratamiento alcalino en condiciones óptimas más la hidrólisis con ácido oxálico del sólido residual, realizadas de forma consecutiva, C).

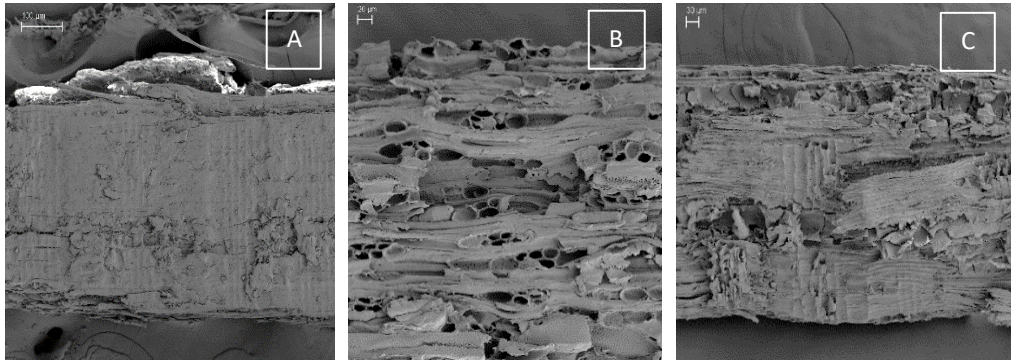


Fig. 5.13. Comparativa entre biomasa de poda de olivo: A) de partida, B) tras pretratamiento alcalino con NaOH en condiciones óptimas y C) tras pretratamiento con NaOH optimizado + hidrolisis con ácido oxálico

La primera etapa (de tratamiento básico) implicaría la eliminación de parte de la fracción hemicelulósica, que actúa como material cementante que cubre y sostiene las fibras de celulosa, apareciendo pequeños huecos que evidencian una estructura más esponjosa, Figura 5.13. (B).

Finalmente, tras el doble tratamiento usando tanto NaOH como ácido oxálico, se pone de manifiesto una pérdida de la morfología original más significativa, dando lugar a un material bastante erosionado y rugoso en el que las estructuras iniciales han sido parcialmente destruidas, Figura 5.13 (C).

Dado que la biomasa desacetilada e hidrolizada con ácido oxálico presentó una menor estructura cohesiva y más fracturada, podría proporcionar una forma sencilla de aprovechar la accesibilidad mejorada del sólido resultante para otros procesos, en los que la existencia de una estructura porosa supusiera una ventaja adicional.

5.3.1.2. Fermentación de hidrolizados ácidos de sólidos pretratados con hidróxido de sodio

Los carbohidratos fermentables presentes en el hidrolizado lignocelulósico, obtenido tras la hidrólisis con ácido oxálico a partir de material pretratado con NaOH, se utilizaron para la fermentación de los mismos. Dichos hidrolizados fueron acondicionados realizando centrifugación, ajuste de pH y adición de nutrientes según establecen los protocolos descritos en los apartados 4.4.5. y 4.4.6.

El proceso fermentativo fue llevado a cabo con dos levaduras diferentes *Pichia stipitis* CBS 6054 y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691.

Los hidrolizados fermentados fueron los correspondientes a los líquidos resultantes de las hidrólisis con ácido oxálico (en las condiciones establecidas por los ensayos OXA-1 a OXA-7) del sólido pretratado con NaOH en condiciones optimizadas. Esta selección fue llevada a cabo teniendo en cuenta los resultados de las fermentaciones realizadas con biomasa hidrolizada sin desacetilar con hidróxido de sodio, los datos de la caracterización de los hidrolizados correspondientes, en cuanto a azúcares e inhibidores, y los diferentes valores del factor de severidad combinado en un rango entre 0,84 y 1,70 (Tabla 5.18.).

Los líquidos procedentes de los procesos hidrolíticos OXA-8 y OXA-9, usando como materia prima material pretratado alcalinamente en condiciones optimizadas, fueron descartados por su elevada severidad, puesto que a partir de un valor de CSF superior a 1,59 la levadura no es capaz de realizar el proceso fermentativo, como se ha podido demostrar con el ensayo OXA-7. La razón puede deberse a las elevadas concentraciones de compuestos de carácter tóxico/inhibitorio presentes en los hidrolizados obtenidos en esos experimentos.

Los resultados obtenidos, en cuanto a producción de biomasa (x), consumo de sustratos (D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa) y obtención de etanol (EtOH) para cada hidrolizado que deriva de un tratamiento secuencial (NaOH- ácido oxálico) y de forma comparativa entre ambas levaduras, quedan recogidos en la Figura 5.14.

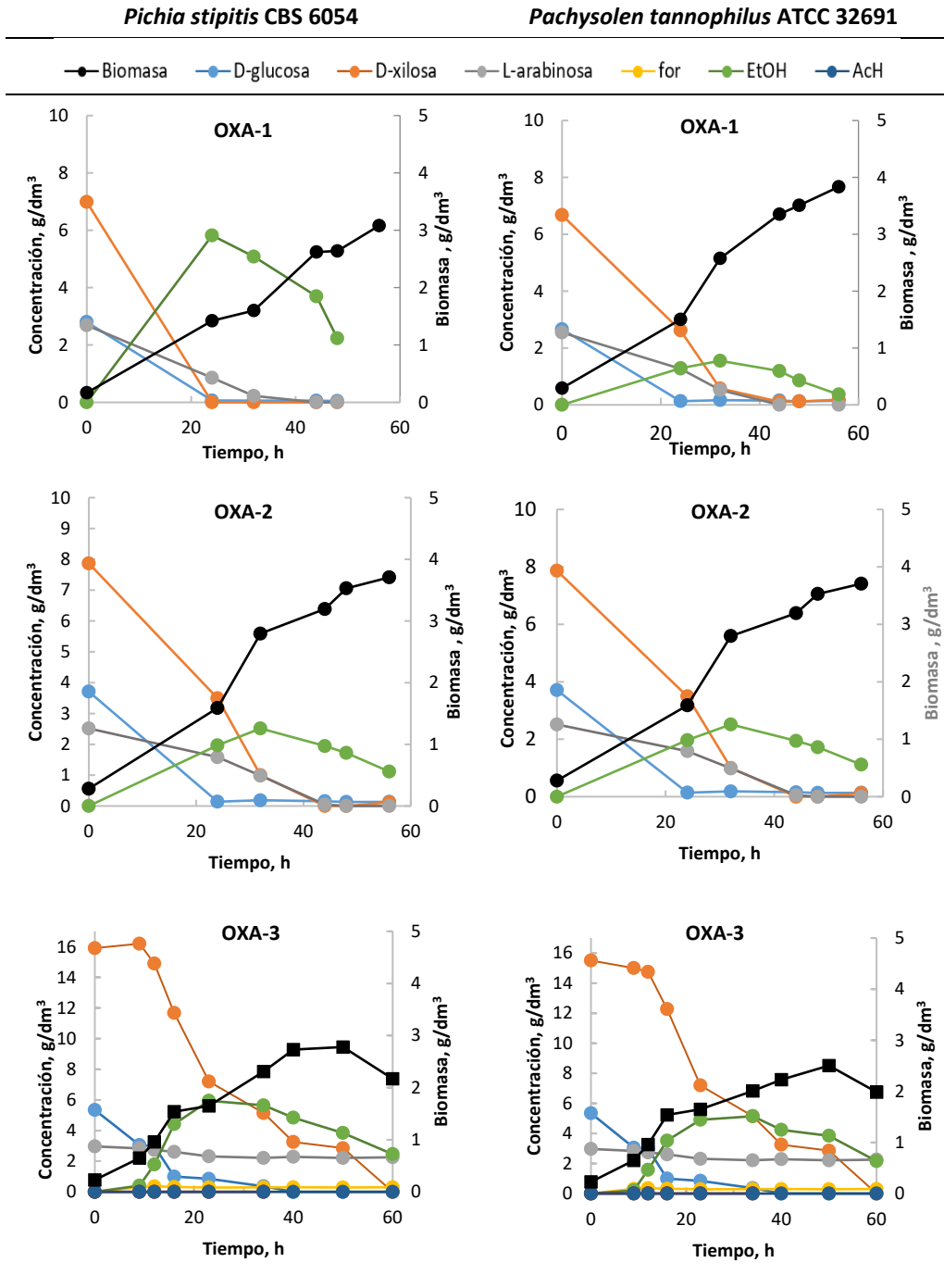


Fig. 5.14. Concentración de azúcares, inhibidores y etanol a lo largo del tiempo en los procesos fermentativos llevados a cabo con *P. stipitis* y *P. tannophilus* sobre los hidrolizados obtenidos usando biomasa pretratada con NaOH en condiciones optimizadas

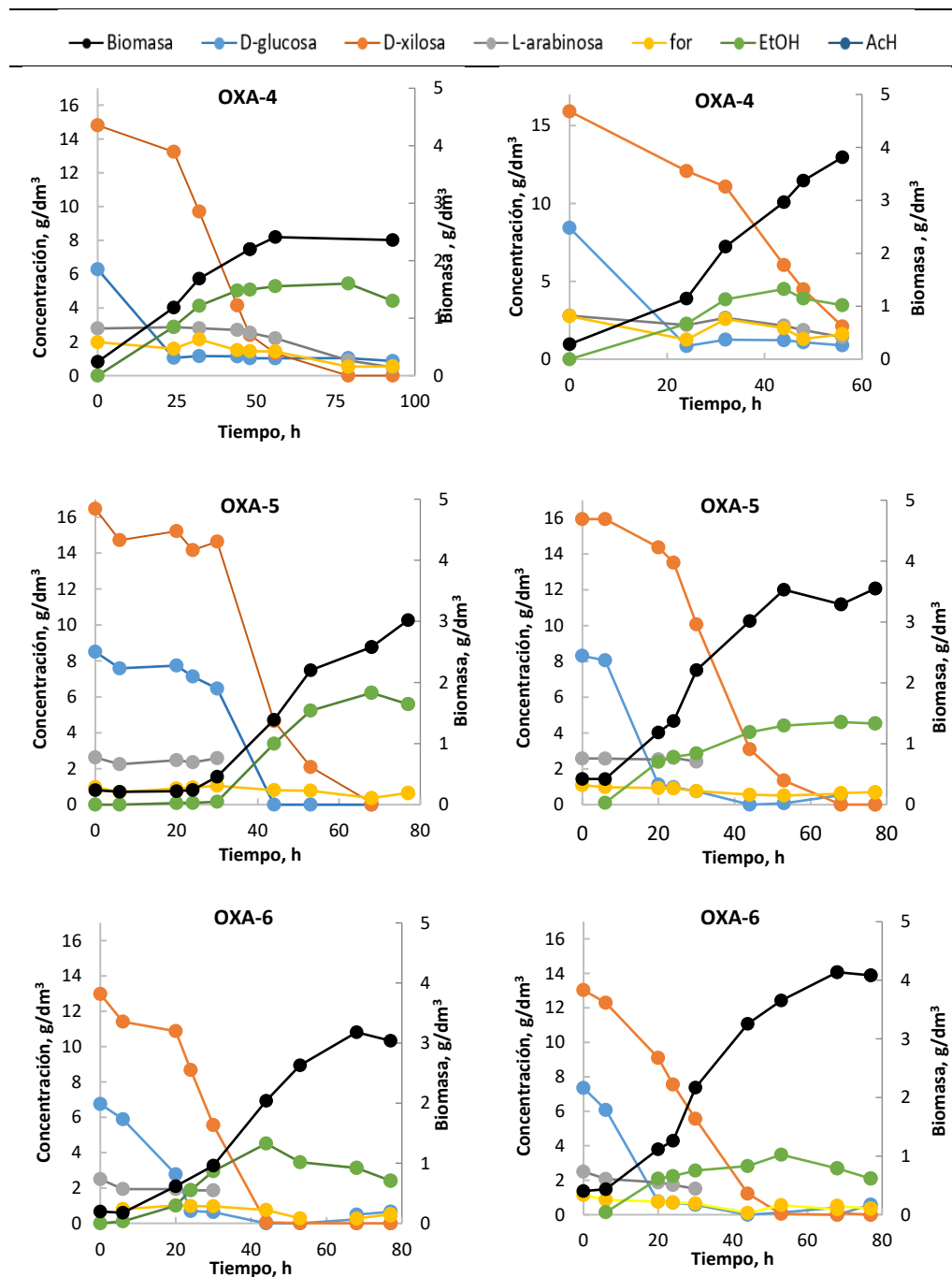
Pichia stipitis CBS 6054*Pachysolen tannophilus* ATCC 32691

Fig. 5.14. Concentración de azúcares, inhibidores y etanol a lo largo del tiempo en los procesos fermentativos llevados a cabo con *P. stipitis* y *P. tannophilus* sobre los hidrolizados obtenidos usando biomasa pretratada con NaOH en condiciones optimizadas (continuación)

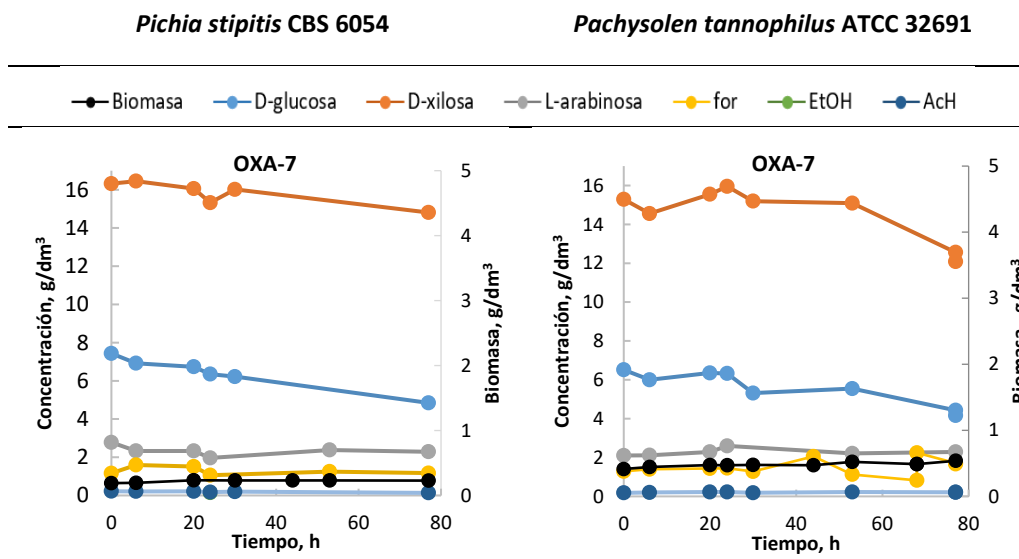


Fig. 5.14. Concentración de azúcares, inhibidores y etanol a lo largo del tiempo en los procesos fermentativos llevados a cabo con *P. stipitis* y *P. tannophilus* sobre los hidrolizados obtenidos usando biomasa pretratada con NaOH en condiciones optimizadas (continuación)

Del análisis de la Fig.5.14. se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Para ambas levaduras existió un consumo prácticamente total de los principales azúcares presentes en el medio (D-glucosa y D-xilosa) para tratamientos ácidos del sólido desacetilado con NaOH óptimo siempre y cuando el CSF esté en el intervalo 0,84-1,59, mientras que para valores de CSF de 1,70 casi no existió consumo de ninguno de estos azúcares ni se produce crecimiento celular. Este último hecho confirmaría que severidades superiores (ensayos OXA-8 y OXA-9) no presentarán mejoras en los rendimientos
- Para ambas levaduras, la L-arabinosa sólo fue consumida en los tratamientos ácidos que implicaron severidades más bajas (CSF no superior a 0,96)

- En los experimentos en los que existió un consumo apreciable de sustrato, ambas levaduras manifestaron un consumo simultáneo tanto de la D-glucosa como de la D-xilosa
- Para las dos levaduras consideradas, y para todos los ensayos en los que existió consumo de sustrato, el tiempo de fermentación no fue en ningún caso superior a 68-70 h
- En general, *Pichia stipitis* presentó mayor producción de bioetanol (en rangos entre 4,52-6,22 g/dm³) que *Pachysolen tannophilus* (1,55-5,15 g/dm³) y además de manera más rápida, obteniendo las concentraciones máximas de este bioalcohol en el primer caso entre las 23-65 horas y en el segundo entre las 32-68 horas

A partir de los datos primarios obtenidos y representados en las gráficas de la Figura 5.14 se han calculado los rendimientos en etanol, los porcentajes sobre el rendimiento máximo teórico y las productividades máximas para *P. stipitis* y *P. tannophilus*, recogándose en la Tabla 5.20.

Tabla 5.20. Valores fermentativos obtenidos de hidrolizados ácidos obtenidos a partir de biomasa pretratada con NaOH en condiciones optimizadas con las levaduras *P. stipitis* y *P. tannophilus*

<i>Pichia stipitis</i> CBS 6054							
Ensayo	CSF	S _T	Producción de etanol		Y _{E/S}	% RTM	q _E
			máxima				
			t	E _{máx}			
OXA-1	0,84 ± 0,06	12,27	23	4,98	0,41	79,6	0,21
OXA-2	0,96 ± 0,08	15,75	24	5,68	0,42	81,55	0,23
OXA-3	1,05 ± 0,08	24,22	23	5,62	0,45	87,38	0,24
OXA-4	1,48 ± 0,05	23,89	48	5,11	0,32	62,14	0,11
OXA-5	1,53 ± 0,05	27,59	65	6,22	0,23	44,66	0,10
OXA-6	1,59 ± 0,11	22,23	44	4,52	0,18	34,95	0,09

<i>Pachysolen tannophilus</i> ATCC 32691							
Ensayo	CSF	S _T	Producción de etanol		Y _{E/S}	% RTM	q _E
			máxima				
			t, h	E _{máx}			
OXA-1	0,84 ± 0,06	11,48	32	1,55	0,15	28,30	0,05
OXA-2	0,96 ± 0,08	14,10	32	2,52	0,21	40,90	0,08
OXA-3	1,05 ± 0,08	23,82	34	5,15	0,22	41,98	0,15
OXA-4	1,48 ± 0,05	27,14	44	4,51	0,25	49,40	0,12
OXA-5	1,53 ± 0,05	26,84	68	4,61	0,18	34,00	0,12
OXA-6	1,59 ± 0,11	22,88	53	3,48	0,15	29,80	0,10

S_T = azúcares totales iniciales (g/dm^3); t= tiempo en horas donde la concentración de etanol es máxima (h); $E_{máx}$ = concentración máxima de etanol; $Y_{E/S}$ = rendimiento en etanol (g/g), %RTM: porcentaje sobre el rendimiento teórico máximo y q_E = productividad de etanol ($\text{g/dm}^3 \text{ h}$)

Según los resultados obtenidos indicar que, de manera general, *P. stipitis* CBS 6054 presentó mejores rendimientos que *P. tannophilus* ATCC 32691, a la vez que las productividades máximas obtenidas también son mayores. Los valores más altos de $Y_{E/s}$ y q_E se han obtenido en los ensayos OXA-2 ($CSF=0,96\pm0,08$) y OXA-3 ($CSF=1,05\pm0,08$) con *P. stipitis* mientras que con *P. tannophilus* se obtienen en los ensayos OXA-3 ($CSF=1,05\pm0,08$) y OXA-4 ($CSF=1,48\pm0,08$).

La mayor cantidad de etanol producida, $6,22\text{ g/dm}^3$, se obtiene con *Pichia stipitis*, coincidiendo con el ensayo que presenta mayor cantidad de azúcares fermentables iniciales.

Los bajos resultados obtenidos en cuanto a rendimientos y productividad de etanol para las fermentaciones llevadas a cabo con *Pachysolen tannophilus* hacen que esta levadura se descarte en futuras fermentaciones, por lo que será *Pichia stipitis* la levadura seleccionada como microorganismo fermentador.

Si se comparan los resultados obtenidos al fermentar hidrolizados provenientes de biomasa desacetilada (Tabla 5.19.) con los resultados de los mismos ensayos, pero con biomasa de poda de olivo de partida (Tabla 5.11.) se puede apreciar un cambio notable entre los ensayos de cada lote experimental.

En ensayos no pretratados con hidróxido de sodio, el valor máximo del CSF que pudo ser fermentado fue de 1,51 (Tabla 5.11.) mientras que en los pretratados con hidróxido de sodio fue de 1,59 (Tabla 5.19.). Esto sucede probablemente como consecuencia de la importante concentración de ácido acético presente en los ensayos de biomasa de poda de olivo de partida con CSF superior a 1,48, que supera los $2,9\text{ g/dm}^3$, combinado con el efecto conjunto de grandes concentraciones de ácido fórmico ($>2,3\text{ g/dm}^3$), furanos totales ($>1,1\text{ g/dm}^3$) y compuestos fenólicos totales ($>4,3\text{ g/dm}^3$).

Algunos autores establecen que la fermentación de etanol no puede llevarse a cabo en hidrolizados donde las concentraciones de ácido acético superan los 2 g/dm^3 , Guo *et al.* (2008) [75]; Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000) [139]; Wei *et al.* (2012) [200]), lo que hace necesario un paso de detoxificación que elimine o reduzca este inhibidor, Trinh *et al.* (2014) [195]).

El pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio permitió pues mejoras en la fermentación posiblemente debido a la drástica reducción de ácido acético dejándolo en cantidades por debajo de $0,17 \text{ g/dm}^3$, así como las menores concentraciones encontradas de ácido fórmico ($\leq 1,54 \text{ g/dm}^3$), furanos totales ($\leq 0,77 \text{ g/dm}^3$) y compuestos fenólicos totales ($\leq 2,36 \text{ g/dm}^3$).

El mayor incremento de los niveles de compuestos tóxicos se da a partir de un CSF superior a 1,70. En estas condiciones el contenido de inhibidores en el hidrolizado aumentó de 2,6 a $2,8 \text{ g/dm}^3$ de ácido fórmico, de 1,3 a $3,4 \text{ g/dm}^3$ de furanos totales y de 2,7 a $3,1 \text{ g/dm}^3$ de compuestos fenólicos totales, lo que hizo que la actividad del microorganismo se viera seriamente afectada, revelando su sensibilidad a estos inhibidores de diferente naturaleza.

En cuanto a cómo afecta la eliminación del ácido acético al metabolismo de la levadura, se produce un aumento en los valores del rendimiento de etanol ($Y_{E/s}$) y la productividad (q_E) en comparación con la biomasa no desacetilada.

Los valores máximos de $Y_{E/s}$ y q_E se obtuvieron cuando el CSF fue de 1,05, siendo el valor del rendimiento obtenido ($0,45 \text{ g/g}$), lo cual supone un 87% del máximo alcanzable, implicando un valor ligeramente superior a lo descrito por Chen *et al.* (2012b) [43] para el hidrolizado de paja de arroz. Estos autores discuten además que otros hidrolizados hemicelulósicos procedentes de madera de álamo, cáscara de semilla de girasol y maíz, por ejemplo, muestran valores para este parámetro normalmente en el rango de 0,37 a $0,42 \text{ g/g}$.

El estudio de Krahulec *et al.* (2012) [92] se centró en el uso de medio sintético de D-xilosa (22 g/dm^3) a 30°C y $18,85 \text{ rad/s}$, obteniendo un rendimiento de etanol de $0,41 \pm 0,01 \text{ g/g}$ con *P. stipitis* CBS 6054 en condiciones microaeróbicas, similar al obtenido en nuestro estudio con un CSF de 1,05. Por otro lado, Agbogbo *et al.* (2006) [2] mostraron el mayor rendimiento de etanol ($0,44 \text{ g/g}$) para mezclas sintéticas de azúcares puros (D-xilosa/D-glucosa) superiores al 50% observando que presentaban tendencias similares a los hidrolizados procedentes de otras biomasas.

5.3.2. Pretratamiento con peróxido de hidrógeno: hidrólisis ácida y fermentación

Este pretratamiento químico con agua oxigenada fue llevado a cabo sobre biomasa de poda de olivo de partida, como etapa previa a la hidrólisis con ácido oxálico en condiciones óptimas y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4.3.2.

La efectividad del proceso de deslignificación se relaciona con lograr una accesibilidad de la celulosa mayor, así como disminuir el número de enlaces de celulosa improductivos, Meng y Ragauskas (2014) [131]; Singh *et al.* (2014) [179]). El uso de peróxido de hidrógeno en medio alcalino ha sido descrito por otros autores como un pretratamiento eficaz que promueve la despolimerización de la lignina por la acción oxidativa de los radicales derivados del H_2O_2 , da Costa Correia *et al.* (2013) [55].

Tras realizar los ensayos, que fueron llevados a cabo por duplicado, se caracterizaron los sólidos resultantes en cuanto a su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina. La Tabla 5.21. recoge los valores de composición de las tres fracciones estructurales obtenidas para cada experimento del diseño, junto con el valor medio y la desviación estándar correspondiente.

Tabla 5.21. Composición, en porcentaje, de los sólidos resultantes del pretratamiento con H₂O₂

Ensayo	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
PER-1	33,87	22,40	20,71
PER (BIS)-1	32,66	19,53	19,88
PER-1 media	33,27 ± 0,86	20,97 ± 2,03	20,30 ± 0,59
PER-2	17,88	17,30	18,33
PER (BIS)-2	30,71	16,88	17,24
PER-2 media	24,30 ± 9,07	17,09 ± 0,30	17,79 ± 0,77
PER-3	31,69	20,78	24,32
PER (BIS)-3	32,76	23,10	24,51
N3 media	32,23 ± 0,76	21,94 ± 1,64	24,42 ± 0,13
PER-4	27,62	18,73	23,73
PER (BIS)-4	33,88	21,31	23,65
4 media	30,75 ± 4,43	20,02 ± 1,82	23,69 ± 0,06
PER-5	23,71	15,29	22,69
PER (BIS)-5	31,83	20,58	23,17
N5 media	27,77 ± 5,74	17,94 ± 3,74	22,93 ± 0,34
PER-6	25,57	16,47	23,10
PER (BIS)-6	35,13	22,46	22,35
PER-6 media	30,35 ± 6,76	19,47 ± 4,24	22,73 ± 0,53
PER-7	25,68	17,24	23,85
PER (BIS)-7	31,23	20,17	22,78
PER-7 media	28,46 ± 3,92	18,71 ± 2,07	23,32 ± 0,76
PER-8	28,91	18,62	21,08
PER (BIS)-8	27,77	17,88	22,61
PER-8 media	28,34 ± 0,81	18,25 ± 0,52	21,85 ± 1,08
PER-9	33,71	20,63	19,25
PER (BIS)-9	23,95	15,48	22,22
PER-9 media	28,83 ± 6,90	18,06 ± 3,64	20,74 ± 2,10
PER-10	26,43	16,19	19,84
PER (BIS)-10	34,62	18,95	17,13
PER-10 media	30,53 ± 5,79	17,57 ± 1,95	18,49 ± 1,92
PER-11	29,46	19,76	21,53
PER (BIS)-11	29,01	19,27	21,67
PER-11 media	29,24 ± 0,32	19,52 ± 0,35	21,60 ± 0,10
PER-12	31,75	21,94	22,71
PER (BIS)-12	34,12	22,92	20,93
PER-12 media	32,94 ± 1,68	22,43 ± 0,69	21,82 ± 1,26
PER-13	32,37	19,98	20,59
PER (BIS)-13	34,93	20,89	17,56
PER-13 media	33,65 ± 1,81	20,44 ± 0,64	19,08 ± 2,14
PER-14	34,36	21,30	17,71
PER (BIS)-14	34,68	20,76	17,00
PER-14 media	34,52 ± 0,23	21,03 ± 0,38	17,36 ± 0,50
PER-15	31,49	15,86	21,27
PER (BIS)-15	33,24	17,08	21,88
PER-15 media	32,37 ± 1,24	16,47 ± 0,86	21,58 ± 0,43
PER-16	35,47	16,88	18,27
PER (BIS)-16	35,03	24,06	20,26
PER-16 media	35,25 ± 0,31	20,47 ± 5,08	19,27 ± 1,41
PER-17	31,83	19,35	20,19
PER (BIS)-17	33,76	19,60	20,60
PER-17 media	32,80 ± 1,36	19,48 ± 0,18	20,40 ± 0,29
PER-18	32,50	20,13	21,68
PER (BIS)-18	29,00	17,80	20,41
PER-18 media	30,75 ± 2,47	18,97 ± 1,65	21,05 ± 0,90

Conocida la composición de la biomasa de poda de olivo de partida, junto con la masa seca de biomasa utilizada y obtenida en cada ensayo y su composición, fueron calculados los porcentajes de eliminación de celulosa, hemicelulosa y lignina. La Tabla 5.22. recoge dichos porcentajes de eliminación, junto a los valores codificados de las variables de estudio para cada ensayo, según establece el diseño de experimentos.

Tabla 5.22. Valor codificado de las variables de estudio y porcentajes medios de celulosa, hemicelulosa y lignina eliminadas por el pretratamiento con peróxido de hidrógeno para cada ensayo

Ensayo	tiempo (min)	T (°C)	H ₂ O ₂ (%)	pH	% Celulosa eliminada	% Hemicelulosa eliminada	% Lignina eliminada
PER-1	-1	-1	-1	-1	19,20 ± 4,49	14,08 ± 2,84	18,70 ± 3,32
PER-2	1	-1	-1	-1	41,83 ± 1,13	26,27 ± 0,05	25,66 ± 4,82
PER-3	-1	1	-1	-1	29,51 ± 2,82	18,80 ± 3,95	19,28 ± 5,10
PER-4	1	1	-1	-1	38,20 ± 3,99	27,25 ± 5,56	22,71 ± 1,33
PER-5	-1	-1	1	-1	25,65 ± 6,69	15,73 ± 6,96	13,12 ± 1,26
PER-6	1	-1	1	-1	41,03 ± 7,82	20,87 ± 7,41	18,60 ± 3,52
PER-7	-1	1	1	-1	41,07 ± 4,06	35,44 ± 7,74	21,70 ± 2,54
PER-8	1	1	1	-1	43,91 ± 1,24	33,65 ± 1,47	29,87 ± 3,93
PER-9	-1	-1	-1	1	40,42 ± 6,97	32,55 ± 6,60	30,46 ± 7,46
PER-10	1	-1	-1	1	45,10 ± 4,93	31,90 ± 5,18	38,97 ± 4,09
PER-11	-1	1	-1	1	51,53 ± 2,43	39,43 ± 2,52	32,61 ± 7,02
PER-12	1	1	-1	1	42,58 ± 0,14	29,26 ± 1,59	38,14 ± 6,85
PER-13	-1	-1	1	1	32,72 ± 2,44	35,06 ± 4,08	36,46 ± 4,15
PER-14	1	-1	1	1	30,57 ± 0,40	24,87 ± 1,44	43,63 ± 1,69
PER-15	-1	1	1	1	49,86 ± 1,97	56,88 ± 2,44	47,30 ± 1,16
PER-16	1	1	1	1	30,53 ± 2,05	36,18 ± 6,08	53,59 ± 2,14
PER-17	0	0	0	0	35,98 ± 0,86	27,66 ± 0,91	32,06 ± 1,21
PER-18	0	0	0	0	37,90 ± 4,94	31,10 ± 5,98	29,12 ± 2,73
PER-19	0	0	0	0	36,94 ± 2,54	29,38 ± 2,41	30,59 ± 1,83

De los datos obtenidos se observa un porcentaje de eliminación de lignina que se sitúa en el rango 13,12±1,26 - 53,59±2,14. La eliminación de dicha lignina aumenta la disponibilidad de celulosa para su posterior degradación, generando una mayor producción de glucosa, que favorecerá el proceso fermentativo, Ravindran y Jaiswal (2016) [154]. No obstante, la

eliminación de lignina debe realizarse a temperaturas suaves, Zeng *et al.* (2014) [211], evitando la degradación de celulosa y hemicelulosa cuyos porcentajes de eliminación con el pretratamiento con H_2O_2 se encuentran en el intervalo $19,20 \pm 4,49$ - $51,53 \pm 2,43$ y $14,08 \pm 2,84$ - $56,88 \pm 2,44$, respectivamente.

El ajuste del modelo se realizó en función de los porcentajes de eliminación obtenidos experimentalmente.

Teniendo en cuenta todos los datos recogidos se obtuvieron tres ecuaciones, una para cada uno de los porcentajes de eliminación en estudio, siendo la ecuación 5.8. la correspondiente al porcentaje de eliminación de celulosa ($\%CEL_{elim}$), la ecuación 5.9. para el porcentaje de eliminación de hemicelulosa ($\%HEM_{elim}$) y la ecuación 5.10. para el porcentaje de eliminación de lignina ($\%LIG_{elim}$). De dichas expresiones matemáticas se descartaron las interacciones entre variables consideradas no significativas.

$$\%CEL_{elim} = 37,61 + 1,40X_3 + 2,99X_4 - 0,77X_5 + 2,53X_6 - 3,18X_3X_4 - 1,68X_3X_5 - 4,18X_3X_6 + 1,12X_4X_5 - 3,27X_5X_6 \quad (5.8)$$

$$\%HEM_{elim} = 29,81 - 1,04X_3 + 4,45X_4 + 2,31X_5 + 5,54X_6 - 1,71X_3X_4 - 2,08X_3X_5 - 3,65X_3X_6 + 3,09X_4X_5 \quad (5.9)$$

$$\%LIG_{elim} = 30,66 + 3,04X_3 + 2,33X_4 + 2,22X_5 + 8,93X_6 + 2,32X_4X_5 + 2,48X_5X_6 \quad (5.10)$$

Donde:

$\%CEL_{elim}$: porcentaje de celulosa eliminado

$\%HEM_{elim}$: porcentaje de hemicelulosa eliminado

$\%LIG_{elim}$: porcentaje de lignina eliminado

X_3 : tiempo

X_4 : temperatura

X_5 : concentración H_2O_2

X_6 : pH

(Para la realización de cálculos, los valores de estas variables se introducirán codificados según el modelo)

Según el valor de los diferentes coeficientes de determinación ($R^2 \geq 0,99$), considerando el número de factores que intervienen en los modelos correspondientes para el ajuste de regresión lineal, se corrobora la bondad de dichos modelos, como puede observarse en la Figura 5.15.

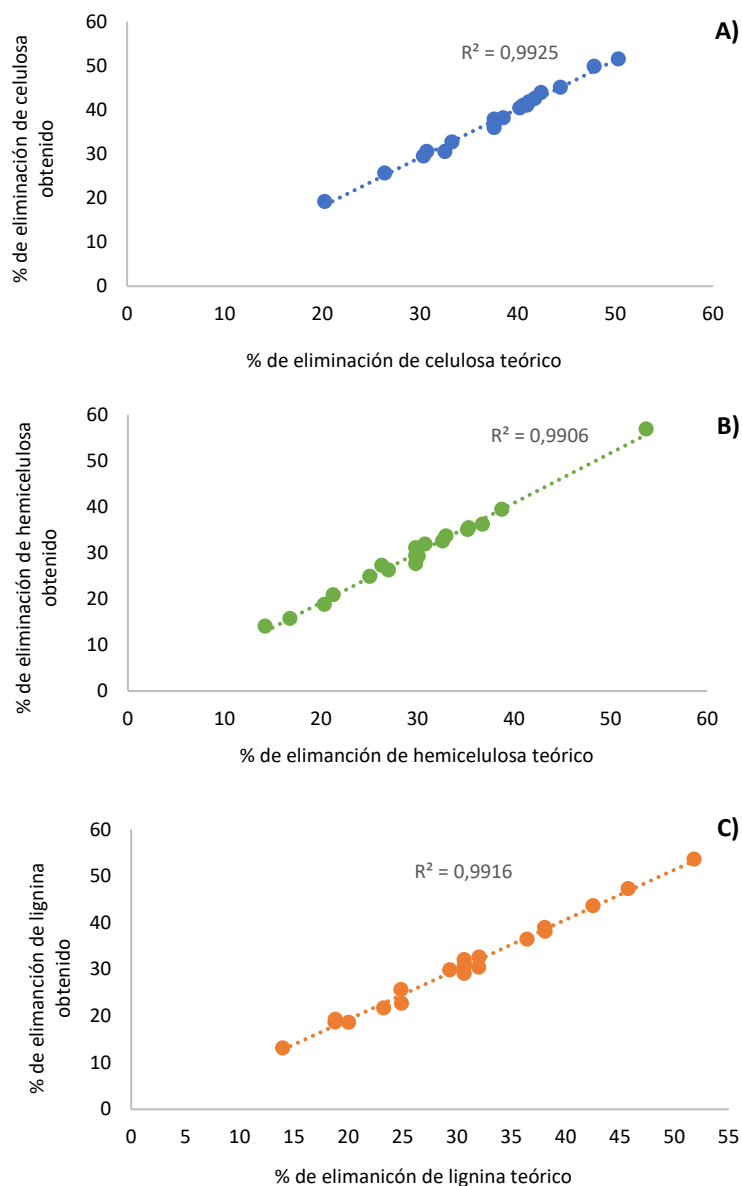


Fig. 5.15. Representación del ajuste del modelo estadístico, % de eliminación teórico frente a % de eliminación obtenido para: A) Celulosa; B) Hemicelulosa y C) Lignina

Con estos valores, el análisis estadístico ANOVA (análisis de varianza) para el ajuste obtenido con respecto a cada fracción estructural queda recogido en la Tabla 5.23.

Tabla 5.23. Análisis ANOVA para el modelo estadístico en el pretratamiento con H₂O₂

Celulosa eliminada (%)	Coeff. SC	Std. Err.	P-valor	Conf. int()
Constant	37,607	0,218	0,000000	0,493
X ₃	1,402	0,224	0,000147	0,506
X ₄	2,986	0,224	0,000000	0,506
X ₅	-0,768	0,224	0,007493	0,506
X ₆	2,529	0,224	0,000001	0,506
X ₃ X ₄	-3,183	0,211	0,000000	0,477
X ₃ X ₅	-1,684	0,211	0,000023	0,477
X ₃ X ₆	-4,183	0,211	0,000000	0,477
X ₄ X ₅	1,118	0,211	0,000493	0,477
X ₅ X ₆	-3,271	0,211	0,000000	0,477
$N = 19$ $R^2 = 0,993$ $DF = 9$ $R^2_{Adj} = 0,986$ $RSD = 0,949$				
Hemicelulosa eliminada (%)	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int()
Constant	29,808	0,274	0,000000	0,610
X ₃	-1,044	0,281	0,004044	0,627
X ₄	4,452	0,281	0,000000	0,627
X ₅	2,306	0,281	0,000010	0,627
X ₆	5,541	0,281	0,000000	0,627
X ₃ X ₄	-1,706	0,265	0,000076	0,591
X ₃ X ₅	-2,076	0,265	0,000014	0,591
X ₃ X ₆	-3,650	0,265	0,000000	0,591
X ₄ X ₅	3,093	0,265	0,000000	0,591
$N = 19$ $R^2 = 0,991$ $DF = 10$ $R^2_{Aj} = 0,984$ $RSD = 1,194$				
Lignina eliminada (%)	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int()
Constant	30,662	0,262	0,000000	0,570
X ₃	3,037	0,269	0,000000	0,586
X ₄	2,333	0,269	0,000002	0,586
X ₅	2,224	0,269	0,000003	0,586
X ₆	8,928	0,269	0,000000	0,586
X ₄ X ₅	2,317	0,253	0,000001	0,552
X ₅ X ₆	2,437	0,253	0,000001	0,552
$N = 19$ $R^2 = 0,992$ $DF = 12$ $R^2_{Aj} = 0,988$ $RSD = 1,141$				

N= n° de experimentos; DF= grados de libertad, “degrees of freedom”; R²= coeficiente de determinación; R²adj= coeficiente de determinación ajustado; RSD= desviación estándar relativa

Para la optimización del modelo estadístico se consideró que los porcentajes de las fracciones celulósica y hemicelulósica eliminados debían ser minimizados, a fin de no perder azúcares fermentables, mientras que se maximizó la eliminación de lignina, favoreciendo la degradación de la compacta estructura, así como la solubilización parcial de la fracción ligninica ya que esta dificulta la obtención de hidrolizados ácidos aptos para procesos fermentativos.

Con estas consideraciones y las ecuaciones obtenidas se estableció el óptimo de trabajo en unas condiciones de pretratamiento de 120 minutos, 50 °C, 10% (p/v) de peróxido de hidrógeno y pH 12, en valores codificados (1, -1, 1, 1), que coinciden con el ensayo PER-14.

La confirmación del óptimo se llevó a cabo con la realización de cuatro ensayos en las citadas condiciones óptimas, denominados con las siglas PER, al igual que el resto de ensayos, pero en este caso seguidas de OPT (condiciones óptimas) y un número correlativo que indica la réplica de la que se trata.

De los ensayos en condiciones óptimas fueron obtenidos los valores de composición del material pretratado con peróxido de hidrógeno en porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina recogidos en la Tabla 5.24. En dicha Tabla se comparan además los valores medios de los resultados experimentales con el valor teórico calculado a partir del modelo, observando que las diferencias entre ambos valores son muy poco significativas.

Tabla 5.24. Porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina eliminadas mediante el pretratamiento con H₂O₂ en 4 réplicas de las condiciones óptimas

Ensayo	<i>Celulosa eliminada (%)</i>	<i>Hemicelulosa eliminada (%)</i>	<i>Lignina eliminada (%)</i>
PER-OPT 1	34,51	20,75	35,82
PER-OPT 2	34,87	21,88	36,19
PER-OPT 3	33,53	22,68	36,98
PER-OPT 4	34,67	21,30	35,82
Valor medio experimental	34,40	21,65	36,20
Valor teórico	30,71	25,39	38,73
Desviación estándar	2,61	2,64	1,79

Tras esta confirmación, se realizaron pretratamientos de la biomasa de partida con agua oxigenada, en condiciones experimentales óptimas, tantas veces como fue necesario a fin de obtener material lignocelulósico pretratado, en cantidades suficientes para el posterior proceso de hidrólisis con ácido oxálico diluido en las mejores condiciones establecidas anteriormente (150 °C, 30 minutos, ácido oxálico 0,075 M y CSF= 1,53).

5.3.2.1. Hidrólisis ácida de material pretratado con peróxido de hidrógeno

El material lignocelulósico obtenido del pretratamiento con peróxido de hidrógeno en condiciones óptimas (120 minutos, 50 °C, H₂O₂ 10% (p/v) y pH 12) fue secado a temperatura ambiente hasta alcanzar una humedad inferior al 10%, tras lo cual sufrió un proceso de hidrólisis con ácido oxálico, según se describió con anterioridad en el apartado 5.2., bajo unas condiciones de 150 °C, 0,75 M de ácido oxálico, 30 minutos de tratamiento y relación sólido/líquido de 1/10.

Los ensayos se realizaron por triplicado, sometiendo a la biomasa de poda de olivo de partida a pretratamiento con peróxido de hidrógeno y posterior hidrólisis ácida, lo que supuso un doble tratamiento secuencial.

Los hidrolizados obtenidos fueron denominados como “HPER” seguidos de una letra según su orden correlativo. Los valores, para dichos hidrolizados, de los parámetros de severidad Log R_o y CSF y la composición en azúcares simples y algunos inhibidores fermentativos (ácido acético y ácido fórmico) se recogen en la Tabla 5.25.

Tabla 5.25. Valores de parámetros de severidad y composición de los hidrolizados ácidos obtenidos con materia prima pretratada con H₂O₂ en condiciones óptimas

	Log R _o	CSF	Azúcares, g/dm ³			Ácido acético (g/dm ³)	Ácido fórmico (g/dm ³)
			D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa		
HPER-a	2,80	1,11	8,64	19,48	5,17	2,87	2,35
HPER-b	2,68	1,03	7,43	19,50	6,72	2,94	2,99
HPER-c	2,78	1,08	7,96	19,15	5,81	2,66	2,79
Valor medio	2,75 ± 0,06	1,07 ± 0,04	8,01 ± 0,61	19,37 ± 0,20	5,90 ± 0,78	2,82 ± 0,15	2,71 ± 0,33

De los valores de CSF establecidos en la Tabla anterior se observa cómo el coeficiente de severidad combinado, para estos tratamientos de hidrólisis con ácido oxálico sobre biomasa de poda pretratada con H_2O_2 , toma valores por debajo de los obtenidos en las hidrólisis bajo las mismas condiciones realizadas con biomasa de poda de olivo de partida, pasando de un valor de CSF de $1,56 \pm 0,05$ en biomasa sin tratar, a un valor de CSF de $1,07 \pm 0,04$ en biomasa tratada con peróxido de hidrógeno en condiciones óptimas, pudiendo deberse el mismo a diferencias significativas en el pH de las disoluciones obtenidas. Además, merece la pena señalar que, en general, las desviaciones estándar de las réplicas realizadas han sido muy poco significativas.

Las cantidades de D-xilosa en los hidrolizados ácidos obtenidos a partir de sólidos pretratados con H_2O_2 fueron casi dos veces y media superiores a las de D-glucosa, lo que podría poner de manifiesto la menor resistencia a la degradación de la hemicelulosa frente a la celulosa, así como, posiblemente, la mayor presencia de dicha pentosa frente a la hexosa en la fracción hemicelulósica.

5.3.2.2. Fermentación de hidrolizados ácidos de sólidos pretratados con peróxido de hidrógeno

Tras el proceso de hidrólisis en las condiciones más favorables, en cuanto a composición de azúcares e inhibidores, al que se sometió la biomasa pretratada con peróxido de hidrógeno, con un modelo optimizado, se obtuvieron unos hidrolizados destinados a la obtención de etanol mediante un proceso fermentativo.

Los hidrolizados ácidos fueron sometidos, en primer lugar, a un proceso de acondicionamiento basado en centrifugación, ajuste de pH y adición de nutrientes descrito en los apartados 4.4.5. y 4.4.6. de esta memoria.

Se llevaron a cabo dos ensayos fermentativos correspondientes a los hidrolizados denominados HPER-a y HPER-b, en igualdad de condiciones, realizando en cada uno de ellos las determinaciones de los parámetros analizados por triplicado, para una mayor fiabilidad de los datos obtenidos.

El microorganismo de trabajo seleccionado fue *Pichia stipitis* CBS 6054 por sus mejores resultados en el resto de fermentaciones realizadas.

La Tablas 5.26 y 5.27. recogen los valores medios (calculados a partir de los ensayos por triplicado) de: tiempo de fermentación (t) y concentraciones de biomasa (x), principales azúcares simples (D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa), azúcares totales (S_T) y etanol, presentes en el líquido de fermentación a partir de los ensayos HPER-a y HPER-b, respectivamente.

Tabla 5.26. Valores medios de concentración de biomasa, azúcares y etanol (g/dm^3) a diferentes tiempos en el ensayo fermentativo HPER-a

t	x	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	S_T	Etanol
0	0,296 $\pm$ 0,028	7,484 $\pm$ 0,209	19,337 $\pm$ 0,088	3,024 $\pm$ 0,328	29,85 $\pm$ 0,62	-
15	0,422 $\pm$ 0,003	6,673 $\pm$ 0,113	18,559 $\pm$ 0,126	3,062 $\pm$ 0,016	28,29 $\pm$ 0,22	0,225 $\pm$ 0,004
22	1,138 $\pm$ 0,057	2,173 $\pm$ 0,260	17,764 $\pm$ 0,100	3,073 $\pm$ 0,034	23,01 $\pm$ 0,19	1,554 $\pm$ 0,018
26	1,346 $\pm$ 0,063	1,825 $\pm$ 0,011	17,155 $\pm$ 0,124	3,330 $\pm$ 0,004	22,31 $\pm$ 0,13	2,199 $\pm$ 0,040
39	1,898 $\pm$ 0,054	1,738 $\pm$ 0,014	11,116 $\pm$ 0,355	2,655 $\pm$ 0,031	15,51 $\pm$ 0,40	3,038 $\pm$ 0,066
46	2,092 $\pm$ 0,011	1,790 $\pm$ 0,134	9,558 $\pm$ 0,556	2,685 $\pm$ 0,190	14,03 $\pm$ 0,88	3,627 $\pm$ 0,212
63	2,448 $\pm$ 0,147	1,777 $\pm$ 0,013	5,625 $\pm$ 0,256	2,402 $\pm$ 0,083	9,80 $\pm$ 0,36	4,454 $\pm$ 0,167
71	2,435 $\pm$ 0,290	1,723 $\pm$ 0,086	5,186 $\pm$ 0,090	2,124 $\pm$ 0,153	9,03 $\pm$ 0,33	4,546 $\pm$ 0,092
90	2,590 $\pm$ 0,212	1,615 $\pm$ 0,021	4,882 $\pm$ 0,490	-	6,50 $\pm$ 0,51	4,224 $\pm$ 0,093
96	2,460 $\pm$ 0,170	1,604 $\pm$ 0,012	4,811 $\pm$ 0,127	-	6,41 $\pm$ 0,14	4,215 $\pm$ 0,086

t: tiempo (horas), x: concentración de biomasa (g/dm^3), S_T : concentración de azúcares totales (g/dm^3)

Tabla 5.27. Valores medios de concentración de biomasa, azúcares y etanol (g/dm³) a diferentes tiempos en el ensayo fermentativo HPER-b

t	x	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	St	Etanol
0	0,438 ± 0,003	6,307 ± 0,011	18,449 ± 0,010	4,161 ± 0,006	28,92 ± 0,02	-
7	0,557 ± 0,055	5,845 ± 0,031	18,271 ± 0,025	4,401 ± 0,064	28,52 ± 0,12	0,164 ± 0,001
18	1,308 ± 0,110	1,698 ± 0,018	16,197 ± 0,110	3,588 ± 0,052	21,48 ± 0,18	2,026 ± 0,040
22	1,515 ± 0,082	1,654 ± 0,022	16,125 ± 0,289	3,540 ± 0,061	21,32 ± 0,36	2,324 ± 0,084
26	1,668 ± 0,122	1,604 ± 0,007	14,903 ± 0,310	3,458 ± 0,019	19,96 ± 0,32	2,512 ± 0,034
31	1,832 ± 0,091	1,602 ± 0,013	12,995 ± 0,456	3,367 ± 0,059	17,96 ± 0,53	2,974 ± 0,036
44	2,192 ± 0,136	1,580 ± 0,041	7,595 ± 0,463	3,019 ± 0,057	12,19 ± 0,56	4,322 ± 0,142
49	2,245 ± 0,175	1,585 ± 0,020	6,309 ± 0,314	2,940 ± 0,004	10,83 ± 0,29	4,808 ± 0,170
55	2,465 ± 0,082	1,543 ± 0,001	4,944 ± 0,147	2,719 ± 0,057	9,21 ± 0,20	4,947 ± 0,088
68	2,605 ± 0,120	1,574 ± 0,032	4,840 ± 0,057	1,840 ± 0,072	8,25 ± 0,12	4,649 ± 0,187
74	2,615 ± 0,049	1,476 ± 0,012	4,833 ± 0,037	1,659 ± 0,095	7,97 ± 0,15	4,645 ± 0,246
79	2,630 ± 0,141	1,528 ± 0,013	4,889 ± 0,098	1,385 ± 0,210	7,80 ± 0,30	4,244 ± 0,272
93	2,585 ± 0,097	1,492 ± 0,028	4,821 ± 0,085	1,295 ± 0,098	7,61 ± 0,24	4,123 ± 0,169

Los valores experimentales obtenidos en los ensayos de fermentación también quedan reflejados en la Fig. 5.16., donde se observa como en ambos casos (A y B) se produjo un simultáneo y rápido consumo de azúcares, agotándose prácticamente la totalidad de la D-glucosa en torno a las 20 horas del inicio de los ensayos, mientras que la concentración de D-xilosa sufrió una brusca caída entre las 30 y 40 h.

En cuanto a la obtención de etanol, se alcanzaron valores máximos de este bioproducto de 4,546 g/dm³ y 4,947 g/dm³ a las 71 y 55 horas, respectivamente.

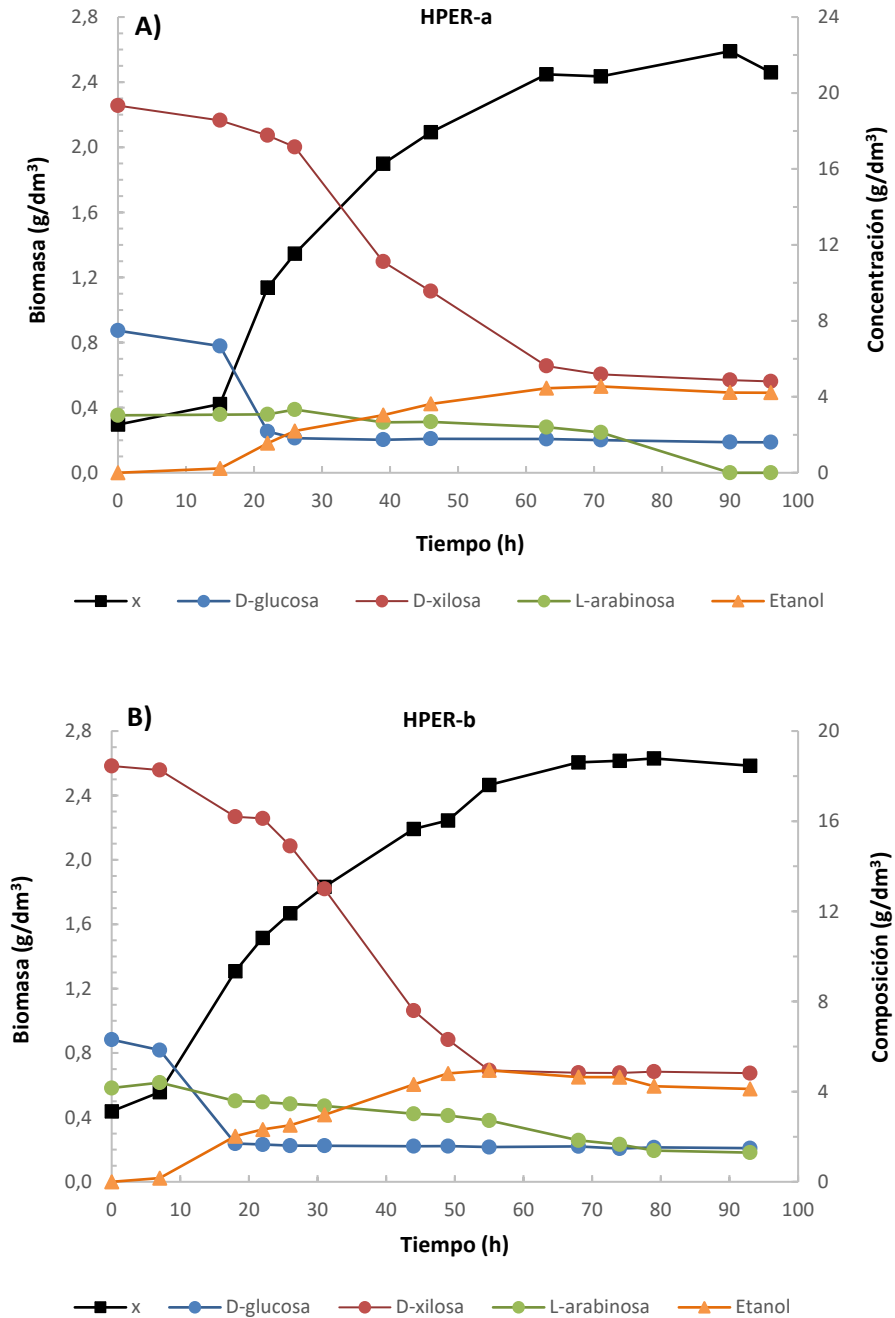


Fig. 5.16. Representación gráfica de la evolución temporal de la concentración de: biomasa, azúcares simples (D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa) y etanol en los ensayos de fermentación de los hidrolizados A) HPER-a y B) HPER-b

A partir de los datos primarios obtenidos y representados se han podido calcular los rendimientos en etanol, porcentajes sobre el rendimiento máximo teórico y productividades máximas para *P. stipitis* CBS 6054 como valor medio en estos hidrolizados, recogiendo en las Tablas 5.28. y 5.29. correspondientes a HPER-a y HPER-b, respectivamente.

Tabla 5.28. Parámetros fermentativos correspondientes al experimento con *Pichia stipitis* CBS 6054 a partir del hidrolizado HPER-a

HPER-a						
t, h	EtOH	S_T	% S_{cons}	$Y_{E/S}$	% RTM	q_E
0	-	29,845	-	-	-	-
15	0,225	28,294	5,2	0,15	28,2	0,015
22	1,554	23,010	22,9	0,23	44,1	0,071
26	2,199	22,309	25,3	0,29	56,6	0,085
39	3,038	15,509	48,0	0,21	41,1	0,078
46	3,627	14,032	53,0	0,23	44,5	0,079
63	4,454	9,803	67,2	0,22	43,2	0,071
71	4,546	9,033	69,7	0,22	42,4	0,064
90	4,224	6,496	78,2	0,18	35,1	0,047
96	4,215	6,415	78,5	0,18	34,9	0,044

t: tiempo (horas); EtOH: concentración de etanol (g/dm³), S_T : azúcares totales (g/dm³), % S_{cons} : porcentaje de azúcares totales consumidos; $Y_{E/S}$ = rendimiento en etanol (g/g), % RTM : porcentaje sobre el rendimiento teórico total y q_E = productividad de etanol (g/dm³ h)

Tabla 5.29. Parámetros fermentativos correspondientes al experimento con *Pichia stipitis* CBS 6054 a partir del hidrolizado HPER-b

HPER-b						
<i>t</i> , h	EtOH	<i>S_T</i>	% <i>S_{cons}</i>	<i>Y_{E/S}</i>	% <i>RTM</i>	<i>q_E</i>
0	-	28,917	-	-	-	-
7	0,164	28,517	1,4	0,41	79,3	0,023
18	2,026	21,483	25,7	0,27	52,9	0,113
22	2,324	21,319	26,3	0,31	59,4	0,106
26	2,512	19,965	31,0	0,28	54,5	0,097
31	2,974	17,963	37,9	0,27	52,7	0,096
44	4,322	12,194	57,8	0,26	50,2	0,098
49	4,808	10,834	62,5	0,27	51,6	0,098
55	4,947	9,206	68,2	0,25	48,7	0,090
68	4,649	8,254	71,5	0,23	43,7	0,068
74	4,645	7,967	72,5	0,22	43,1	0,063
79	4,244	7,801	73,0	0,20	39,0	0,054
93	4,123	7,608	73,7	0,19	37,6	0,044

t: tiempo (horas); EtOH: concentración de etanol (g/dm³), *S_T*: azúcares totales (g/dm³), % *S_{cons}*: porcentaje de azúcares totales consumidos; *Y_{E/S}* = rendimiento en etanol (g/g), %*RTM*: porcentaje sobre el rendimiento teórico máximo y *q_E* = productividad de etanol (g/dm³ h)

Los rendimientos en etanol, para la producción máxima de este bioproducto, se situó en el intervalo 0,22-0,25 g/g, representando un rango de porcentajes respecto al rendimiento teórico máximo del 42,4-48,7%, y de productividades en etanol del 0,064-0,090 g/dm³h.

Los bajos rendimientos obtenidos podrían ser debidos a las cantidades de inhibidores presentes en los hidrolizados, con concentraciones de ácido acético de 2,82±0,15 g/dm³ y ácido fórmico de 2,71±0,33 g/dm³, según se recoge en la Tabla 5.25.

Con el fin de reducir estos inhibidores algunos autores sugieren la realización de un doble tratamiento secuencial que combine una etapa de pre-extracción con hidróxido de sodio, seguida de un pretratamiento con peróxido de hidrógeno, Yuan *et al.* (2018) [206].

5.3.3. Tratamiento de detoxificación de hidrolizados ácidos con borohidruro de sodio

Este tratamiento de detoxificación fue llevado a cabo tras la hidrólisis con ácido oxálico en las condiciones más idóneas definidas con anterioridad (150 °C, 75 mM de ácido oxálico y 30 minutos de tratamiento con CSF= $1,56 \pm 0,05$) de la biomasa de poda de olivo de partida, siguiendo el procedimiento de trabajo descrito en el apartado 4.4.3.2. a fin de reducir determinados compuestos inhibidores.

Teniendo en cuenta otras investigaciones previas, el NaBH_4 se considera un buen agente reductor en la síntesis de alcoholes a partir de cetonas y aldehídos Cao *et al.* (2005) [36]. En este estudio se pretende comprobar además su capacidad detoxificante a la hora de reducir fundamentalmente las concentraciones de furanos y compuestos fenólicos totales en el medio de fermentación.

El hidrolizado obtenido tras el tratamiento con ácido oxálico, sobre el cual se realizarán los ensayos de este tratamiento de detoxificación fue caracterizado obteniendo la siguiente composición: 16,64 g/dm³ de D-glucosa, 15,05 g/dm³ de D-xilosa, 5,16 g/dm³ de L-arabinosa, 2,87 g/dm³ de ácido acético, 3,18 g/dm³ de compuestos fenólicos y 0,96 g/dm³ de furanos, además el hidrolizado presenta un pH inicial medio de $1,4 \pm 0,3$.

El hecho de que el hidrolizado de partida presente valores de pH tan bajos, aparte de deberse a la presencia de ácido residual en el medio, podría estar causado por la despolimerización de formas oligoméricas a monoméricas de azúcares y por acumulación de productos tóxicos de degradación como resultado de las condiciones de severidad alcanzadas, Scordia *et al.* (2011) [173].

Para realizar el diseño de experimentos con NaBH_4 se aplicó nuevamente una metodología de superficie de respuesta con el fin de determinar los valores que debían tomar las 3 variables de estudio (tiempo, de 3,2 a 36,8 min, concentración de NaBH_4 de 9,6 a 110,4 mM y pH de 3,32 a 6,68) para optimizar los resultados del tratamiento.

Los softwares utilizados para obtener el diseño estadístico, el modelo de regresión, el análisis gráfico y la predicción de los valores de las variables de estudio optimizadas fueron Statistica (v. 8.0, StatSoft, EE. UU.) y Design Expert (v. 6.0).

Las Tablas 5.30 y 5.31 muestran los resultados obtenidos tanto para el hidrolizado ácido de biomasa de partida, como para los 16 ensayos del diseño de experimentos empleando NaBH_4 (especificado con anterioridad en el apartado 4.4.4.3.), habiéndose realizado por triplicado las determinaciones de las concentraciones de compuestos furánicos y fenólicos, respectivamente, que se encontraban presentes en el líquido de hidrólisis.

Tabla 5.30. Concentración de furanos en g/dm³ presentes en los hidrolizados ácidos, sin y con tratamiento de detoxificación con NaBH₄

Ensayo	ABS ₂₈₄	ABS ₃₂₀	Tasa de Dilución	Furanos g/dm ³	Valor Medio
Biomasa de partida	0,196	0,036	1000	0,819	0,959 ± 0,122
	0,388	0,069	500	1,035	
	0,390	0,074	500	1,024	
BH1	0,313	0,073	500	0,724	0,725 ± 0,009
	0,300	0,062	500	0,717	
	0,658	0,136	200	0,734	
BH2	0,096	0,032	500	0,031	0,062 ± 0,046
	0,100	0,034	500	0,039	
	0,240	0,111	200	0,115	
BH3	0,099	0,015	500	0,110	0,108 ± 0,002
	0,107	0,024	500	0,106	
	0,214	0,090	200	0,107	
BH4	0,118	0,054	500	0,031	0,059 ± 0,051
	0,112	0,049	500	0,028	
	0,234	0,103	200	0,118	
BH5	0,268	0,054	500	0,622	0,613 ± 0,010
	0,258	0,049	500	0,602	
	0,571	0,125	200	0,614	
BH6	0,075	0,011	500	0,031	0,060 ± 0,033
	0,084	0,015	500	0,051	
	0,224	0,107	200	0,096	
BH7	0,120	0,050	500	0,055	0,088 ± 0,030
	0,099	0,014	500	0,114	
	0,224	0,107	200	0,096	
BH8	0,087	0,014	500	0,067	0,065 ± 0,028
	0,094	0,029	500	0,035	
	0,205	0,091	200	0,091	
BH9	0,106	0,039	500	0,043	0,061 ± 0,027
	0,093	0,025	500	0,047	
	0,219	0,105	200	0,091	
BH10	0,099	0,043	500	0,000	0,036 ± 0,046
	0,089	0,028	500	0,020	
	0,209	0,097	200	0,088	
BH11	0,223	0,038	500	0,508	0,550 ± 0,054
	0,236	0,045	500	0,531	
	0,588	0,144	200	0,611	
BH12	0,099	0,035	500	0,031	0,061 ± 0,054
	0,105	0,042	500	0,028	
	0,247	0,113	200	0,123	
BH13	0,293	0,060	500	0,697	0,663 ± 0,033
	0,274	0,058	500	0,630	
	0,623	0,146	200	0,663	
BH14	0,112	0,045	500	0,043	0,063 ± 0,056
	0,099	0,038	500	0,020	
	0,256	0,120	200	0,126	
BH15	0,116	0,041	500	0,075	0,077 ± 0,012
	0,111	0,038	500	0,067	
	0,242	0,129	200	0,090	
BH16	0,118	0,050	500	0,047	0,113 ± 0,057
	0,277	0,127	200	0,148	
	0,263	0,116	200	0,143	

Tabla 5.31. Concentración de compuestos fenólicos totales en g/dm³ presentes en los hidrolizados ácidos, sin y con tratamiento de detoxificación con NaBH₄

Ensayo	ABS ₇₆₀	Tasa de dilución	Compuestos fenólicos totales (g/dm ³)	Valor Medio
Biomasa de partida	0,207	1000	3,378	3,191 ± 0,210
	0,402	500	2,963	
	0,443	500	3,231	
BH1	0,178	1000	2,999	2,936 ± 0,058
	0,396	500	2,924	
	0,390	500	2,885	
BH2	0,134	1000	2,424	2,359 ± 0,061
	0,308	500	2,349	
	0,301	500	2,303	
BH3	0,133	1000	2,410	2,369 ± 0,041
	0,311	500	2,369	
	0,305	500	2,329	
BH4	0,138	1000	2,476	2,150 ± 0,443
	0,305	500	2,329	
	0,578	200	1,645	
BH5	0,160	1000	2,763	2,681 ± 0,077
	0,357	500	2,669	
	0,348	500	2,610	
BH6	0,112	1000	2,136	2,011 ± 0,273
	0,285	500	2,199	
	0,598	200	1,698	
BH7	0,127	1000	2,332	2,315 ± 0,240
	0,338	500	2,545	
	0,739	200	2,066	
BH8	0,141	1000	2,515	2,135 ± 0,396
	0,280	500	2,166	
	0,608	200	1,724	
BH9	0,294	500	2,258	2,273 ± 0,021
	0,295	500	2,264	
	0,300	500	2,297	
BH10	0,309	500	2,356	2,090 ± 0,262
	0,267	500	2,081	
	0,229	500	1,833	
BH11	0,357	500	2,669	2,700 ± 0,037
	0,360	500	2,689	
	0,368	500	2,741	
BH12	0,278	500	2,153	2,181 ± 0,034
	0,281	500	2,173	
	0,288	500	2,218	
BH13	0,371	500	2,761	2,724 ± 0,034
	0,364	500	2,715	
	0,361	500	2,695	
BH14	0,249	500	1,963	1,918 ± 0,043
	0,241	500	1,911	
	0,236	500	1,878	
BH15	0,282	500	2,179	2,055 ± 0,280
	0,293	500	2,251	
	0,612	200	1,734	
BH16	0,301	500	2,303	2,249 ± 0,347
	0,341	500	2,565	
	0,667	200	1,878	

En la Tabla 5.32 se muestran los 16 ensayos que componen el diseño experimental planteado, los valores tanto reales como codificados de las variables independientes, así como los porcentajes de reducción de furanos y compuestos fenólicos totales al aplicar el tratamiento de detoxificación con borohidruro sódico. Todas las determinaciones se han realizado por triplicado.

Tabla 5.32. Diseño de experimentos 2³ central compuesto y reducción de furanos y compuestos fenólicos totales para el tratamiento de detoxificación con NaBH₄

Ensayo	t (min)	A	NaBH ₄ (mM)	B	pH	C	% Furanos eliminados	% CFT eliminados
BH-1	10	-1	30	-1	4	-1	24,4	8,0
BH-2	10	-1	30	-1	6	1	94,0	26,1
BH-3	10	-1	90	1	4	-1	88,8	25,7
BH-4	10	-1	90	1	6	1	93,8	32,6
BH-5	30	1	30	-1	4	-1	36,0	16,0
BH-6	30	1	30	-1	6	1	93,8	37,0
BH-7	30	1	90	1	4	-1	90,7	27,5
BH-8	30	1	90	1	6	1	93,3	33,1
BH-9	3,2	-1,68	60	0	5	0	93,6	28,8
BH-10	36,8	1,68	60	0	5	0	96,4	34,5
BH-11	20	0	9,6	-1,68	5	0	42,7	15,4
BH-12	20	0	110,4	1,68	5	0	93,6	31,6
BH-13	20	0	30	0	3,32	-1,68	30,9	14,6
BH-14	20	0	30	0	6,68	1,68	93,4	39,9
BH-15	20	0	30	0	5	0	92,0	35,6
BH-16	20	0	30	0	5	0	88,2	35,8

A, B y C representan los valores codificados de las variables tiempo, concentración de NaBH₄ y pH, respectivamente

CFT: compuestos fenólicos totales

Con los datos recogidos en la Tabla 5.32., se han podido establecer los modelos matemáticos para calcular los porcentajes de eliminación tanto de compuestos fenólicos totales (Y_2) como de furanos (Y_3), mediante las ecuaciones 5.9 y 5.10, respectivamente.

$$Y_2 = 35.82 + 2.25 A + 4.32 B + 6.89 C - 1.72 A^2 - 4.60 B^2 - 3.27 C^2 - 2.08 AB - 3.32 BC \quad R^2_{\text{adj}} = 0.974 \quad (5.9)$$

$$Y_3 = 93.54 + 14.94 B + 17.58 C - 8.13 B^2 - 10.25 C^2 - 14.98 BC \quad R^2_{\text{adj}} = 0.977 \quad (5.10)$$

Donde:

A: tiempo

B: concentración de NaBH_4

C: pH

(Para la realización de cálculos, los valores de estas variables se introducirán codificados según el modelo)

La Tabla 5.33. muestra el análisis de varianza (ANOVA) para investigar la significancia estadística de las dos ecuaciones establecidas, al 95% de nivel de confianza, mediante la determinación de los valores p y F de ambos modelos.

Tabla 5.33. Análisis de varianza ANOVA para el diseño de experimentos del tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio

Respuesta	Variable	SC	GL	MC	F valor	p
Reducción de compuestos fenólicos totales $R^2 = 0,987$ $R^2_{\text{aj}} = 0,970$	A	69,40	1	69,40	3470,02	0,0108
	A^2	27,26	1	27,26	1363,09	0,0172
	B	255,28	1	255,28	12763,98	0,0056
	B^2	195,76	1	195,76	9788,24	0,0064
	C	649,06	1	649,06	32452,94	0,0035
	C^2	99,12	1	99,12	4956,27	0,0090
	AB	34,44	1	34,44	1722,25	0,0153
	BC	88,44	1	88,44	4422,25	0,0096
	Falta de ajuste	16,41	6	2,74	136,79	0,0653
	Error puro	0,02	1	0,020		
	Total	1333,60	15			
Reducción de furanos $R^2 = 0,985$ $R^2_{\text{aj}} = 0,977$	B	3047,36	1	3047,36	422,07	0,0310
	B^2	712,40	1	712,40	98,67	0,0064
	C	4221,60	1	4221,60	584,71	0,0263
	C^2	1143,04	1	1143,04	158,32	0,0500
	BC	1794,01	1	1794,01	248,48	0,0403
	Falta de ajuste	149,12	9	16,57	2,29	0,0474
	Error puro	7,22	1	0,020		
	Total	10667,14	15			

A: tiempo; B: concentración NaBH_4 ; C: pH; SC: suma de cuadrados; GL= grados de libertad; MC= Media cuadrática

Aclarar que, del modelo matemático, se han eliminado aquellos términos que no son estadísticamente significativos para el tratamiento de los datos, aquellos cuyo p-valor estaba por encima del nivel de significancia $\alpha = 0,05$, para un nivel de confianza del 95%.

Por tanto, en las ecuaciones y gráficas obtenidas, solo se han representado las interacciones relevantes entre las tres variables independientes.

Con estas consideraciones, en el caso del modelo que representa el porcentaje de eliminación de compuestos fenólicos totales (Ecuación 5.9), las tres variables independientes consideradas (tiempo de reacción, concentración de NaBH_4 , y pH) han sido significativas y con efecto simple. En principio, el signo positivo que acompaña a estas tres variables en el modelo implica una acción directa respecto a la reducción de compuestos fenólicos, de forma que un aumento de cualquiera de las variables supondría un incremento en la eliminación de compuestos fenólicos totales.

Por otra parte, en este modelo, también aparecen interacciones cuadráticas para los tres factores estudiados, así como una interacción doble entre el pH y la concentración de NaBH_4 . Con respecto al modelo para la reducción de furanos (ecuación 5.10), este no contempla el tiempo como variable significativa; tan solo incluye efectos simples de los otros dos factores (concentración de agente químico y pH), sus interacciones cuadráticas y la misma interacción doble que la contemplada en el modelo para reducción de compuestos fenólicos totales.

Además, en la Tabla 5.33. se pone de manifiesto que para ninguno de los modelos existe falta de ajuste, dado que el p-valor de este parámetro para ambos casos es lo suficientemente elevado, comparado con el nivel de significación establecido, $\alpha = 0,05$.

Por otro lado, atendiendo a los valores tanto del coeficiente de determinación ($R^2 > 0,98$) como del coeficiente de determinación ajustado ($R^2_{adj} \geq 0,97$) en el ajuste de regresión lineal, se corrobora la bondad del modelo.

Se obtuvieron, dos gráficos de contorno correspondientes a las interacciones dobles significativas AB (tiempo de reacción frente a concentración de NaBH_4 , manteniendo fijo el

valor de pH, $C=0$, es decir, $\text{pH}=5$) y BC (concentración de compuesto frente a pH, manteniendo un tiempo fijo, $A=0$, es decir, se consideró un tiempo de 20 minutos) para la optimización de los porcentajes de eliminación de compuestos fenólicos totales y un gráfico de superficie de respuesta para la optimización de la eliminación de furanos totales BC, es decir, concentración de NaBH_4 frente a pH, fijando nuevamente el tiempo (variable A) en 20 minutos, lo que corresponde al punto central del diseño de experimentos, ambos recogidos en las Figuras 5.17y 5.18, respectivamente.

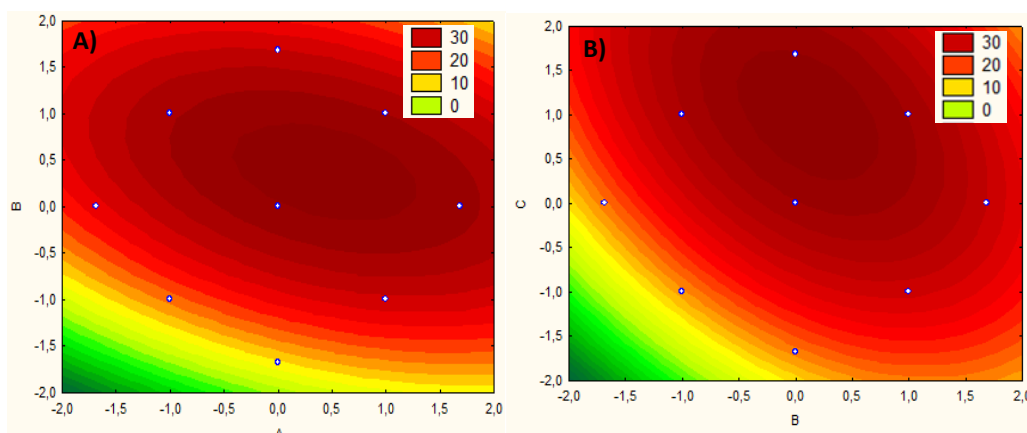


Fig. 5.17. Gráficos de contorno para la optimización de la reducción de compuestos fenólicos totales con interacciones: A) AB (tiempo/concentración NaBH_4), B) BC (concentración NaBH_4 /pH)

En la Figura 5.17 se puede observar el efecto positivo que tiene sobre la reducción de compuestos fenólicos totales tanto un incremento del tiempo como un aumento del pH para una determinada concentración de NaBH_4 .

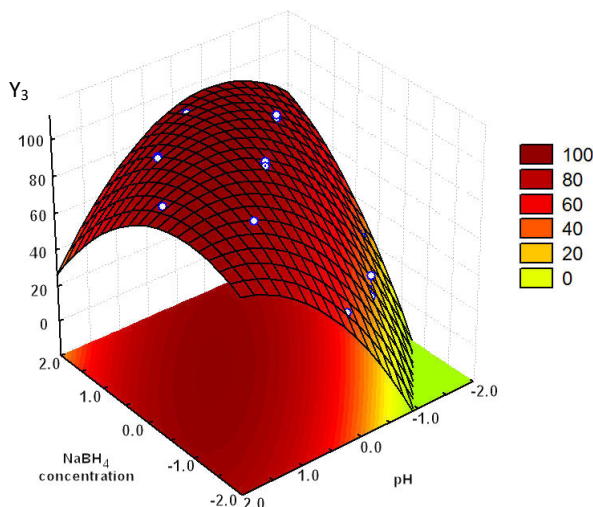


Fig. 5.18. Superficie de respuesta para la optimización de la reducción de furanos (Y_3) en función de las variables concentración de NaBH_4 (B) y pH (C)

Con las ecuaciones y las superficies de respuesta obtenidas, y considerando la máxima reducción simultánea tanto de compuestos furánicos como fenólicos en el hidrolizado, se obtuvieron porcentajes de eliminación de entre un 94-98% de furanos y un 37-40% de compuestos fenólicos totales, con unas condiciones de concentración de NaBH_4 30-63 mM, pH 5,5-6,0 y un tiempo de ensayo de 20-30 minutos.

Como consideración adicional mencionar que alguno de los tratamientos también permitió la reducción del contenido de ácido acético, aunque en menor medida que el pretratamiento con NaOH , no superando en ningún caso el 23,23% de eliminación, obteniendo los mejores resultados en las condiciones: 90 mM NaBH_4 , 30 min y pH=4. En cuanto al contenido en azúcares, las pérdidas estuvieron en el rango 32%-53%.

Finalmente, el modelo obtenido fue verificado por separado, realizando los ensayos por triplicado, comparando los valores predichos por el modelo con los valores empíricos obtenidos en la eliminación en condiciones óptimas de ambos compuestos. En la Tabla 5.34. se muestran los datos relacionados con el estudio comparativo para la confirmación del modelo.

Tabla 5.34. Confirmación del modelo en condiciones óptimas de eliminación de furanos y compuestos fenólicos totales tras el tratamiento con NaBH₄. Comparativa teórico-empírica

Ensayo	Optimización (Valores del modelo)						Confirmación (Valores Empíricos)	
	A	B	C	% FR	% FN	Dy	% FR	% CFT
BH-OPT1	0,4	0,1	0,8	98,0	40,0	1,0	97,9	40,1
BH-OPT2	0,0	- 0,2	0,5	97,9	37,7	1,0	97,5	34,8
BH-OPT3	0,7	- 1,0	1,0	92,8	36,0	1,0	94,0	33,4
BH-OPT4	1,0	- 1,0	1,0	92,8	36,5	1,0	93,8	37,3

A: tiempo; B: concentración NaBH₄; C: pH % FR: Porcentaje de eliminación de Furanos; % CFT: Porcentaje de eliminación de compuestos fenólicos totales; Dy: Deseabilidad

Según los valores recogidos en la Tabla 5.34. para los ensayos de detoxificación en condiciones optimizadas, denominados como BH-OPT (1-4), se puede observar cómo no existen grandes variaciones entre los valores predichos por el modelo y los obtenidos empíricamente, lo que conlleva un buen ajuste con desviaciones estándar inferiores a 0,86 para reducción de furanos y a 2,1 para la de compuestos fenólicos totales.

5.3.3.1. Fermentación de hidrolizados detoxificados con NaBH₄

Después de la optimización del proceso de detoxificación con NaBH₄ de hidrolizados ácidos de residuo de poda de olivo, se llevó a cabo la fermentación de estos líquidos empleando la levadura *P. stipitis* CBS 6054.

Estudios anteriores establecieron niveles límite de 1,0 g/dm³ de hidroximetil furfural (HMF) y furfural para el desarrollo de una fermentación exitosa, Guo *et al.* (2008) [75]; Palmqvist y Hahn -Hägerdal (2000) [139]. Por lo tanto, quedaría justificada la necesidad de llevar a cabo este tratamiento de detoxificación para reducir estos inhibidores presentes.

Los datos resultantes (promedio de dos determinaciones experimentales) de producción de biomasa, consumo de azúcares y concentraciones de etanol obtenidas en función del tiempo de fermentación tanto de los hidrolizados optimizados como del hidrolizado original sin tratar quedan recogidos en la Figura 5.16.

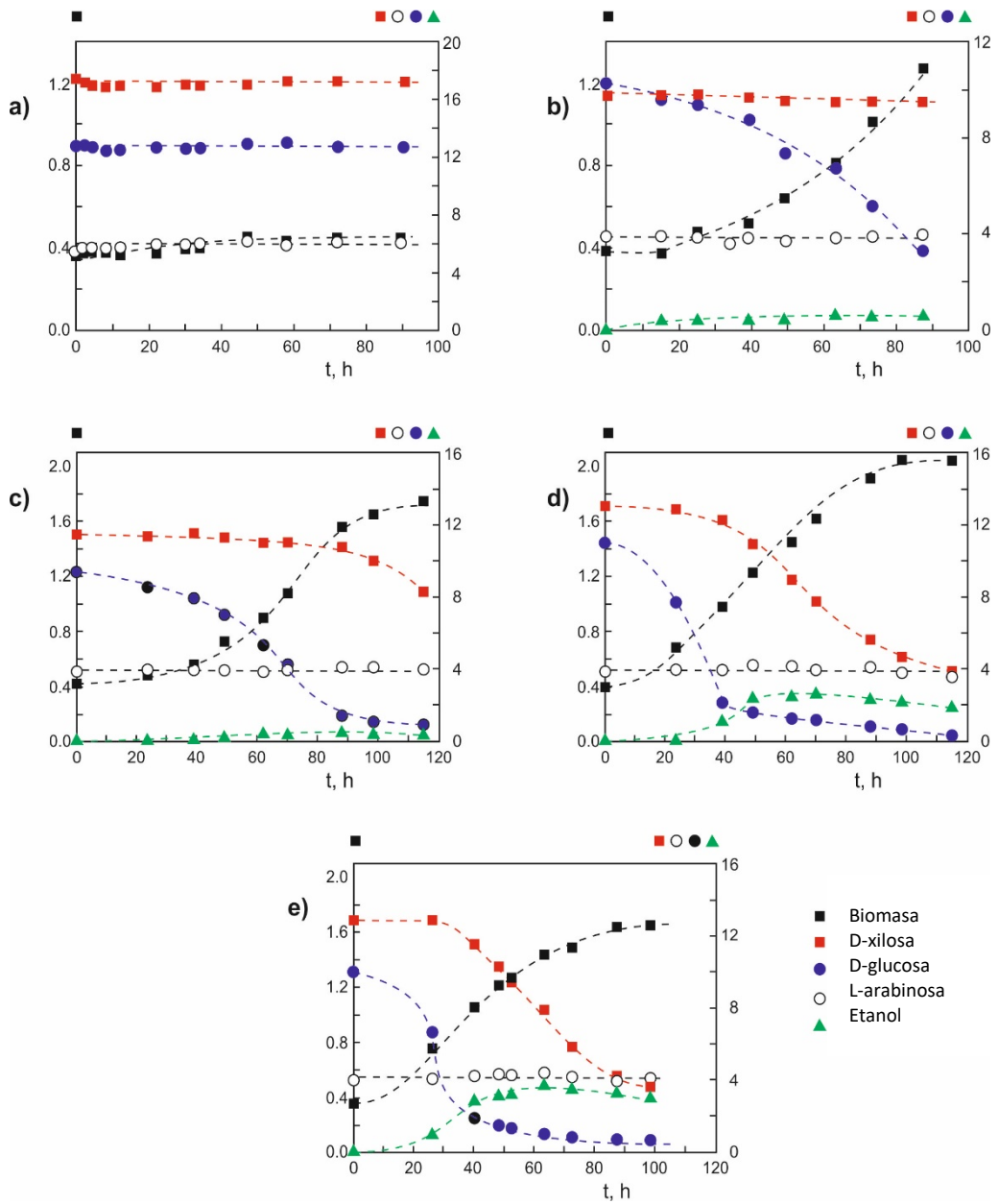


Fig. 5.19. Gráficas de los procesos fermentativos. a) Hidrolizado de partida sin tratamiento de detoxificación con NaBH₄, b) BH-OPT1, c) BH-OPT2, c) BH-OPT3 y e) BH-OPT4

Los datos obtenidos evidencian que en el hidrolizado original, sin tratar con NaBH_4 (Fig.5.16.a), no tuvo lugar actividad metabólica, probablemente debido a la presencia de los inhibidores, sin embargo, en los hidrolizados tratados en condiciones óptimas la reducción de furanos y compuestos fenólicos totales hizo posible que la levadura fuera capaz de asimilar los azúcares fermentables produciendo etanol. Este hecho confirma la sensibilidad de *P. stipitis* CBS 6054 a los mencionados inhibidores.

Los datos empíricos relacionados con la fermentación quedan recogidos en la tabla 5.35.

Tabla 5.35. Parámetros fermentativos obtenidos en los hidrolizados ácidos obtenidos en condiciones más favorables y tratados posteriormente con NaBH_4 en condiciones optimizadas

Ensayo	Parámetros de detoxificación			Parámetros Fermentativos					
	t (min)	NaBH_4	pH	t (h)	EtOH	% S_{cons}	$Y_{E/S}$	%RTM	q_E
BH-OPT1	24	63	5,8	73		22,4	0,059	11,46	
BH-OPT2	20	54	5,5	62		18,6	0,077	14,95	
BH-OPT3	27	30	6,0	62		46,3	0,186	36,12	
BH-OPT4	30	30	6,0	63		45,8	0,271	52,62	

EtOH: concentración de etanol (g/dm^3), % S_{cons} : porcentaje de azúcares totales consumidos; $Y_{E/S}$ = rendimiento en etanol (g/g), %RTM: porcentaje sobre el rendimiento teórico máximo y q_E = productividad de etanol ($\text{g/dm}^3 \text{ h}$)

Se puede observar que los hidrolizados tratados con menor cantidad de borohidruro de sodio tienen mejores rendimientos de etanol, encontrando el máximo $Y_{E/S}$ en la fermentación del hidrolizado BH-OPT4 (0,271 g/g) a las 63 h del inicio del ensayo y consumiendo casi la mitad de los azúcares totales iniciales.

El ensayo con mejores rendimientos obtenidos coincide también con el experimento con las condiciones más idóneas para la reducción de furanos (93,8%) y compuestos fenólicos totales (37%). En este caso la eliminación de ácido acético fue del 12% aproximadamente.

Merece la pena incidir en un aspecto ya comentado con anterioridad relacionado con que algunos estudios previos han informado de que los procesos fermentativos no pueden llevarse a cabo de forma satisfactoria cuando las concentraciones de HMF, furfural y ácido acético en los hidrolizados son superiores a 1,0, 1,0 y 2,0 g/dm³, respectivamente.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES



Atendiendo a la investigación realizada, y considerando los resultados experimentales derivados de la misma, se recogen como principales conclusiones las siguientes:

1. Los análisis para la caracterización físico-química de la biomasa de poda de olivo de partida evidenciaron un material con un contenido porcentual en celulosa ($36,50 \pm 0,41$ %) y hemicelulosa ($20,19 \pm 0,13$ %) suficiente como para sugerir un aprovechamiento mediante un proceso de hidrólisis y posterior fermentación, con objeto de obtener bioalcoholes. Por otra parte, la presencia de porcentajes significativos tanto de lignina insoluble en ácido ($22,51 \pm 0,42$ %) y grupos acetilo ($2,48 \pm 0,11$ %) indicaron la necesidad de realizar pretratamientos a dicha biomasa, para disminuir el contenido de estos dos últimos componentes y, así, mejorar los resultados de las etapas de tratamiento posteriores.
2. Respecto a la hidrólisis y fermentación de la biomasa de poda de olivo original, señalar los siguientes aspectos:
 - 2.1. La severidad del tratamiento hidrolítico con ácido oxálico de la biomasa de poda de olivo de partida tuvo una gran influencia, tanto en la concentración de azúcares simples presentes en el hidrolizado, como en la cantidad de posibles inhibidores para los microorganismos en el proceso de bioconversión por vía fermentativa. Las condiciones de ataque ácido de la materia prima que implicaron un mayor contenido de azúcares totales en el hidrolizado se correspondieron con una temperatura de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una concentración de ácido oxálico de 75 mM ($\text{CSF}=1,56$), dando lugar a un hidrolizado con la siguiente composición en g/dm^3 : D-glucosa = $16,64$; D-xilosa = $15,05$; L-arabinosa = $5,16$; ácido acético = $2,87$; compuestos fenólicos totales = $3,18$ y furanos totales = $0,96$. En estas condiciones experimentales, el material sólido resultante de la hidrólisis de la biomasa de partida presentó un bajo contenido en hemicelulosa ($0,27\%$), sin presencia de grupos acetilo, y cantidades significativas tanto de celulosa ($49,60\%$) como de lignina ($31,71\%$).

- 2.2. Los hidrolizados obtenidos a partir de la biomasa de partida pudieron ser fermentados con la levadura *Pichia stipitis* CBS 6054 solo para las condiciones de ataque ácido ensayadas que implicaron valores de CSF por debajo de 1,56. Los rendimientos en etanol obtenidos en aquellos hidrolizados aptos para ser fermentados (con CSF entre 0,88 y 1,51) se encontraron entre 0,40–0,27 g de etanol/g de sustrato total consumido, disminuyendo con el aumento de la severidad del tratamiento ácido, posiblemente debido a un incremento en la concentración de compuestos inhibidores.
3. En relación con el pretratamiento con hidróxido de sodio y la hidrólisis y fermentación de los hidrolizados resultantes tras su realización destacar que:
- 3.1. El pretratamiento con NaOH permitió obtener líquidos residuales con concentraciones elevadas de ácido acético (hasta 3,36 g/dm³), mientras que resultaron insignificantes las concentraciones presentes de D-glucosa y D-xilosa (en los intervalos de 0,39-0,61 g/dm³ y 0,005-1,00 g/dm³, respectivamente), siendo la concentración de L-arabinosa ligeramente superior al de los otros dos azúcares (1,34-2,17 g/dm³). La optimización de las condiciones experimentales del pretratamiento con peróxido de hidrógeno, basadas en una metodología de superficie de respuesta, con el fin de obtener la mayor concentración de ácido acético en el líquido residual (3,78 g/dm³) implicó un tratamiento de 59 minutos de reacción y una concentración de álcali del 0,8%, a una temperatura de 60 °C. En estas condiciones, la composición (en porcentaje en base seca) de la biomasa sólida pretratada, totalmente desacetilada, fue: 42,0±0,4% de celulosa: 18,6±0,5% de hemicelulosa y 20,0±0,2% de lignina. Por tanto, este pretratamiento en condiciones optimizadas permitió recuperar un sólido con un 11,1±1,7% menos de lignina que la biomasa de poda de olivo de partida, detectándose también pérdidas, aunque en cantidades menores, de hemicelulosa y celulosa (7,9±1,7 y 5,5±1,2, respectivamente).

3.2. La hidrólisis con ácido oxálico del sólido pretratado con hidróxido sódico en condiciones óptimas, generó un hidrolizado con concentraciones de ácido acético muy bajas, que en ningún caso superaron los $0,33 \text{ g/dm}^3$, mientras que las mismas condiciones de hidrólisis ácida aplicadas sobre la biomasa de poda de olivo de partida (sin pretratar) condujeron a concentraciones mucho más elevadas en los hidrolizados obtenidos del citado inhibidor, que oscilaron en el intervalo $0,85\text{-}3,30 \text{ g/dm}^3$.

En cuanto a los azúcares, en el hidrolizado ácido de material sólido procedente del pretratamiento alcalino con NaOH, la D-glucosa representó, por término medio, un $48,0\pm 4,0\%$, de la cantidad de D-xilosa generada ($7,12\text{-}16,82 \text{ g/dm}^3$), siendo este último el azúcar simple mayoritario en todos los casos estudiados. No se detectó influencia de las condiciones de hidrólisis ácida sobre el contenido de L-arabinosa del hidrolizado, obteniéndose un valor medio de $2,76\pm 0,12 \text{ g/dm}^3$. La mayor cantidad de azúcares totales ($28,1 \text{ g/dm}^3$) en el hidrolizado de biomasa pretratada se obtuvo para el tratamiento con ácido oxálico cuyo valor del CSF fue de $1,53\pm 0,05$. Además, en estas condiciones de severidad (pertenecientes al tratamiento llevado a cabo a 150°C , concentración de ácido oxálico de $0,075 \text{ M}$ y relación sólido/líquido 1:10) se produjeron, en el hidrolizado procedente de biomasa pretratada, con reducciones del contenido de ácido fórmico, furanos totales y compuestos fenólicos totales del $41,5\%$, $6,3\%$ y $35,0\%$, respectivamente, respecto a la biomasa de poda de olivo de partida sin tratar.

Este doble tratamiento secuencial, en el que se aplica a la biomasa de poda de olivo de partida en primer lugar un pretratamiento alcalino en condiciones optimizadas (60°C , 59 minutos y $0,8\%$ de NaOH) seguido de la hidrólisis ácida del sólido resultante del pretratamiento para coeficientes de severidad combinada en el rango $0,84\text{-}1,92$, ha conducido a sólidos residuales finales enriquecidos fundamentalmente en celulosa ($47,6\text{-}55,6\%$), con bajos porcentajes de hemicelulosa ($13,56\text{-}1,55\%$), llegando incluso a desaparecer en condiciones más severas de hidrólisis, ($\text{CSF}= 1,70\text{-}1,92$) y contenidos en lignina que oscilaron entre $30,0\text{-}37,3\%$. En concreto, para el tratamiento de hidrólisis ácida seleccionado ($\text{CSF}=1,53\pm 0,05$) el sólido final mostró una composición próxima al 6% de cenizas, 35% de lignina, 55% de celulosa y 2% de hemicelulosa.

3.3. La fermentación de hidrolizados ácidos procedentes de los sólidos pretratados con hidróxido de sodio, empleando las levaduras *Pichia stipitis* CBS 6054 y *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691, solo se pudo llevar a cabo para hidrolizados obtenidos en condiciones experimentales que implicaron un CSF con valor entre 0,84-1,59, con un consumo prácticamente total de los principales azúcares simples (D-glucosa y D-xilosa). Estas levaduras manifestaron un consumo simultáneo de ambos azúcares simples en un tiempo no superior a 68-70 horas. En el caso de la L-arabinosa, solo fue consumida por las levaduras en el caso de tratamientos con ácido oxálico que implicaron coeficientes de severidad combinados más bajos (no superiores a 0,96).

La levadura *P. stipitis* presentó una mayor producción de bioetanol (4,52-6,22 g/dm³) y de manera más rápida que *P. tannophilus* (1,55-5,15 g/dm³). Los mayores valores de $Y_{E/S}$ (0,45 g/g) y q_E (0,24 g/dm³h) para *Pichia stipitis* se obtuvieron cuando el CSF fue de 1,05; este rendimiento en etanol supone un 87% del máximo teórico alcanzable.

4. En el pretratamiento con peróxido de hidrógeno y la hidrólisis y fermentación de los hidrolizados obtenidos del mismo cabe destacar que:

4.1. Las condiciones de pretratamiento optimizadas (120 minutos, 50 °C, 10% de peróxido de hidrógeno y pH=12), analizadas mediante metodología de superficie de respuesta, permitieron eliminar entre un 35,82% y un 43,63% de la lignina presente en la biomasa de poda de olivo de partida. Así mismo, en estas condiciones experimentales se obtuvieron porcentajes de reducción de celulosa y hemicelulosa entre el 30,57-34,40% y el 21,65-24,87%, respectivamente.

4.2. La hidrólisis con ácido oxálico del sólido pretratado con peróxido de hidrógeno en condiciones óptimas (CSF=1,07) generó un hidrolizado con cantidades apreciables de ácido acético y ácido fórmico (2,94 g/dm³ y 2,99 g/dm³, respectivamente) y con cantidades significativas de D-xilosa (19,37-18,50 g/dm³), y en menor medida de D-glucosa (6,31-8,01 g/dm³) y L-arabinosa (3,02-5,90 g/dm³).

4.3. La fermentación con la levadura *P. stipitis*, de hidrolizados ácidos de biomasa pretratada con peróxido de hidrógeno, evidenció un consumo simultáneo de D-glucosa y D-xilosa, principalmente, siendo dicha levadura capaz de metabolizar la L-arabinosa más lentamente. Durante el proceso fermentativo el consumo de D-glucosa fue prácticamente total en un corto periodo de tiempo (20-22 h), mientras que D-xilosa se consumió de forma más lenta (55-90 h) quedando una concentración residual de dicha pentosa de 4,9 g/dm³ aproximadamente.

El etanol fue el bioproducto que apareció en primer lugar, alcanzándose máximos de 4,55-4,95 g/dm³ a las 71 y 55 h, respectivamente. Los rendimientos en etanol, para los tiempos de máxima producción de este bioalcohol, se situaron en el rango de 0,22-0,25 g/g, los cuales supusieron entre el 42,4-48,7 % del rendimiento teórico máximo. Los valores de este rendimiento, junto con los de las productividades máximas (en el rango 0,06-0,09 g/dm³h) indican una posible mejora del resultado si se disminuyera la toxicidad de los hidrolizados ácidos mediante tratamientos de detoxificación de los mismos.

5. Respecto al tratamiento de detoxificación de hidrolizados ácidos mediante el uso de borohidruro de sodio como agente reductor:

5.1. Los hidrolizados obtenidos en las condiciones optimizadas (75 mM de ácido oxálico, temperatura de 150 °C y tiempo de tratamiento de 30 minutos, con CSF=1,56±0,05) obtenidos a partir de biomasa de poda de olivo de partida, sin ningún tratamiento previo, no pudieron ser fermentados con la levadura *Pichia stipitis*. Los tratamientos de detoxificación de los hidrolizados con NaBH₄ permitieron reducir las concentraciones de inhibidores como furanos, compuestos fenólicos totales, y en menor medida, ácido acético (23,23%) presentes en los mismos, aunque se detectaron pérdidas de azúcares en rangos entre el 32-53%. Las condiciones optimizadas del tratamiento de detoxificación (concentración de NaBH₄ entre 30-63 mM, pH en el intervalo 5,5-6,0 y un tiempo de tratamiento de 20-30 minutos) permitieron elevados porcentajes de reducción de furanos, en el rango 94-98%, así como la eliminación de compuestos fenólicos, entre el 37-40%.

5.2. La fermentación que ofreció mejores resultados en cuanto al rendimiento en etanol (0,27 g/g), con un consumo de, aproximadamente, el 46% del sustrato presente, en un tiempo de 63 h, requirió la detoxificación del hidrolizado en unas condiciones de tratamiento de: concentración de 30 mM de borohidruro de sodio, 30 minutos y pH=6,0. Las citadas condiciones permitieron eliminar un 92,8% de furanos, un 36,5% de compuestos fenólicos y un 12% de ácido acético, siendo la concentración elevada de este último inhibidor lo que podría haber obstaculizado el proceso fermentativo.

NOMENCLATURA

A portion of the periodic table with a blue-to-orange gradient background. The elements shown are Scandium (Sc), Titanium (Ti), Vanadium (V), Chromium (Cr), Manganese (Mn), Iron (Fe), Cobalt (Co), Nickel (Ni), Yttrium (Y), Zirconium (Zr), Niobium (Nb), Molybdenum (Mo), Technetium (Tc), Ruthenium (Ru), Rhodium (Rh), Palladium (Pd), Lanthanides (La-Lu), Hafnium (Hf), Tantalum (Ta), Tungsten (W), Rhenium (Re), Osmium (Os), Iridium (Ir), Platinum (Pt), Actinides (Ac-Lu), Rutherfordium (Rf), Dubnium (Db), Seaborgium (Sg), Bohrium (Bh), Hassium (Hs), Meitnerium (Mt), and Darmstadtium (Ds).

Sc SCANDIUM	Ti TITAN	V VANADIUM	Cr CHROM	Mn MANGAN	Fe EISEN	Co COBALT	Ni NICKEL
39 88.906 Y YTTRIUM	40 91.224 Zr ZIRKON	41 92.906 Nb NIOB	42 95.95 Mo MOLYBDAN	43 (98) Tc TECHNETIUM	44 101.07 Ru RUTHENIUM	45 102.91 Rh RHODIUM	46 106.42 Pd PALADIUM
57-71 La-Lu Lanthaniden	72 178.49 Hf HAFNIUM	73 180.95 Ta TANTAL	74 183.84 W WOLFRAM	75 186.21 Re RHENIUM	76 190.23 Os OSMIUM	77 192.22 Ir IRIDIUM	78 197.22 Pt PLATIN
89-103 Actiniden	104 (267) Rf RUTHERFORDIUM	105 (268) Db DUBNIUM	106 (271) Sg SEABORGIUM	107 (272) Bh BOHRNIUM	108 (277) Hs HASSIUM	109 (278) Mt MEITNERIUM	110 (285) Ds DARMSTADTIUM

A	Valor codificado de la variable tiempo dentro del diseño experimental del tratamiento de detoxificación con NaBH_4
ABS ₂₈₅	Absorbancia a 285 nm en la determinación de la concentración de furanos
ABS ₃₂₀	Absorbancia a 320 nm en la determinación de la concentración de furanos
ABS ₆₂₀	Absorbancia a 620 nm, en la determinación de la concentración de biomasa
ABS ₇₆₀	Absorbancia a 760 nm, en la determinación de CFT
AcH	Concentración de ácido acético, g/dm ³
AFEX	Pretratamiento de explosión con fibra de amoníaco
APPA	Asociación de Empresas de Energías Renovables
ara	Concentración de L-arabinosa, g/dm ³
ASTM	<i>American Society for Testing Materials</i> , Sociedad Americana para Testeo de Materiales
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , colección americana de microorganismos
ATP	Adenosín trifosfato
B	Valor codificado de la variable concentración de borohidruro de sodio dentro del diseño experimental del tratamiento de detoxificación con NaBH_4
BH	Denominación de los ensayos del tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio, estas siglas irán acompañadas de un número que determinará la codificación para sus variables según el diseño experimental
BH-OPT	Denominación de los ensayos del tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio en condiciones optimizadas según el modelo estadístico
Bio-ETBE	Biocombustible etil terbutil éter
Bio-MTBE	Biocombustible metil terbutil éter
BMIMCl	Cloruro 1-Butil-3-metilimidazolio, perteneciente a los líquidos iónicos usados en tratamientos de la biomasa
BMIMOAc	Acetato 1-Butil-3-metilimidazolio, perteneciente a los líquidos iónicos usados en tratamientos de la biomasa
BPO	Biomasa de poda de olivo
C	Valor codificado de la variable pH dentro del diseño experimental del tratamiento de detoxificación con NaBH_4
CAPADR	Anuario de Estadísticas Agrarias y Pesqueras
CAO	Concentración de ácido oxálico, mol/dm ³

CBS	Colección del <i>Westerdijk Fungal Biodiversity Institute</i> (Holanda)
CEL	Celulosa, %
CEL _{elim}	Celulosa eliminada, %
CEN	Cenizas, %
CFT	Compuestos fenólicos totales
CICT	Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén
CSF	Factor de severidad combinado
D-glu	D-glucosa o concentración de D-glucosa, kg m ⁻³ .
D-xil	D-xilosa o concentración de D-xilosa, g/dm ³
Dy	Parámetro deseabilidad dentro de la confirmación del modelo estadístico del tratamiento de detoxificación con NaBH ₄
E	Peso de los extractos una vez terminado el proceso de extracción, g
EEA	European Enviromental Agency, Agencia Europea de Medio Ambiente
E _{max}	Concentración máxima de etanol, g/dm ³
ESYRCE	Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos elaborada por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
EtOH	Concentración de etanol, g/dm ³
Eurostat	Oficina Europea de Estadística
EXT	Extractos, %
E5, E10 y E85	Mezclas de Bioetanol y gasoil o gasolina en porcentajes 5, 10 y 85% respectivamente
FESEM	Microscopio electrónico de barrido de alta resolución
F _c	Factor de conversión: celulosa (0,9), hemicelulosa (0,88) y grupos acetilo (0,72)
FN	Eliminación de compuestos fenólicos totales, %
For	Concentración de ácido fórmico, g/dm ³
F _{ph}	Factor de pérdida de hidrólisis: celulosa (1,055) y hemicelulosa (1,155)
Fu	Concentración de furanos totales, g/dm ³
FUR	Concentración de Furanos, mg/dm ³
FR	Eliminación de furanos, %
GA	Grupos acetilo, %

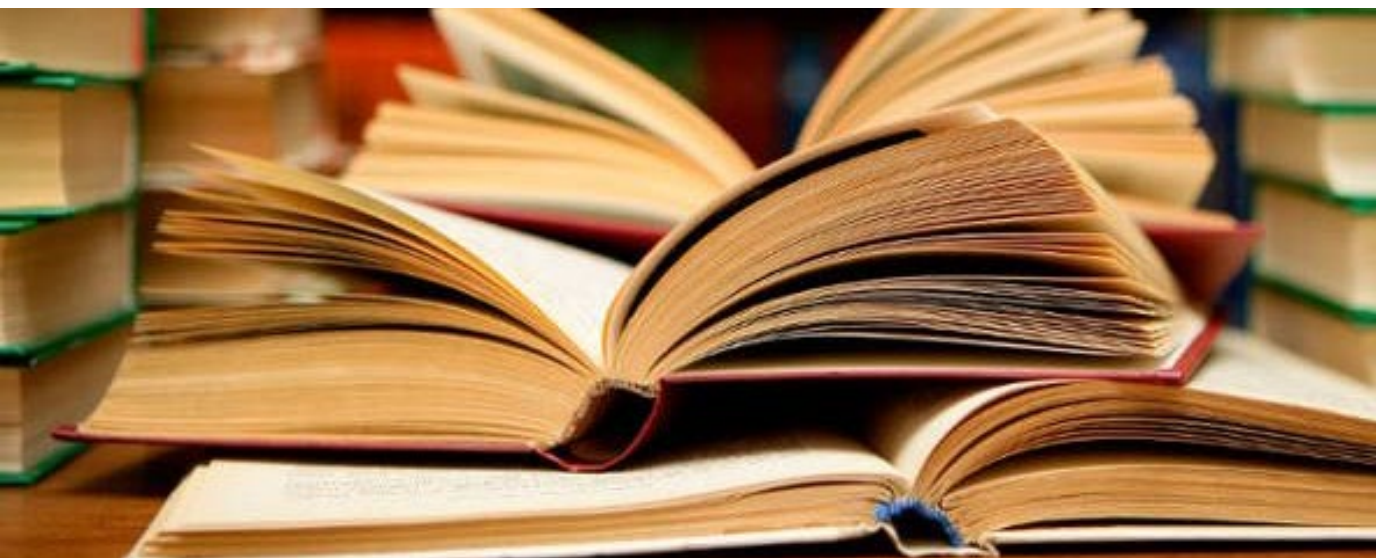
GL	Grados de libertad dentro del análisis de varianza (ANOVA) del tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio
glu	Concentración de D-glucosa, g/dm ³
HEM	Hemicelulosa, %
HEM _{elim}	Hemicelulosa eliminada, %
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air</i> , estándar de eficiencia de filtro de aire
HMF	5-(hidroximetil)furfural
HMV	Humedad y materia volátil, %
H-PER	Denominación de los hidrolizados obtenidos a partir de biomasa pretratada con peróxido de hidrógeno en condiciones optimizadas
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , Cromatografía líquida de alta resolución
HS	Denominación de los ensayos del pretratamiento con hidróxido de sodio, estas siglas irán acompañadas de un número (del 1 al 11) que determinará la codificación para sus variables según el diseño experimental
IEA	<i>International Energy Agency</i> , Agencia Internacional de la Energía
IRENA	<i>International Renewable Energy Agency</i> , Agencia Internacional de Energías Renovables
L-ara	L-arabinosa o concentración de L-arabinosa, kg m ⁻³
LCD	<i>Liquid cristal display</i> , Pantalla de cristal líquido
LED	<i>Light emitting diode</i> , Diodo emisor de luz
LHW	<i>Liquid hot water</i> , pretratamiento con agua líquida caliente
LIG	Lignina, %
LIG _{elim}	Lignina eliminada, %
LIG _i	Lignina insoluble, %
LIG _s	Lignina soluble, %
Log R ₀	Factor de severidad
M	Molaridad
M _A	Concentración de arabinosa (g/dm ³) x 0,5 dm ³
MC	Media cuadrática dentro del análisis de varianza (ANOVA) del tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio

M_c	Peso de cenizas tras la calcinación, g
m_{fi}	Peso de la fracción insoluble, g
M_G	Concentración de glucosa (g/dm ³) x 0,5 dm ³
m_h	Peso húmedo inicial de la muestra, g
M_{Hac}	Concentración de ácido acético (g/dm ³) x 0,5 dm ³
m_i	Peso inicial de la muestra, g
min	Minutos
M_{PA}	Peso seco del residuo de poda de olivo de partida, g
M_{RS}	Peso seco de residuo sólido – masa de cenizas, g
M_s	Peso de la muestra seca inicial, g
MS	<i>Mean squares</i> , cuadrados medios, parámetro dentro del análisis de la varianza de un modelo estadístico
M_x	Concentración de xilosa (g/dm ³) x 0,5 dm ³
$NADH$	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida
$NREL$	National renewable Energy Laboratory, Agencia de eficiencia energética y energías renovables de Estados Unidos
OXA	Denominación de los ensayos de hidrólisis con ácido oxálico realizados según las diferentes condiciones establecidas por el diseño de experimentos, que vendrán codificadas según un número del 1 al 9 que acompañará estas siglas
PER	Denominación de los ensayos del pretratamiento con peróxido de hidrógeno, estas siglas irán acompañadas de un número que determinará la codificación para sus variables según el diseño experimental
$PEROPT$	Denominación de los ensayos del pretratamiento con peróxido de hidrógeno llevados a cabo en condiciones optimizadas según modelo estadístico, 120 minutos, 50 °C, 10% de H ₂ O ₂ y pH 12
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso/volumen
q_E	Productividad en etanol, g (etanol) /dm ³ h
R_0	Parámetro Severidad
RTM	Rendimiento teórico máximo, %
SC	Suma de cuadrados dentro del análisis de varianza (ANOVA) del tratamiento de detoxificación con borohidruro de sodio

S_{cons}	Azúcares totales consumidos, %
SS	<i>Sum of squares</i> , suma de cuadrados, parámetro dentro del análisis de la varianza de un modelo estadístico
S_T	Concentración de azúcares totales, g/dm ³
T	Temperatura, °C
T_{ref}	Temperatura de referencia en la determinación del factor de severidad de los tratamientos, 100 °C
$T_s(t)$	Temperatura del sistema de reacción para un determinado tiempo en la determinación del factor de severidad de los tratamientos, °C
t	Tiempo, h o min
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Asociación Técnica de la Industria de la Celulosa y el Papel
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
UTM	<i>Universal Transverse Mercator</i> , sistema de proyección cartográfico basado en cuadrículas
w	Parámetro empírico relacionado con la energía de activación usado en la determinación de la severidad de los tratamientos
WEO	World Energy Outlook, Informe Mundial de Energía
x	Concentración de biomasa, g/dm ³
X_1	Tiempo de tratamiento en minutos en el pretratamiento con ácido acético
$X_1 cod$	Tiempo de tratamiento en el pretratamiento con ácido acético en su valor codificado según el modelo estadístico
X_2	Concentración de NaOH en porcentaje en el pretratamiento con ácido acético
$X_2 cod$	Concentración de NaOH en el pretratamiento con ácido acético en su valor codificado según el modelo estadístico
X_3	Tiempo de tratamiento en el pretratamiento con peróxido de hidrógeno en su valor codificado según modelo estadístico
X_4	Temperatura de trabajo en el pretratamiento con peróxido de hidrógeno en su valor codificado según modelo estadístico
X_5	Concentración de H ₂ O ₂ en el pretratamiento con peróxido de hidrógeno en su valor codificado según modelo estadístico
X_6	pH de trabajo en el pretratamiento con peróxido de hidrógeno en su valor codificado según modelo estadístico

xil	Concentración de D-xilosa, g/dm ³
Y ₁	Concentración de ácido acético, ecuación 5.7
Y ₂	Porcentaje de eliminación de compuestos fenólicos totales, ecuación 5.9
Y ₃	Porcentaje de eliminación de furanos, ecuación 5.10
Y _{E/s}	Rendimiento global en etanol, g/g

BIBLIOGRAFÍA



- [1] Abatzoglou N., Chornet E., Belkacemi K., Overend R.P., "Phenomenological kinetics of complex systems the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation". Chemical Engineering Science, 47, 1109-1122 (1992)
- [2] Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K.S., "Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*". Process Biochemistry, 41, 2333-2336 (2006)
- [3] Agbogbo F.K., Coward-Kelly G., Torry-Smith M., Wenger K., Jeffries T.W., "The Effect of Initial Cell Concentration on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*". Applied Biochemistry and Biotechnology, 136-140, 653-663 (2007)
- [4] Agbor V.B., Cicek N., Sparling R., Berlin A., Levin D.B., "Biomass pretreatment: fundamentals toward application". Biotechnology Advances, 29, 675-685 (2011)
- [5] Agencia Andaluza de la Energía, Consejería de industria, energía y minas, Información sobre biocarburantes. [En línea], [consulta: marzo de 2020] Disponible en: <https://www.agenciaandaluzadelaenergia.es/es/informacion-energetica/energias-renovables/biocarburantes>
- [6] Agencia Europea de Medio Ambiente (European Environmental Agency, EEA), Configuración del futuro de la energía (2017) [En línea], [consulta: marzo de 2019] Disponible en: <https://www.eea.europa.eu/es/senales/senales-2017-configuracion-del-futuro/articulos/la-energia-en-europa-situacion-actual>
- [7] Agencia Internacional de la Energía (International Energy Agency, IEA). Informe "World Energy Outlook", WEO, 2021. [En línea], [consulta: enero de 2023] Disponible en: <https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2021>

- [8] Agencia internacional de las energías renovables (International Renewable Energy Agency, IRENA). Informe “Rethinking Energy 2017: Accelerating the global energy transformation” [En línea], [consulta: abril de 2023] Disponible en: https://www.irena.org//media/Files/IRENA/Agency/Publication/2017/Jan/IRENA_REthinking_2017_Summary
- [9] Aguilera J.M., San-Martin R., “Steam hydrolysis of pine *Pinus radiata* sawdust”. Biomass, 8, 301-313 (1985)
- [10] Agüero-Rodríguez J.C., Tepetla-Montes, J., Torres-Beristáin, B., “Producción de biocombustibles a partir de la caña en Veracruz, México: perspectivas y riesgos socio-ambientales”. ISSN 2007-7521. 9(2): 74-84 (2015)
- [11] Alani F., Anderson W.A., Moo-Young M., “New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases”. Biotechnology Letters, 30, 123-126 (2008)
- [12] Almeida J.R.M., Modig T., Petersso, A., Hahn-Hägerdal B., Liden G., Gorwa-Grauslund M.F., “Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*”. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 82, 340-349 (2007)
- [13] Alriksson B., Cavka A., Jönsson L.J., “Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents”. Bioresource Technology, 102, 1254-1263 (2011)
- [14] Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., “Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review”. Bioresource Technology, 101, 4851-4861 (2010)

- [15] Amin G., Vsn den Eynde E., Verachtert H., "Determination of by-products formes during the ethanolic fermentation, using batch and inmovilized cell systems os *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces bayanus*". European Journal os Applied Microbiology and Biotechnology, 18, 1-5 (1983)
- [16] Amini N., Haritos V.S., Tanksale A., "Microwave assisted pretreatment of eucaliptus sawdust enhances enzymatic saccharification and maximizes fermentable sugar yield". Renewable Energy, 127, 653-660 (2018)
- [17] Arora, R., Behera, S., Sharma, N.K., Kumar, S., "A new search for thermotolerant yeasts, its characterization and optimization using response surface methodology for ethanol production". Frontiers in Microbiology, 6 (2015)
- [18] Arslan, Y., Eken-Saraçoglu, N., "Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol". Bioresource Technology, 101, 8664-8670 (2010)
- [19] Asociación de empresas de energías renovables (APPA), "Estudio del impacto macroeconómico de las energías renovables en España". [En línea], [consulta: Junio de 2021] Disponible en: https://www.appa.es/wp-content/uploads/2021/11/Estudio_del_impacto_Macroeconomico_de_las_energias_renovables_en_Espana_2020.pdf
- [20] Bak J.S., Ko J.K., Han Y.H., Lee B.C., Choi I., Kim K.H., "Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment". Bioresource Technology, 100, 1285-1290 (2009)
- [21] Bals B., Murnen H., Allen M., Dale B., "Ammonia fiber expansion (AFEX) treatment of eleven different forages: Improvements to fiber digestibility in vitro". Animal Feed Science and Technology, 155, 147-155 (2010)

- [22] Barroso, M., "Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una Biorrefinería". Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid. Escuela universitaria de Ingeniería Técnica Forestal (2010)
- [23] Battista F., Mancini G., Ruggeri B., Fino D., "Selection of the best pretreatment for hydrogen and bioethanol production from olive oil waste products". Renewable Energy 88, 401-407 (2016)
- [24] Bellido C., "Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los Penta y Hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*". Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medioambiente (2013)
- [25] Bellido C., Bolado S., Coca M., Lucas S., González-Benito G., García-Cubero M.T., "Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*". Bioresource Technology, 102, 10868-10874 (2011)
- [26] Bhutto A. W., Harijan K., Qureshi K., Bazmi A. A., Bahadori A. "Perspectives for the production of ethanol from lignocellulosic feedstock - A case study". Journal of Cleaner Production, 95: 184-193 (2015)
- [27] Bidlack J., Malone M., Benson R., "Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants". Proceedings of the Oklahoma Academy of Science, 72, p. 51-56 (1992)
- [28] Binod, P., Sindhu, R., Pandey, A., "The alcohol fermentation step: The most common ethanologenic microorganisms among yeasts, bacteria and filamentous fungi. In: Anonymous Lignocellulose Conversion". Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production, 131-149 (2013)

- [29] Boletín Oficial del Estado, 248, (2008). Orden ITC/2877/2008, de 9 de octubre, por la que se establece un mecanismo de fomento del uso de biocarburantes y otros combustibles renovables con fines de transporte. [En línea], [consulta: abril de 2018] Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/o/2008/10/09>
- [30] Boletín Oficial del Estado, 318, (2018). DIRECTIVA (UE) 2018/2001 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. [En línea], [consulta: abril de 2021] Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2018/328/L00082-00209.pdf>
- [31] Bravo, V., Camacho, F., Sánchez, S., Castro, E., "Influence of the Concentrations of D-Xylose and Yeast Extract on Ethanol Production by *Pachyolen tannophilus*". Journal of fermentation and bioengineering, Vol 79, No. 6, 566-571 (1995)
- [32] Browning, B.L., "Determination of lignin. In: Methods of Wood Chemistry". Interscience Publishers, New York, 785-823 (1967)
- [33] Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (Eds.), "Biochemistry and molecular biology of plants". John Wiley and sons (2015)
- [34] Camacho F., González P., Jurado E., Paez M.P., "Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos" Ingeniería Química (1986)
- [35] Cantarella M., Cantarella L., Gallifuoco A., Spera A., Alfani., "Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF". Biotechnology Progress, 20, 200-206 (2004)
- [36] Cao YQ, Dai Z, Chen BH, Liu R., "Sodium borohydride reduction of ketones, aldehydes and imines using PEG400 as catalyst without solvent". Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 80:834-836 (2005)

- [37] Carvalho D.M., Queiroz J.H., Colodette J.L., “Hydrothermal and acid pretreatments improve ethanol production from lignocellulosic biomasses”. *Bioresources*, 12(2), 3088-3107 (2017)
- [38] Carroll A., Somerville C., “Cellulosic Biofuels”. *Annual Review of Plant Biology*, 60:1, 165-182 (2009)
- [39] Cavka A., Alriksson B., Ahnlund M., Jönsson L.J., “Effect of sulfur oxyanions on lignocellulose-derived fermentation inhibitors”. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, (11), 2592-2599 (2011)
- [40] Cavka A. and Jönsson L.J., “Detoxification of lignocellulosic hydrolysates using sodium borohydride”. *Bioresource Technology*, 136, 368-376 (2013)
- [41] Chen W-H., Naveen C., Praveen Kumar Ghodke, Amit Kumar Sharma, Prakash Bobde, “Co-pyrolysis of lignocellulosic biomass with other carbonaceous materials: A review on advance technologies, synergistic effect, and future prospectus”. *Fuel*, 345, 128177 (2023)
- [42] Chen, X., Shekiri, J., Elander, R., Tucker, M.P., “Improved xylan hydrolysis of corn stover by deacetylation with high solids dilute acid pretreatment”. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51, 70-76 (2012a)
- [43] Chen, X., Shekiri, J., Franden, M.A., Wang, W., Zhang, M., Kuhn, E., Johnson, D.K., Tucker, M.P., “The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process”. *Biotechnology Biofuels*, 5, 8-21 (2012b)
- [44] Cherubini F., Ulgiati S., “Crop residues as raw materials for biorefinery systems – A LCA case study”. *Applied Energy*, 87, 47-57 (2010)
- [45] Chimentão R], Lorente E., Gispert-Guirado F., Medina F., López F., “Hydrolysis of dilute acid-pretreated cellulose under mild hydrothermal conditions”. *Carbohydrate Polymers*, 111:116-124 (2014)

- [46] Chum H.L., Johnson D.K., Black S.K., Overend R.P., "Organosolv pretreatment for enzymic hydrolysis of poplars. 2. Catalyst effects and the combined 'severity parameter'". *Applied Biochemistry Biotechnology*, 24-25, 1-14 (1990a)
- [47] Chum H.L., Johnson D.K., Black S.K., Overend R.P., "Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24 (25), 1-14 (1990b)
- [48] Chung B.Y., Lee J.T., Bai H.W., Kim U.J., Bae H.J., Wi S.G., Cho J.Y., "Enhanced enzymatic hydrolysis of poplar bark by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production". *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 1003-1007 (2012)
- [49] Collins C.H. Clasificación de las bacterias. En "Métodos microbiológicos". Acribia, Zaragoza (1969)
- [50] Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo rural de la Junta de Andalucía. "Avance de superficies y producciones". [En línea], [consulta: abril de 2023] Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es>
- [51] Converti A., Perego P., Domínguez J.M., Silva S.S., "Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*". *Enzyme and Microbial Technology*, 28, (4-5), 339-345 (2001)
- [52] Cuervo L., Folch, J.L., Quiroz, R.E., "Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol". *Biotechnología*, 13:3 (2009)
- [53] Cuevas M., "Hidrólisis enzimática del hueso de aceituna. Fermentación de hidrolizados con levaduras". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales (2007)

- [54] Cuevas M., Sánchez S., Bravo V., Cruz N., García J.F., "Fermentation of enzymatic hydrolysates from olive stones by *Pachysolen tannophilus*". Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84, 461-467 (2009)
- [55] Da Costa Correia J.A., Junior J.E.M, Goncalves L.R.B., Rocha M.V.P., "Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters". Bioresource Technology, 139, 249-256 (2013)
- [56] Debus D., Methner H., Schulze D., Dellweg H., "Fermentation of xylose with the yeast *Pachysolen tannophilus*". European journal of applied microbiology and biotechnology, 17, 287-291 (1983)
- [57] Demirbas, A., "Thermochemical conversion of biomass to liquid products in the aqueous médium". Energy Sources, 27, 1235-1243 (2005)
- [58] Demirbas, M.F., "Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review." Applied Energy, 36, 151- 161 (2009)
- [59] Domínguez J.M., Ningjun C., Gong C.S., Tsao G.T., "Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast". Bioresource Technology, 64, 85-90 (1997)
- [60] Du Preez J.C., "Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts". Enzyme and Microbial Technology, 16, 944-965 (1994)
- [61] Ethaib S., Omar R., Kamal S.M.M., Biak D.R.A. "Microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass: a review". Journal of Engineering Science and Technology, 97-109 (2015)
- [62] Fernandes-Klajn F., Romero-García J.M., Díaz M.J., Castro E., "Comparison of fermentation strategies for ethanol production from olive tree pruning biomass". Insutrial Crops and Products, 122, 98-106 (2018)

- [63] Fernández-Bolaños J., Felizón B., Heredia A., Rodríguez R., Guillén R., Jiménez A., "Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose". *Bioresource Technology*, 68 (2), 121-132 (2001)
- [64] Fonseca B.G., Mateo S., Roberto I.C., Sánchez S., Moya A.J., "Bioconversion in batch bioreactor of olive-tree pruning biomass optimizing treatments for ethanol production". *Biochemical Engineering Journal*, 164, 107793 (2020)
- [65] Fonseca B.G., Puentes J.G., Mateo S., Sánchez S., Moya A.J., Roberto I.C., "Detoxification of rice straw and olive tree pruning hemicellulosic hydrolysates employing *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on the ethanol production by *Pichia stipitis*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:9658-9665 (2013)
- [66] Gabov K., Hemming J., FardimP., "Sugarcane bagasse valorization by fractionation using a water-based hydrotropic process". *Industrial Crops and Products*, 108, 495-504 (2017)
- [67] Galbe M., Zacchi G., "Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production". *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 108, 45-68 (2007)
- [68] García J.F., "Aprovechamiento del residuo de poda de olivo. Hidrólisis ácida y fermentación con *Candida tropicalis*". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales (2007)
- [69] García J.F., Cuevas M., Bravo V., Sánchez S., "Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*". *Renewable Energy*, 35, 1602-1608 (2010)

- [70] García-Aparicio M.P., Ballesteros M., Manzanares P., Ballesteros I., González A., Negro, M.J., "Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136–140 (1-12), 353–365 (2007)
- [71] Garcia-Torreiro M., Pallin M.A., López-Abelairas M., Lu-Chau T.A., Lema J.M., "Alkali treatment of fungal pretreated wheat straw for bioethanol production". *Bioethanol*, 2, 32-43 (2016)
- [72] Garrote G., Cruz J.M., Moure A., Domínguez H., Parajó J.C., "Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials". *Food Science and Technology* (2004)
- [73] Garrote G, Kabel M.A., Schols H.K., Falqué E., Domínguez H., Parajó J.C., "Effects of *Eucalyptus globulus* Autohydrolysis Conditions on the Reaction Products". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 9006-9013 (2007)
- [74] Gírio F.M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L.C., Marques S., Bogel-Lukasik R., "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review". *Bioresource Technology*, 101, 4775-4800 (2010)
- [75] Guo G.L., Chen W.H., Chen W. H., Men L.C., Hwang W.S., "Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production". *Bioresource Technology*, 99, 6046-6053 (2008)
- [76] Gutiérrez-Rojas I., Moreno-Sarmiento N., Montoya D., "Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos". *Revista Iberoamericana de Micología*, 32 (1), 1-12 (2015)
- [77] Hendriks A., Zeeman G., "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology*, 100, 10-18 (2009)

- [78] Ho M.C., Ong V.Z., Wu T.Y., "Potential use of alkaline hydrogen peroxide in lignocellulosic biomass pretreatment and valorization – A review". *Renewable and sustainable Energy reviews*, 112, 75-86 (2019)
- [79] Horvat A., "A study of the uncertainty associated with tar measurement and an investigation of tar evolution and composition during the air-blown fluidised bed gasification of torrefied and non-torrefied grassy biomass". *Tesis Doctoral*, University of Limerick (2016)
- [80] Howard R. L., Abotsi E., Jansen-van-Rensburg E. L., Howard S., "Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production". *African Journal of Biotechnology*, 2, 602–619 (2003)
- [81] Ingram T., Kai-Wörmeyer K., Ixcaraguá J.C.L., Bockemühl V., Antranikian G., Brunner G., Irina-Smirnova I., "Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part I: Conversion of rye straw to valuable products". *Bioresource Technology*, 102, 5221–5228 (2011)
- [82] Jabasingh S.A., Nachiyar C.V., "Utilization of pretreated bagasse for the sustainable bioproduction of cellulase by *Aspergillus nidulans* MTCC 344 using response surface methodology". *Industrial Crops and Products*, 34, 1564-1571 (2011)
- [83] Jeffries T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y., Passoth, V., Richardson, P.M., "Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*". *Nature Biotechnology*, 25, 319–326 (2007)
- [84] Jin Y., Jones S., Shi N., Jeffries T.W., "Molecular Cloning of XYL3 (d-Xylulokinase) from *Pichia stipitis* and Characterization of Its Physiological Function". *Applied and environmental Microbiology*, Vol.68, 3 (2002)

- [85] Jönsson L.J., "Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by products and strategies for minimizing their effects". *Bioresource and Technology*, 199, 103–112 (2016)
- [86] Jönsson L.J., Alriksson B., Nilvebrant N., "Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification". *Biotechnology for Biofuels*, 6, 16 (2013)
- [87] Karagöz P., Rocha I.V., Özkan M., Angelidaki I., "Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation". *Bioresource Technology*, 104, 349–357 (2012)
- [88] Karunanithy C., Muthukumarappan K., Gibbons W.R., "Extrusion pretreatment of pine wood chips". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 81–99 (2012)
- [89] Kim D., "Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A mini review". *Molecules*, 23 (2), 309 (2018)
- [90] Kim J.S., Lee Y.Y., Kim T.H., "A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology*, 199:42–48 (2016)
- [91] Klinke H.B., Ahring B.K., Schmidt A.S., Thomsen A.B., "Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw". *Bioresource Technology*, 82, 15-26 (2002)
- [92] Krahulec S., Kratzer R., Longus K., Nidetzky B., "Comparison of *Scheffersomyces stipitis* strains CBS 5773 and CBS 6054 with regard to their xylose metabolism: implications for xylose fermentation". *Microbiology Open*, 1, 64-70 (2012)
- [93] Kruse B., Schügerl K., "Investigation of ethanol formation by *Pachysolen tannophilus* from xylose/glucose co-substrates". *Process Biochemistry*, 31, 4, 389-407 (1996)

- [94] Kuhad R.C., Gupta R., Khasa Y.P., Singh A., "Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation". *Bioresource Technology*, 101, 8348-8354 (2010)
- [95] Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., Verma, P., "Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept". *Fuel Processing Technology*, 199, 106244 (2020a)
- [96] Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J. and Stroeve, P., "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuels Production". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48, 3713-3729 (2009)
- [97] Kumar, R., Strezov, V., Weldekidan, H., He, J., Singh, S., Kan, T., Dastjerdi, B., "Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: a review of biomass pretreatment methods for production of drop-in fuels". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 123, 109763 (2020b)
- [98] Kumar V., Sandhu P.P., Ahluwalia V., Mishra B.B., Kumar Yadav S., "Improved upstream processing for detoxification and recovery of xylitol produced from corncob". *Bioresource Technology*, 291, 121931 (2019)
- [99] Kumar V., Yadav S., Kumar J., Ahluwalia V., "A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment". *Bioresource Technology*, 299, 122633 (2020c)
- [100] Kundu C., Lee H., Lee J., "Enhanced bioethanol production from yellow poplar by deacetylation and oxalic acid pretreatment without detoxification". *Bioresource Technology*, 178, 28-35 (2014)
- [101] Kurtzman C.P., Suzuki M., "Phylogenetic analysis of *ascomycete* yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*". *Mycoscience*, 51-1, 2-14 (2010)

- [102] Larsson S., Quintana-Sáinz A., Reimann A., Nilvebrant N.O., Jönsson L.J., "Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*". Applied Biochemistry and Biotechnology, 84-86, 617-632 (2000)
- [103] Lee J., "Biological conversión of lignocellulosic biomass to etanol: review article". Journal of Biotechnology, 56, 1-24 (1997)
- [104] Lee J.W., Jeffries T.W., "Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors". Bioresource Technology, 102, 5884-5890 (2011)
- [105] Li M, Pattathil S, Hahnede MG, Hodge DB., "Identifcation of features associated with plant cell wall recalcitrance to pretreatment by alkaline hydrogen peroxide in diverse bioenergy feedstocks using glycome profiling". RSC Advances, 17282-92 (2014)
- [106] Lin S.P., Kuo T.C., Wang H.T., Ting Y., Hsieh C.W., Chen Y.K., Hsu H.Y., Cheng K.C., "Enhanced bioethanol production using atmospheric cold plasma-assisted detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate". Bioresource Technology, 313, 123704 (2020)
- [107] Linde M., Jakobsson E.L., Galbe M., Zacchi G., "Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production". Biomass and Bioenergy, 32, 326-332 (2008)
- [108] Lindegren C.C., Nagai S., Nagai H., "Introduction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel". Nature, 182 (1958)
- [109] Liu, Y., Guo L., Wang L., Zhan W., Zhou H., "Irradiation pretreatment facilitates the achievement of high total sugars concentration from lignocellulose biomass". Bioresource Technology, 232, 270-277 (2017)

- [110] Liu Z.H., Qina L., Pang F., Jinc M.J., Li B.Z., Kang Y., Dale B.E., Yuan Y.J., "Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover". *Industrial Crops and Products*, 44, 176–184 (2013)
- [111] Liu Z.L., Moon J., Andersh B.J., Slininger P.J., Weber S., "Multiple genemediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 743–753 (2008)
- [112] Liu Z.L., Slininger P.J., Gorsich S.W., "Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121–124, 451–460 (2005)
- [113] Lloyd T.A., Wyman C.E., "Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids". *Bioresource Technology*, 96, 1967–1977 (2005)
- [114] Lynd L.R., Weimer P. J., Van Zyl W.H., Pretorius I. S., "Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 506-577 (2002)
- [115] Ma Y., Tan,W., Wang J., Xu J., Wang K., Jiang J., "Liquefaction of bamboo biomass and production of three fractions containing aromatic compounds". *Bioresource and Bioproducts*, 5, 114–123 (2020)
- [116] Maleszka, R., P. Y. Wang, and H. Schneider. "Ethanol production from D-galactose and glycerol by *Pachysolen tannophilus*". *Enzyme and Microbial Technology*, 4, 349-352 (1982)
- [117] Mankar A.R., Pandey A., Modak A., Pant K.K., "Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advnaces". *Bioresource Technology*, 334, 125235 (2021)

- [118] Martín C., Jönsson L.J., "Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors". *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 3-4, 386-395 (2003)
- [119] Martín C., Thomsen M.H., Hauggaard-Nielsen H., Thomsen A.B., "Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover-ryegrass mixtures". *Bioresource Technology*, 99, (18), 8777-8782 (2008)
- [120] Martínez A., Rodríguez M.E., York S.W., Preston J.F., Ingram L.O., "Use of UV Absorbance to Monitor Furans in Dilute Acid Hydrolysates of Biomass". *Biotechnology Progress*, 16, 637-641 (2000)
- [121] Mateo, S., "Producción de xilitol con *Debaryomyces hansemtii* NRRL Y- 7426 y *Candida tropicalis* NBCR-0618. Aplicación al residuo de poda de olivo". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén. Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, (2011)
- [122] Mateo S., Roberto I.C., Sánchez S., Moya A.J., "Detoxification of hemicellulosic hydrolysate from olive tree pruning residue". *Industrial Crops and Products*, 49, 196-203 (2013a)
- [123] Mateo S., Puentes J.G., Sánchez S., Moya A., "Oligosaccharides and monomeric carbohydrates production from olive tree pruning biomass". *Carbohydrate Polymers*, 93, 416-423 (2013b)
- [124] Mateo S., Puentes J.G., Roberto I.C., Sánchez S., Moya A. J., "Optimization of acid hydrolysis of olive tree pruning residue. Fermentation with *Candida guilliermondii*". *Biomass and Energy*, 39-46 (2014)

- [125] Mateo S., Puentes J.G., Moya A.J., Sánchez S., "Ethanol and xylitol production by fermentation of acid hydrolysate from olive pruning with *Candida tropicalis* NBRC 0618". *Bioresource Technology*, 190, 1-6 (2015)
- [126] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. "Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos (ESYRCE)". [En línea], [consulta: abril de 2023] Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/>
- [127] Moya A. J., "Hidrólisis y fermentación de residuo de poda de olivo". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales (1997)
- [128] Moya A.J., Bravo V., Mateo S., Sánchez S., "Fermentation of acid hydrolysates from olive-tree pruning debris by *Pachysolen tannophilus*". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31, 611-617 (2008)
- [129] Moya A.J., Mateo S., Puentes J.G., Fonseca B.G., Roberto I.C., Sánchez S., "Comparing Bioalcohols Production from Olive Pruning Biomass by Biotechnological Pathway with *Candida guilliermondii* and *Pichia stipitis*". *Waste and Biomass Valorization*, 7, 1369-1375 (2016a)
- [130] Moya A.J., Peinado S., Mateo S., Fonseca B.G., Sánchez S., "Improving bioethanol production from olive pruning biomass by deacetylation step prior acid hydrolysis and fermentation processes". *Bioresource Technology*, 220, 239-245 (2016b)
- [131] Meng, X., Ragauskas, A.J. "Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates". *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 150-158 (2014)

- [132] Narayanaswamy N., Faik A. Goetz J.D., Gu T., "Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production". *Bioresource Technology*, 102, (13), 6995-7000 (2011)
- [133] Nieves I.U., Geddes C.C., Miller E.N., Mullinnix M.T., Hoffman R.W., Fu Z., Tong Z., Ingram L.O., "Effect of reduced sulfur compounds on the fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by ethanologenic *Escherichia coli*". *Bioresource Technology*, 102, (8), 5145-5152 (2011)
- [134] Nigam J.N., "Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*". *Journal of Biotechnology*, 87, 17-27 (2001)
- [135] Nitayavardhana S., Shrestha P., Rasmussen M.L., Lamsal B.P., van Leeuwen J.H., Khanal S.K., "Ultrasound improved ethanol fermentation from cassava chips in cassava-based ethanol plants". *Bioresource Technology*, 101, 2741-2747 (2010)
- [136] Nouri H., Ahí M., Azin M., Mousavi Gargari S. L., "Detoxification vs. adaptation to inhibitory substances in the production of bioethanol from sugarcane bagasse hydrolysate: A case study". *Biomass and Bioenergy*, 139, 105629 (2020)
- [137] Oficina de estadística de la Unión Europea, (EUROSTAT). Informe de consumo de energías renovables de la Unión Europea. [En línea], [consulta: abril de 2021] Disponible en: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Energy_production_and_imports/es&oldid=508592
- [138] Öhgren K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund M.F., Galbe M., Hahn-Hägerdal B., Zacchi G., "Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400." *Journal of Biotechnology*, 126, 488-498 (2006)
- [139] Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition". *Bioresource Technology*, 74, 25-33 (2000)

- [140] Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M., "Xylitol production from *Eucaliptus* wood hydrolysates extracted with organic solvents". *Process Biochemistry*, 32 (7), 599-604 (1997)
- [141] Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M., "Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates". *Bioresource Technology*, 66, 25-40 (1998)
- [142] Park N., Kim H.Y., Koo B.W., Yeo H., Choi I.G., "Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*)". *Bioresource Technology*, 101, 7046-7053 (2010)
- [143] Pereira, L., "The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials". *Quimica Nova*, (2003)
- [144] Peña, M., "Optimización de las condiciones de cultivo de las cepas *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 para la producción de bioetanol a partir del hidrolizado de aserrín de Curupau como residuo lignocelulósico.". Tesis Doctoral, Universidad Mayor de San Andres, Facultad de ciencias farmacéuticas y bioquímicas, Bolivia (2008)
- [145] Pérez J.A., "Estudio del Pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo para su conversión biológica a etanol". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, (2008)
- [146] Petersson A., Almeida J.R., Modig T., Karhumaa K., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M.F., Lidén G., "A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance". *Yeast*, 23, 455-464 (2006)
- [147] Phitsuwan P, Sakka K, Ratanakhanokchai K., "Structural changes and enzymatic response of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) stem induced by alkaline pretreatment". *Bioresource Technology*, 218:247-56 (2016)

- [148] Ping Y., Ling H.Z., Song G., Ge J.P., "Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*". *Biochemical Engineering Journal*, 75, 86-91 (2013)
- [149] Puentes J.G., "Aprovechamiento de la poda de olivar para su bioconversión a etanol y xilitol". Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales (2020)
- [150] Puentes J.G., Mateo S., Fonseca B.G., Roberto I.C., Sánchez S., Moya A.J., "Monomeric carbohydrates production from olive tree pruning biomass: Modeling of dilute acid hydrolysis". *Bioresource Technology*, 149, 149-154 (2013)
- [151] Qu T., Zhang X., Gu X., Han L., Ji G., Chen X., Xiao W., "Ball milling for biomass fractionation and pretreatment with aqueous hydroxide solutions". *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5, 7733-7742 (2017)
- [152] Rabemanolontsoa H., Saka S., "Comparative study on chemical composition of various biomass species". *RSC Advances*, 3, 3946-3956 (2013)
- [153] Ramadoss G., Muthukumar K., "Ultrasound assisted ammonia pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production". *Biochemical Engineering Journal*, 83, 33-41 (2014)
- [154] Ravindran R. and Jaiswal A.K., "A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities". *Bioresource and Technology*, 199, 92-102 (2016)
- [155] Ravindran R., Jaiswal S., Abu-Ghannam N., Jaiswal A.K., "Evaluation of ultrasound assisted potassium permanganate pre-treatment of spent coffee waste". *Bioresource and Technology*, 224, 680-687 (2017)

- [156] Rezania S., Ye Z., Berson R.E., "Enzymatic saccharification and viscosity of sawdust slurries following ultrasonic particle size reduction". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153, 103-115 (2009)
- [157] Roberto I.C., Lacis L.S., Barbosa M.F.S., Mancilha I.M., "Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol". *Process Biochemistry*, 26, 15-21 (1991)
- [158] Roberto I.C., Felipe M.G.A., Mancilha I.M., Vitolo M., Sato S., Silva S.S., "Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues". *Bioresource Technology*, 51, 255-257 (1995)
- [159] Rocha, G.J.M., "Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio". IQSC, USP, São Carlos, Brazil, Ph.D. (doutorado em química) (2000)
- [160] Rodríguez-Ching A., Ramírez J.A., Garrote G., Vázquez M., "Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment". *Journal of Food Engineering*, 61 (2), 143-152 (2004)
- [161] Roebuck K., Brundin A., Johns M., "Response surface optimization of temperature and pH for the growth of *Pachysolen tannophilus*". *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 75-78 (1995)
- [162] Romero I., Ruiz E., Castro E., Moya M., "Acid hydrolysis of olive tree biomass". *Chemical Engineering Research and Design*, 88 (5-6) 633-640 (2010)
- [163] Saha B.C. "Hemicellulose bioconversión". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 279-291 (2003)
- [164] Saini J. K., Saini R., Tewari L., "Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments". *3 Biotech*, 5, 337-353 (2015)

- [165] Salido S., Pérez-Bonilla M., Adams R., Altarejos J., "Phenolic Components and Antioxidant Activity of Wood Extracts from 10 Main Spanish Olive Cultivars". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 6493-6500 (2015)
- [166] Sánchez C., "Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi". *Biotechnology Advances*, 27, 185-194 (2009)
- [167] Sánchez, O.J., Cardona, C.A., "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks". *Bioresource Technology*, 99, 5270-5295 (2008)
- [168] Sánchez S., Bravo V., Moya A.J., Castro E., Camacho F., "Influence of temperature on the fermentation of d-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol". *Process Biochemistry*, 39 (6), 673-679 (2004)
- [169] Sánchez, S., Moya, A.J., Moya M., Romero, I., Torrero, R., Bravo V., San Miguel M.P., "Aprovechamiento del residuo de poda de olivar mediante conversión termoquímica". *Ingeniería Química* (2002)
- [170] Saratale G.D., Oh M.K., "Improving alkaline pretreatment method for preparation of whole rice waste biomass feedstock and bioethanol production". *RSC Advances*, 5, 97171-97179 (2015)
- [171] Sarkanen K.V., Ludwig, C.H., "Definition and nomenclature, Chapter 1. In: Lignin. Occurrence, formation, structure and reactions". Wiley-Interscience, pp 1-18, Nueva York (1971)
- [172] Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview." *Renewable Energy*, 37, 19-27 (2012)
- [173] Scordia D., Cosentino S.L., Lee J.W., Jeffries T.W., "Dilute oxalic acid pretreatment for biorefining giant reed". *Biomass Bioenergy*, 35:3018-3024 (2011)

- [174] Shahabazuddin M., Chandra T.S., Meena S., Sukumaran R.K., Shetty N.P., Mudliar S.N., "Thermal assisted alkaline pretreatment of rice husk for enhanced biomass deconstruction and enzymatic saccharification: physico-chemical and structural characterization". *Bioresource Technology*, 263, 199–206 (2018)
- [175] Sheikh M.I., Kim C.-H., Park H.-H., Nam H.-G., Lee G.S., Jo H.S., Lee J.-Y., Kim J.W., "A synergistic effect of pretreatment on cell wall structural changes in barley straw (*Hordeum vulgare* L.) for efficient bioethanol production". *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95, 843–850 (2015)
- [176] Shi, J., Chinn, M.S., Sharma-Shivappa, R.R., "Microbial Pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*." *Bioresource Technology*, 99, 6556-6564 (2008)
- [177] Silva J.P., Mussatto S.I., Roberto I.C., "The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(5), 1306-1315 (2010)
- [178] Silva J.P.A., Mussatto S.I., Roberto I.C., Teixeira J.A., "Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*". *Renewable Energy*, 37, 259-265 (2012)
- [179] Singh R., Shukla A., Tiwari S., Srivastava M., "A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential". *Renewable and Sustainable energy Reviews*, 32, 713-728 (2014)
- [180] Slininger P.J., Bolen P.L., Kurtzman C.P., "*Pachysolen tannophilus*: Properties and process considerations for ethanol production from d-xylose". *Enzyme and Microbial Technology*, 9, (1), 5-15 (1987)

- [181] Slininger P.J., Dien B.S., Gorsich S.W. Liu Z.L., "Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124". Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 1285-1296 (2006)
- [182] Sociedad Cooperativa Andaluza San Vicente de Mogón (Jaén). Imagen concentración de poda de olivo en la parte central de las hileras de cultivo. [En línea], [consulta: junio de 2023] Disponible en: <https://www.puertadelasvillas.com>
- [183] Söderström J., Pilcher L., Galbe M., Zacchi G., "Two-step steam pretreatment of softwood with SO₂ impregnation for ethanol production". Applied Biochemistry and Biotechnology, 98-100, 5-21 (2002)
- [184] Solenzal A.I., Ortiz A.Y., Viñals Verde M., Manganelli Santana E., Acosta Martínez E., "Purificación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar con carbón activo y resinas de intercambio iónico". Ciencia y Tecnología Alimentaria, 5 (2), 124-128 (2006)
- [185] Solomon B.D., Barnes J.R. y Halvorsen K.E., "Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy". Biomass and Bioenergy, 31, 416-425 (2007)
- [186] Song Z., Yang G., Guo Y., Zhang T., "Comparison of two chemical pretreatments of rice straw for biogas production by anaerobic digestion". Bioresources, 7, 3223-3236 (2012)
- [187] Sun Y., Cheng J., "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review". Bioresource Technology, 83, 1-11 (2002)
- [188] Taherzadeh M.J., Karimi K., "Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review". Bioresources, (2007)

- [189] Takeuchi Y., Khawdas W., Aso Y., Ohara H., "Microbial fuel cells using *Cellulomonas spp.* with cellulose as fuel". Journal of bioscience and bioengineering, 123 (3), 358-363 (2017)
- [190] Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., "Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation". Bioresource Technology, 101, 4744-4753 (2010)
- [191] Tayyab M., Noman A., Islam W., Waheed S., Arafat Y., Ali F., Zaynab M., Lin S., Zhang H., and Khan D.I., "Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods: A review". Applied Ecology and Environmental Research, 16(1), 225-249 (2017)
- [192] Teong S.P., Li X., Zhang Y., "Hydrogen peroxide as an oxidant in biomass-to-chemical processes of industrial interest". Green Chemistry, 21 (2019)
- [193] Tomás A.F., Karagoz P., Karakashev D., Angelidaki I., "Extreme thermophilic ethanol production from rapeseed straw: Using the newly isolated *Thermoanaerobacter pentosaceus* and combining it with *Saccharomyces cerevisiae* in a two-step process". Biotechnology and Bioengineering, 110(6), 1574-1582 (2013)
- [194] Travaini R., Otero M.D.M., Coca M., Roberto Da-Silva R., Bolado S., "Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation". Bioresource Technology, 133, 332-339 (2013)
- [195] Trinh, L.T.L., Kundu, C., Lee, J., Lee, H. "An integrated detoxification process with electrodialysis and adsorption from the hemicellulose hydrolysates of yellow poplars". Bioresource Technology, 161, 280-287 (2014)
- [196] Unrean P., Nguyen N.H.A., "Metabolic pathway analysis of *Sheffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions". Bioenergy and Biofuels, 94, 1387-1398 (2012)

- [197] Van Dyk J.S., Pletschke B.I., "A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy". *Biotechnology Advances*, 30, 1458–1480 (2012)
- [198] Viñals M., Mancilha I., Almeida e Silva J., Nápoles A.I., "Métodos de purificación de hidrolizados de bagazo de caña para la obtención de xilitol". *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5 (2), 129-134 (2006)
- [199] Vollhardt K. P. and Schore, N. E., "Organic Chemistry: Structure and function, 4th edition". Editorial: Palgrave Macmillan, 1203 pp. (2002)
- [200] Wei, W., Wu, S., Liu, L., "Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production". *Bioresource Technology*, 110, 302-307 (2012)
- [201] Xu C., Ding C., Zhou X., Xu Y., Gu X., "In-situ detoxification and enhanced oxygen mass transfer for C5 sugar acid production from corncob hemicellulose hydrolysates using activated carbon particles". *Industrial Crops and Products*, 197, 116576 (2023)
- [202] Yang X., Zhang S., Zuo Z., Men X., Tian S., "Ethanol production from enzymatic hydrolysis of non detoxified steam-exploded corn stalk". *Bioresource Technology*, 102, 7840-7844 (2011)
- [203] Yildirim O., Tunay D., Ozkaya B., Demir A., "Optimization of oxalic and sulphuric acid pretreatment conditions to produce bio-hydrogen from olive tree biomass". *International Journal of Hydrogen Energy*, 47 (62), 26316-26325 (2022)
- [204] Yu X., Bao X., Zhou C., Zhang L., Yagoub A.E.-G.A., Yang H., Ma H., "Ultrasoundionic liquid enhanced enzymatic and acid hydrolysis of biomass cellulose". *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 410–418 (2018)

- [205] Yuan Z., Long J., Zhang X., Wang T., Shu R., Ma L., "Intensification effect of peroxide hydrogen on the complete dissolution of lignocellulose under mild". *RSC Advances*, 6, 41032–41039 (2016)
- [206] Yuan Z., Wen Y., Kapu N.S., "Ethanol production from bamboo using mild alkaline pre-extraction followed by alkaline hydrogen peroxide pretreatment". *Bioresource Technology*, 247, 242-249 (2018)
- [207] Zabaniotou, A., "Redesigning a bioenergy sector in EU in the transition to circular waste-based Bioeconomy -A multidisciplinary review". *Journal of Cleaner Production*, 177, 197-206 (2018)
- [208] Zabed H., Sahu J.N., Boyce A.N., Faruq G., "Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches". *Renewable Sustainable Energy*, 66, 751-774 (2016)
- [209] Zhang T., Kumar R., Wyman CE., "Sugar yields from dilute oxalic acid pretreatment of maple wood compared to those with other dilute acids and hot water". *Carbohydrate Polymers*, 92:334–344 (2013)
- [210] Zhang Y., Li M., Wang Y., Ji X., Zhang L., Hou L., "Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolyzates by vacuum membrane distillation coupled with adsorption". *Bioresource Technology*, 197, 276-283 (2015)
- [211] Zeng Y., Zhao S., Yang S., Ding S.Y., "Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels". *Current opinion in Biotechnology*, 27: 38-45 (2014)

APÉNDICES

APÉNDICE A

DATOS EXPERIMENTALES DE HIDRÓLISIS

A.1. Cálculo de severidades en el diseño experimental de la hidrólisis ácida de biomasa de poda de olivo de partida

Tabla A.1.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA1**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	130	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,05	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,41	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	21	18,0	49	35,0	129
2,0	21	19,0	53	36,0	131
3,0	21	20,0	59	37,0	131
4,0	22	21,0	62	38,0	131
5,0	22	22,0	66	39,0	130
6,0	23	23,0	71	40,0	130
7,0	24	24,0	76	41,0	131
8,0	25	25,0	82	42,0	130
9,0	26	26,0	87	43,0	131
10,0	28	27,0	94	44,0	131
11,0	29	28,0	99	45,0	130
12,0	31	29,0	103	46,0	131
13,0	34	30,0	107	47,0	131
14,0	36	31,0	111	48,0	130
15,0	39	32,0	115	49,0	130
16,0	42	33,0	120	50,0	131
17,0	46	34,0	125	51,0	131

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
52,0	131	65,3	127	68,8	77
53,0	130	65,5	124	69,0	73
54,0	130	65,8	121	69,3	71
55,0	130	66,0	118	69,5	69
56,0	131	66,3	115	69,8	67
57,0	130	66,5	112	70,0	65
58,0	130	66,8	108	70,3	63
59,0	130	67,0	103	70,5	61
60,0	131	67,3	98	70,8	59
61,0	131	67,5	94	71,0	57
62,0	131	67,8	90	71,3	56
63,0	129	68,0	87	71,5	53
64,0	129	68,3	83	71,8	50
65,0	129	68,5	80	72,0	47

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento		4,32	22,50	0,998	-42,83		
Mantenimiento					229,32		
Enfriamiento	-2,49	315,12	-9855,40	0,998	7,87		
Total					194,36	2,29	0,88

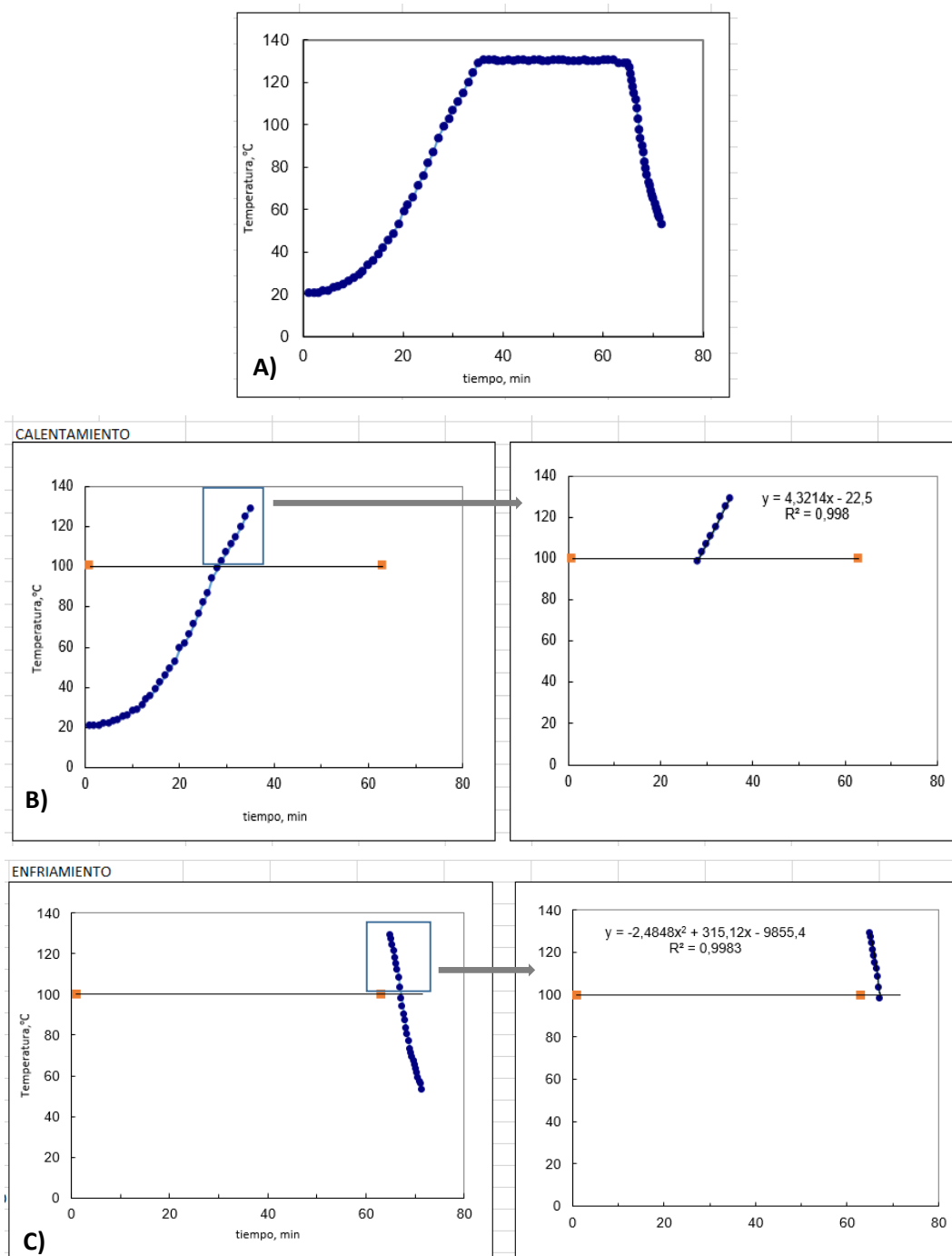


Fig. A.1. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-1. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.2.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA2**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	130	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,075	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,29	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	19	24,0	74	47,0	130
2,0	19	25,0	80	48,0	130
3,0	19	26,0	85	49,0	129
4,0	20	27,0	90	50,0	129
5,0	20	28,0	95	51,0	130
6,0	20	29,0	100	52,0	130
7,0	21	30,0	106	53,0	130
8,0	22	31,0	111	54,0	130
9,0	23	32,0	116	55,0	128
10,0	24	33,0	120	56,0	129
11,0	26	34,0	124	57,0	129
12,0	28	35,0	129	58,0	129
13,0	30	36,0	131	59,0	130
14,0	33	37,0	132	60,0	130
15,0	36	38,0	130	61,0	130
16,0	40	39,0	129	62,0	130
17,0	43	40,0	130	63,0	130
18,0	47	41,0	130	64,0	129
19,0	51	42,0	130	65,0	129
20,0	54	43,0	130	65,3	126
21,0	59	44,0	130	65,5	123
22,0	63	45,0	130	65,8	120
23,0	69	46,0	130	66,0	116

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
66,3	112	68,0	86	69,8	69
66,5	107	68,3	83	70,0	67
66,8	103	68,5	81	70,3	65
67,0	99	68,8	79	70,5	64
67,3	97	69,0	76	70,8	62
67,5	94	69,3	74	71,0	60
67,8	90	69,5	71	72,0	55

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento		4,71	-35,71	0,996	-37,28		
Mantenimiento					229,32		
Enfriamiento	-2,03	252,16	-7701,70	0,999	6,53		
Total					198,57	2,30	1,01

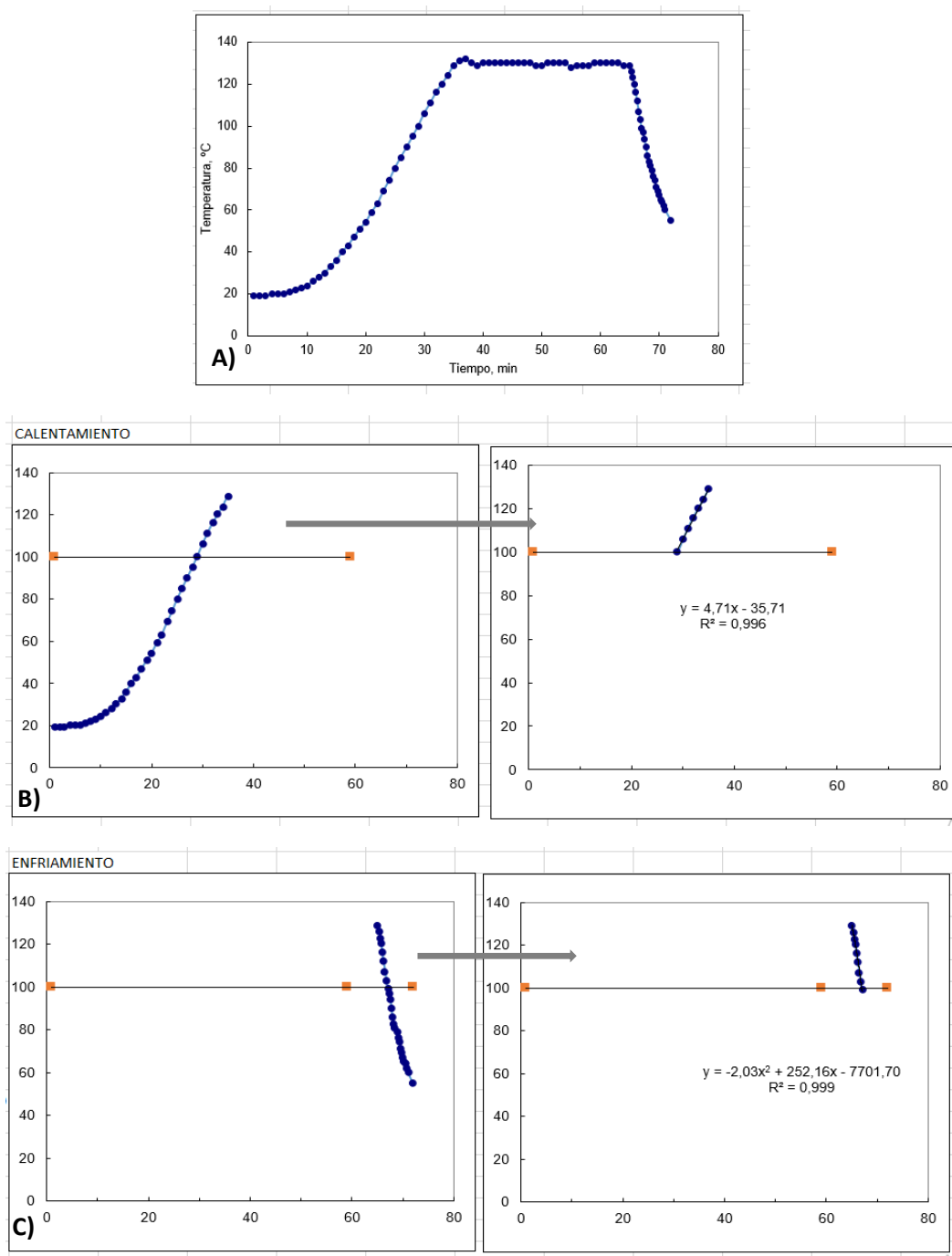


Fig. A.2. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-2. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.3.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA3**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	130	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,100	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,45	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	18	24,0	81	47,0	130
2,0	18	25,0	87	48,0	130
3,0	19	26,0	93	49,0	130
4,0	19	27,0	99	50,0	130
5,0	20	28,0	102	51,0	130
6,0	21	29,0	105	52,0	130
7,0	22	30,0	107	53,0	130
8,0	23	31,0	111	54,0	131
9,0	25	32,0	115	55,0	130
10,0	27	33,0	120	56,0	130
11,0	29	34,0	125	57,0	130
12,0	31	35,0	129	58,0	130
13,0	34	36,0	131	59,0	130
14,0	37	37,0	131	60,0	130
15,0	40	38,0	131	61,0	130
16,0	43	39,0	131	62,0	130
17,0	47	40,0	130	63,0	130
18,0	51	41,0	130	64,0	130
19,0	55	42,0	130	65,0	130
20,0	59	43,0	130	65,3	128
21,0	64	44,0	130	65,5	126
22,0	69	45,0	130	65,8	121
23,0	75	46,0	130	66,0	117

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
66,3	113	68,5	85	70,8	65
66,5	109	68,8	81	71,0	64
66,8	106	69,0	78	71,5	63
67,0	103	69,3	75	72,0	62
67,3	100	69,5	72	72,5	60
67,5	97	69,8	70	73,0	58
67,8	94	70,0	68	73,5	56
68,0	91	70,3	67	74,0	55
68,3	88	70,5	66	74,5	54

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	0,194	-8,228	180,15	0,998	72,24		
Mantenimiento					229,35		
Enfriamiento		-14,182	1053,1	0,993	58,03		
Total					359,62	2,56	1,11

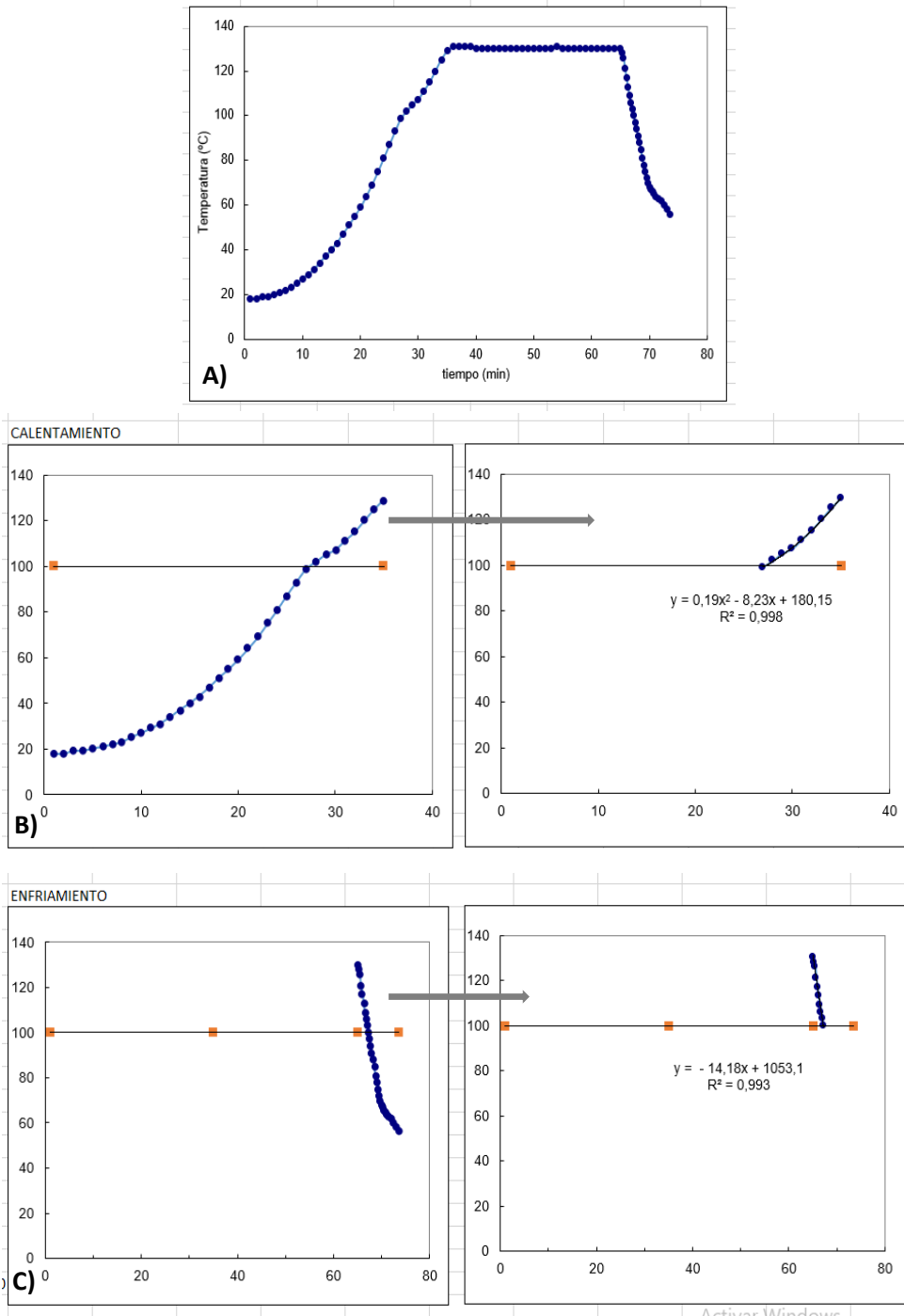


Fig. A.3. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-3. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.4.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA4**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	150	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,05	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,25	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	21	24,0	82	47,0	150
2,0	21	25,0	88	48,0	150
3,0	21	26,0	93	49,0	150
4,0	22	27,0	97	50,0	150
5,0	22	28,0	101	51,0	151
6,0	23	29,0	105	52,0	151
7,0	24	30,0	109	53,0	151
8,0	25	31,0	114	54,0	150
9,0	27	32,0	119	55,0	150
10,0	29	33,0	124	56,0	150
11,0	31	34,0	129	57,0	150
12,0	33	35,0	135	58,0	150
13,0	35	36,0	141	59,0	150
14,0	38	37,0	146	60,0	150
15,0	41	38,0	150	61,0	150
16,0	44	39,0	150	62,0	150
17,0	48	40,0	150	63,0	150
18,0	52	41,0	151	64,0	150
19,0	56	42,0	151	65,0	151
20,0	60	43,0	150	66,0	151
21,0	65	44,0	150	67,0	150
22,0	70	45,0	151	68,0	150
23,0	76	46,0	151	68,3	147

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
68,5	145	71,0	103	73,5	69
68,8	143	71,3	98	73,8	67
69,0	140	71,5	94	74,0	65
69,3	136	71,8	90	74,3	63
69,5	131	72,0	86	74,5	61
69,8	126	72,3	83	74,8	60
70,0	121	72,5	80	75,0	59
70,3	116	72,8	77	75,3	58
70,5	111	73,0	74	75,5	57
70,8	107	73,3	71	75,8	56

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento		5,06	-42,28	0,998	-330,67		
Mantenimiento					889,83		
Enfriamiento	-1,8	235,8	-7500,6	0,996	22,87		
Total					582,03	2,76	1,51

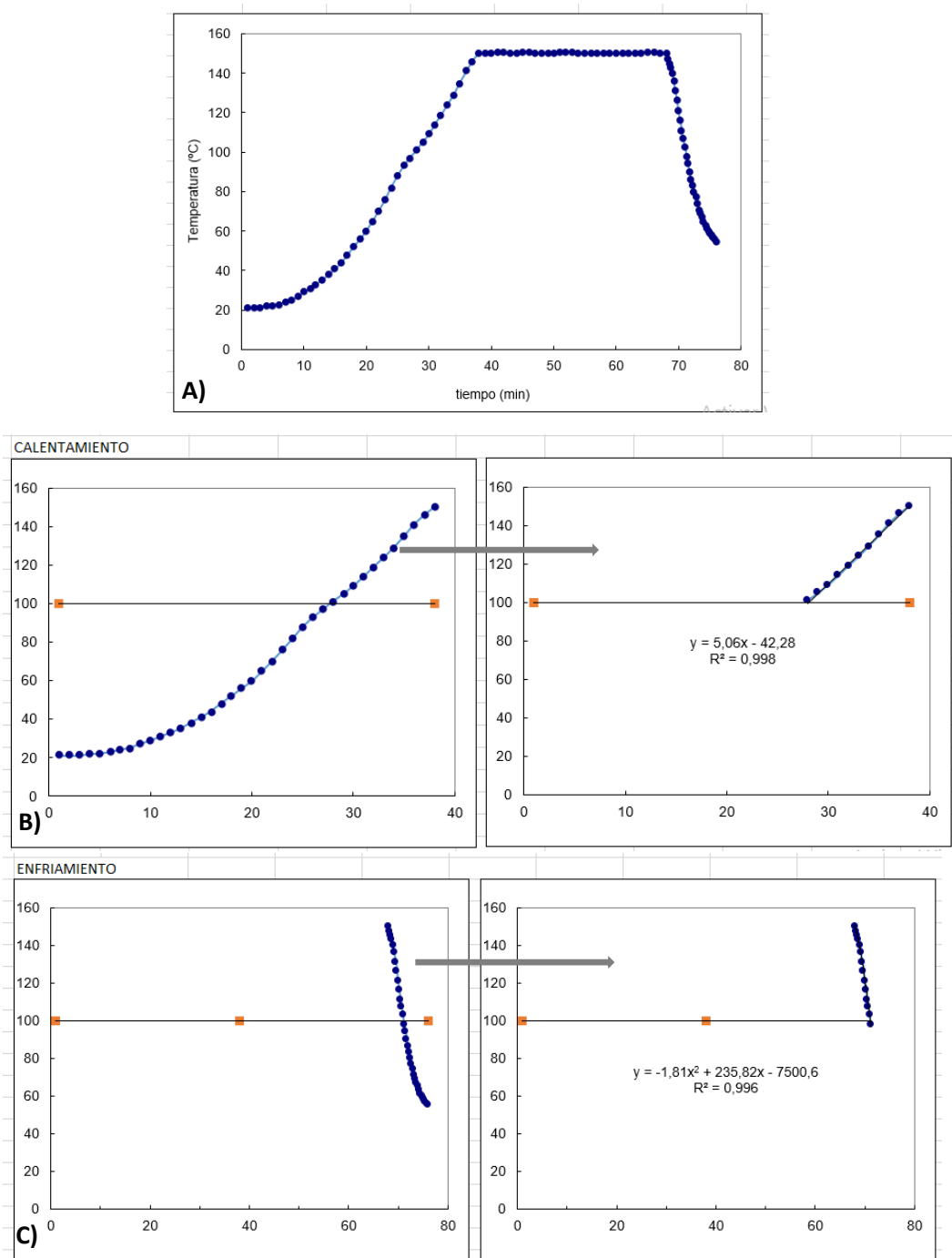


Fig. A.4. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-4. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.5.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA5**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	150	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,075	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,32	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	17	24,0	74	47,0	151
2,0	17	25,0	80	48,0	151
3,0	17	26,0	86	49,0	150
4,0	18	27,0	92	50,0	150
5,0	18	28,0	98	51,0	150
6,0	19	29,0	103	52,0	150
7,0	20	30,0	107	53,0	151
8,0	21	31,0	112	54,0	152
9,0	22	32,0	117	55,0	150
10,0	24	33,0	122	56,0	148
11,0	26	34,0	127	57,0	148
12,0	28	35,0	132	58,0	148
13,0	31	36,0	138	59,0	148
14,0	34	37,0	143	60,0	149
15,0	37	38,0	149	61,0	150
16,0	39	39,0	151	62,0	150
17,0	43	40,0	151	63,0	150
18,0	47	41,0	151	64,0	150
19,0	50	42,0	151	65,0	150
20,0	55	43,0	150	66,0	150
21,0	59	44,0	149	67,0	150
22,0	65	45,0	149	68,0	150
23,0	70	46,0	150	68,3	147

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
68,5	143	70,8	96	73,0	69
68,8	136	71,0	92	73,3	67
69,0	132	71,3	89	73,5	65
69,3	125	71,5	85	73,8	63
69,5	120	71,8	82	74,0	61
69,8	115	72,0	79	74,5	59
70,0	110	72,3	76	75,0	57
70,3	106	72,5	73	75,5	56
70,5	101	72,8	71	76,0	55

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento		5,073	-44,855		-221,16		
Mantenimiento					889,83		
Enfriamiento		-20,322	1533,2	0,997	88,81		
Total					757,48	2,88	1,56

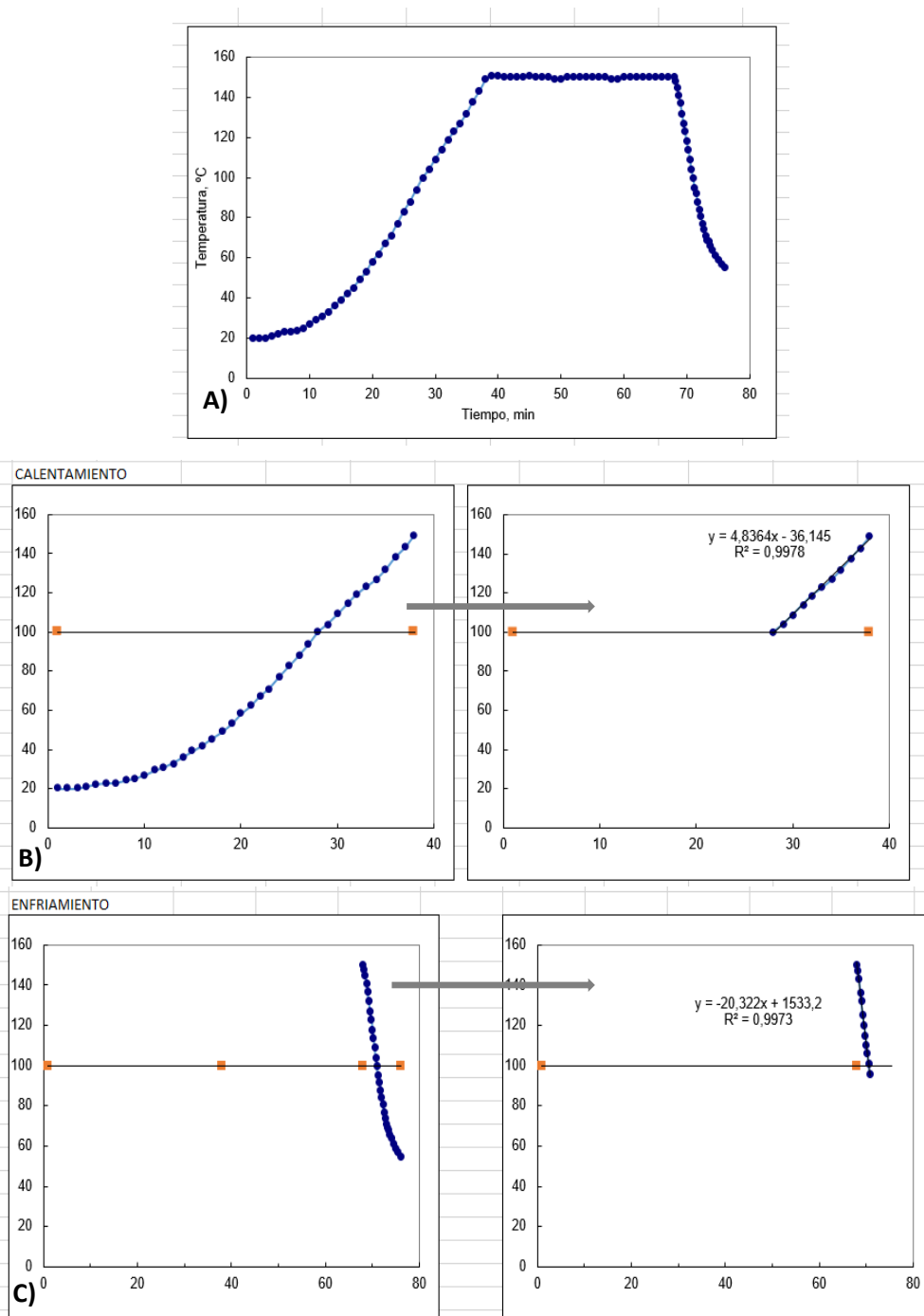


Fig. A.5. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-5. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.6.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA6**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	150	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,100	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,36	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	19	24,0	73	47,0	150
2,0	19	25,0	78	48,0	150
3,0	19	26,0	84	49,0	151
4,0	20	27,0	91	50,0	150
5,0	20	28,0	98	51,0	150
6,0	21	29,0	102	52,0	150
7,0	21	30,0	106	53,0	149
8,0	22	31,0	109	54,0	150
9,0	23	32,0	113	55,0	150
10,0	25	33,0	118	56,0	150
11,0	27	34,0	123	57,0	150
12,0	29	35,0	128	58,0	150
13,0	31	36,0	133	59,0	150
14,0	34	37,0	139	60,0	150
15,0	37	38,0	144	61,0	150
16,0	40	39,0	148	62,0	150
17,0	43	40,0	151	63,0	150
18,0	46	41,0	151	64,0	149
19,0	50	42,0	149	65,0	150
20,0	54	43,0	150	66,0	150
21,0	58	44,0	150	67,0	150
22,0	63	45,0	150	68,0	149
23,0	68	46,0	150	69,0	149

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
69,3	146	71,5	101	73,8	70
69,5	142	71,8	96	74,0	68
69,8	136	72,0	92	74,3	65
70,0	131	72,3	87	74,5	63
70,3	126	72,5	83	74,8	62
70,5	120	72,8	80	75,0	61
70,8	116	73,0	77	75,3	60
71,0	111	73,3	75	75,5	58
71,3	106	73,5	73	75,8	57

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	0,097	-1,83	73,39	0,999	78,01		
Mantenimiento					889,83		
Enfriamiento		-19,80	1517,1	0,999	84,62		
Total					1052,46	3,02	1,66

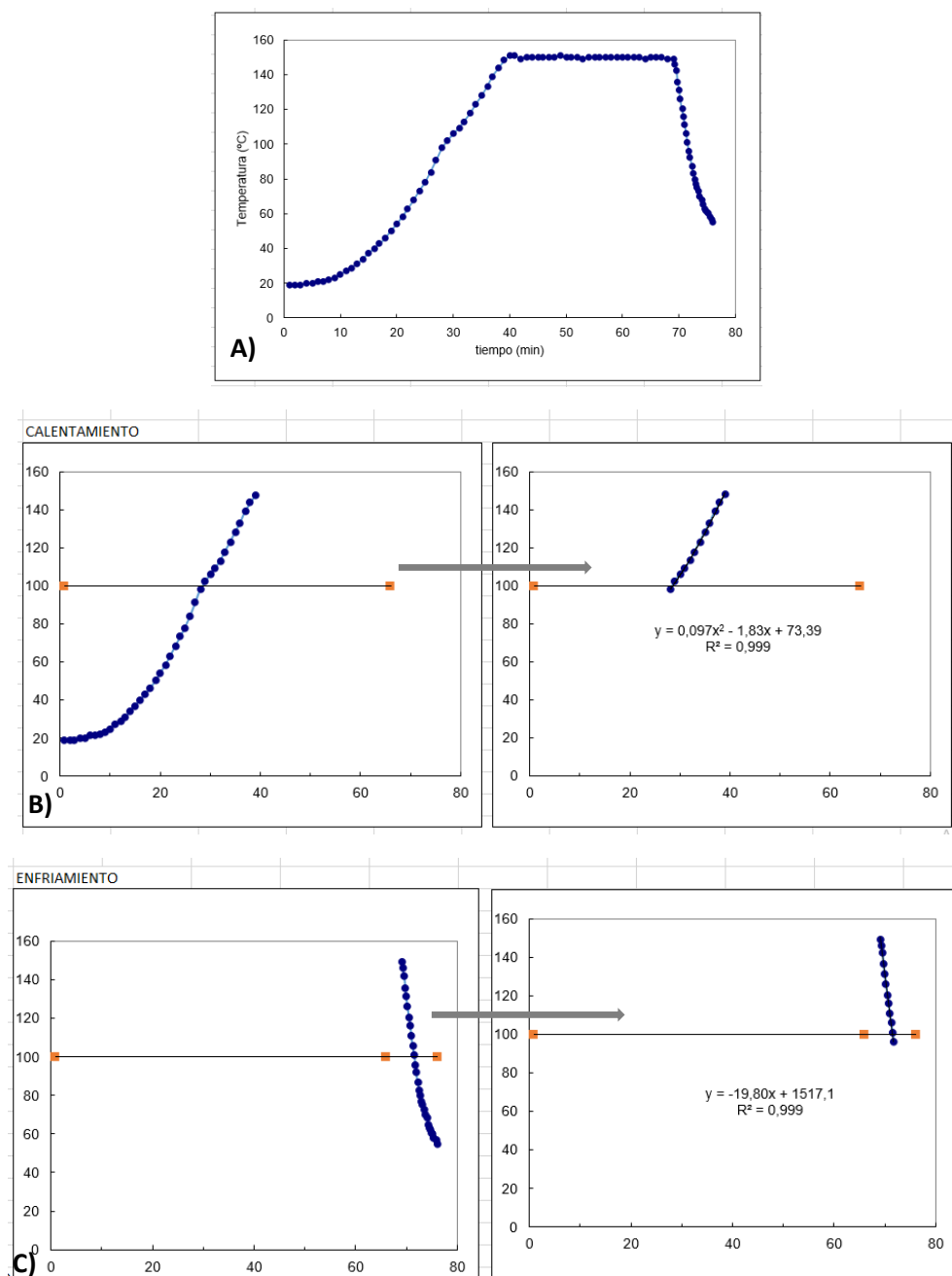


Fig. A.6. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-6. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.7.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA7**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	170	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,050	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,86	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	21	24,0	85	47,0	170
2,0	21	25,0	90	48,0	170
3,0	22	26,0	94	49,0	171
4,0	22	27,0	99	50,0	170
5,0	23	28,0	102	51,0	170
6,0	23	29,0	107	52,0	170
7,0	25	30,0	112	53,0	170
8,0	26	31,0	117	54,0	170
9,0	28	32,0	122	55,0	169
10,0	29	33,0	127	56,0	170
11,0	32	34,0	133	57,0	171
12,0	34	35,0	138	58,0	169
13,0	37	36,0	143	59,0	170
14,0	40	37,0	149	60,0	170
15,0	44	38,0	153	61,0	170
16,0	47	39,0	158	62,0	170
17,0	51	40,0	164	63,0	169
18,0	55	41,0	169	64,0	169
19,0	59	42,0	170	65,0	170
20,0	64	43,0	169	66,0	170
21,0	69	44,0	170	67,0	169
22,0	74	45,0	170	68,0	169
23,0	79	46,0	170	69,0	169

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
70,0	169	73,8	117	76,8	77
71,0	169	74,0	112	77,0	75
71,3	166	74,3	108	77,3	73
71,5	163	74,5	104	77,5	71
71,8	158	74,8	100	77,8	70
72,0	152	75,0	96	78,0	68
72,3	147	75,3	93	78,3	66
72,5	142	75,5	90	78,5	65
72,8	137	75,8	87	78,8	64
73,0	132	76,0	84	79,0	63
73,3	126	76,3	81	79,5	61
73,5	121	76,5	79	80,0	59

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	0,02	3,64	-16,15	0,999	307,69		
Mantenimiento					3452,9		
Enfriamiento		-19,15	1530,1	0,998	478,87		
Total					4239,42	3,63	1,77

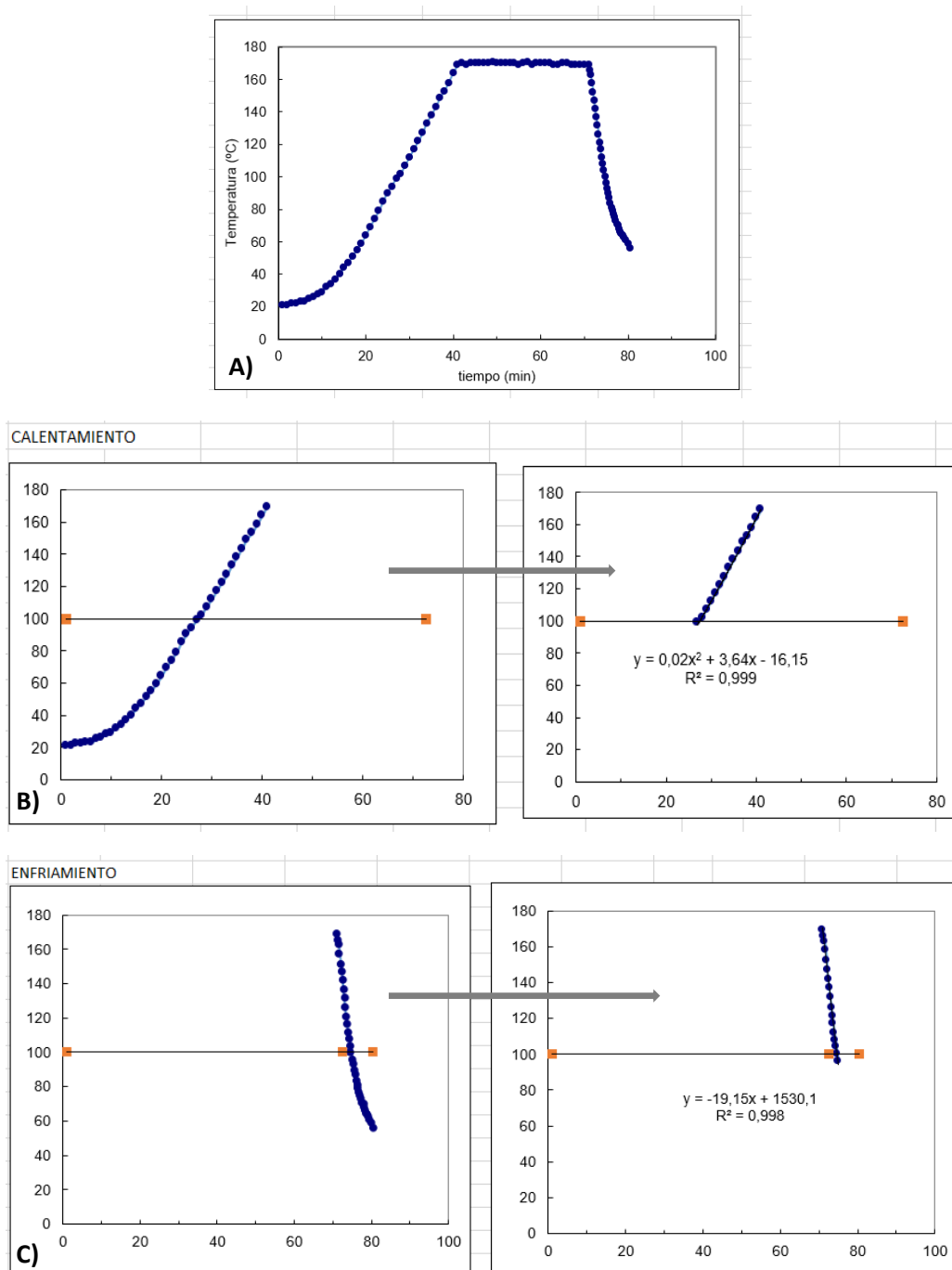


Fig. A.7. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-7. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.8.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA8**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	130	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,075	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,96	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	31	24,0	120	47,0	170
2,0	33	25,0	126	48,0	170
3,0	35	26,0	132	49,0	170
4,0	37	27,0	137	50,0	170
5,0	39	28,0	142	51,0	170
6,0	42	29,0	147	52,0	170
7,0	45	30,0	152	53,0	170
8,0	48	31,0	157	54,0	171
9,0	51	32,0	162	55,0	170
10,0	55	33,0	166	56,0	169
11,0	59	34,0	170	57,0	170
12,0	63	35,0	170	58,0	170
13,0	67	36,0	170	59,0	170
14,0	71	37,0	170	60,0	170
15,0	76	38,0	170	61,0	169
16,0	81	39,0	170	62,0	169
17,0	86	40,0	170	63,0	169
18,0	91	41,0	171	64,0	169
19,0	96	42,0	170	64,3	167
20,0	101	43,0	170	64,5	165
21,0	105	44,0	169	64,8	159
22,0	110	45,0	168	65,0	153
23,0	115	46,0	169	65,3	147

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
65,5	141	68,3	93	71,0	69
65,8	135	68,5	90	71,3	68
66,0	129	68,8	88	71,5	66
66,3	123	69,0	85	71,8	65
66,5	118	69,3	82	72,0	64
66,8	114	69,5	80	72,5	62
67,0	109	69,8	78	73,0	60
67,3	105	70,0	76	73,5	59
67,5	102	70,3	74	74,0	58
67,8	99	70,5	73	74,5	56
68,0	96	70,8	71	75,0	53

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	-0,028	6,612	-21,31	0,999	371,99		
Mantenimiento					3452,87		
Enfriamiento		-20,488	1483,10	0,992	493,88		
Total					4318,74	3,80	1,84

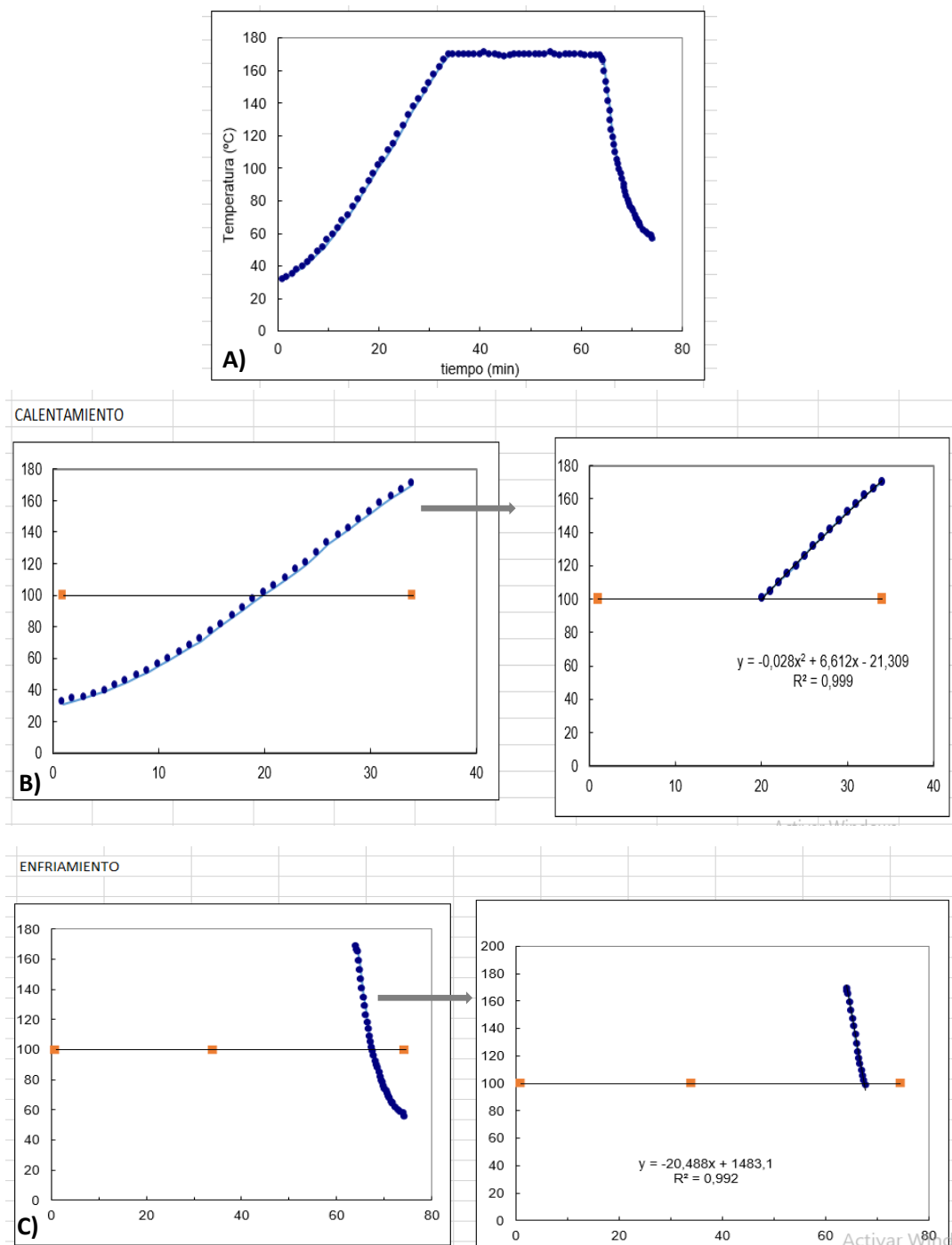


Fig. 5.8. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-8. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.9.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA9**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	170	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,100	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,97	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	22	24,0	106	47,0	171
2,0	23	25,0	111	48,0	170
3,0	24	26,0	116	49,0	170
4,0	26	27,0	121	50,0	170
5,0	28	28,0	126	51,0	169
6,0	30	29,0	132	52,0	170
7,0	32	30,0	137	53,0	170
8,0	34	31,0	143	54,0	170
9,0	37	32,0	149	55,0	169
10,0	40	33,0	155	56,0	169
11,0	44	34,0	160	57,0	170
12,0	47	35,0	165	58,0	170
13,0	50	36,0	169	59,0	170
14,0	54	37,0	171	60,0	170
15,0	58	38,0	169	61,0	170
16,0	63	39,0	168	62,0	171
17,0	67	40,0	168	63,0	171
18,0	72	41,0	169	64,0	171
19,0	78	42,0	170	65,0	170
20,0	85	43,0	170	66,0	170
21,0	93	44,0	170	66,3	167
22,0	97	45,0	170	66,5	164
23,0	101	46,0	170	66,8	158

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
67,0	150	69,8	99	72,5	73
67,3	145	70,0	96	72,8	71
67,5	138	70,3	93	73,0	70
67,8	134	70,5	90	73,3	69
68,0	129	70,8	88	73,5	68
68,3	125	71,0	86	73,8	67
68,5	120	71,3	83	74,0	66
68,8	115	71,5	81	74,5	65
69,0	111	71,8	79	75,0	63
69,3	107	72,0	77	75,5	61
69,5	103	72,3	75	76,0	59

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	0,027	3,758	0,479	0,999	318,66		
Mantenimiento					3452,87		
Enfriamiento		-19,829	1479,3	0,993	277,51		
Total					4049,04	3,95	1,97

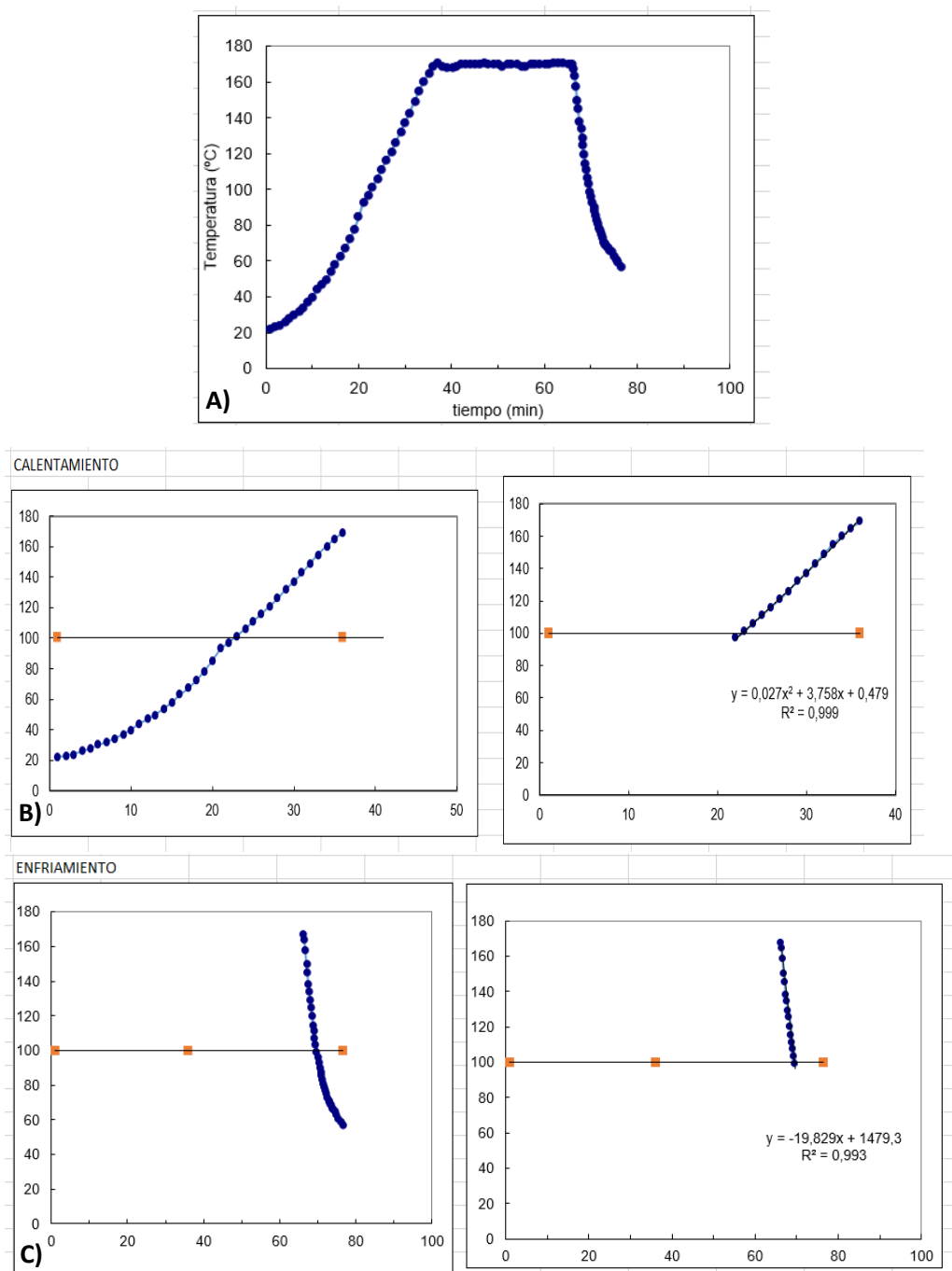


Fig. 5.9. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-9. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

A.2. Cálculo de severidades en el diseño experimental de la hidrólisis ácida de biomasa de poda de olivo pretratada con hidróxido de sodio

Tabla A.10.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA1 pretratado con hidróxido de sodio**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	130	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,05	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,45	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	18	18,0	47	35,0	130
2,0	18	19,0	51	36,0	131
3,0	19	20,0	55	37,0	130
4,0	19	21,0	60	38,0	130
5,0	20	22,0	65	39,0	130
6,0	20	23,0	70	40,0	130
7,0	21	24,0	75	41,0	130
8,0	22	25,0	80	42,0	130
9,0	24	26,0	86	43,0	130
10,0	26	27,0	91	44,0	131
11,0	28	28,0	97	45,0	130
12,0	30	29,0	101	46,0	130
13,0	32	30,0	105	47,0	131
14,0	35	31,0	109	48,0	130
15,0	38	32,0	113	49,0	130
16,0	41	33,0	118	50,0	130
17,0	44	34,0	124	51,0	130

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
52,0	130	65,3	128	68,8	78
53,0	130	65,5	125	69,0	76
54,0	130	65,8	121	69,3	74
55,0	131	66,0	117	69,5	72
56,0	130	66,3	113	69,8	71
57,0	130	66,5	110	70,0	70
58,0	130	66,8	106	70,3	68
59,0	130	67,0	101	70,5	67
60,0	130	67,3	97	70,8	65
61,0	130	67,5	93	71,0	64
62,0	130	67,8	89	71,3	62
63,0	130	68,0	86	71,5	61
64,0	130	68,3	83	71,8	60
65,0	130	68,5	80	72,0	58

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento		4,63	-33,75	0,991	-42,49		
Mantenimiento					229,31		
Enfriamiento	-1,45	177,38	-5253,8	0,998	7,66		
Total					194,48	2,29	0,84

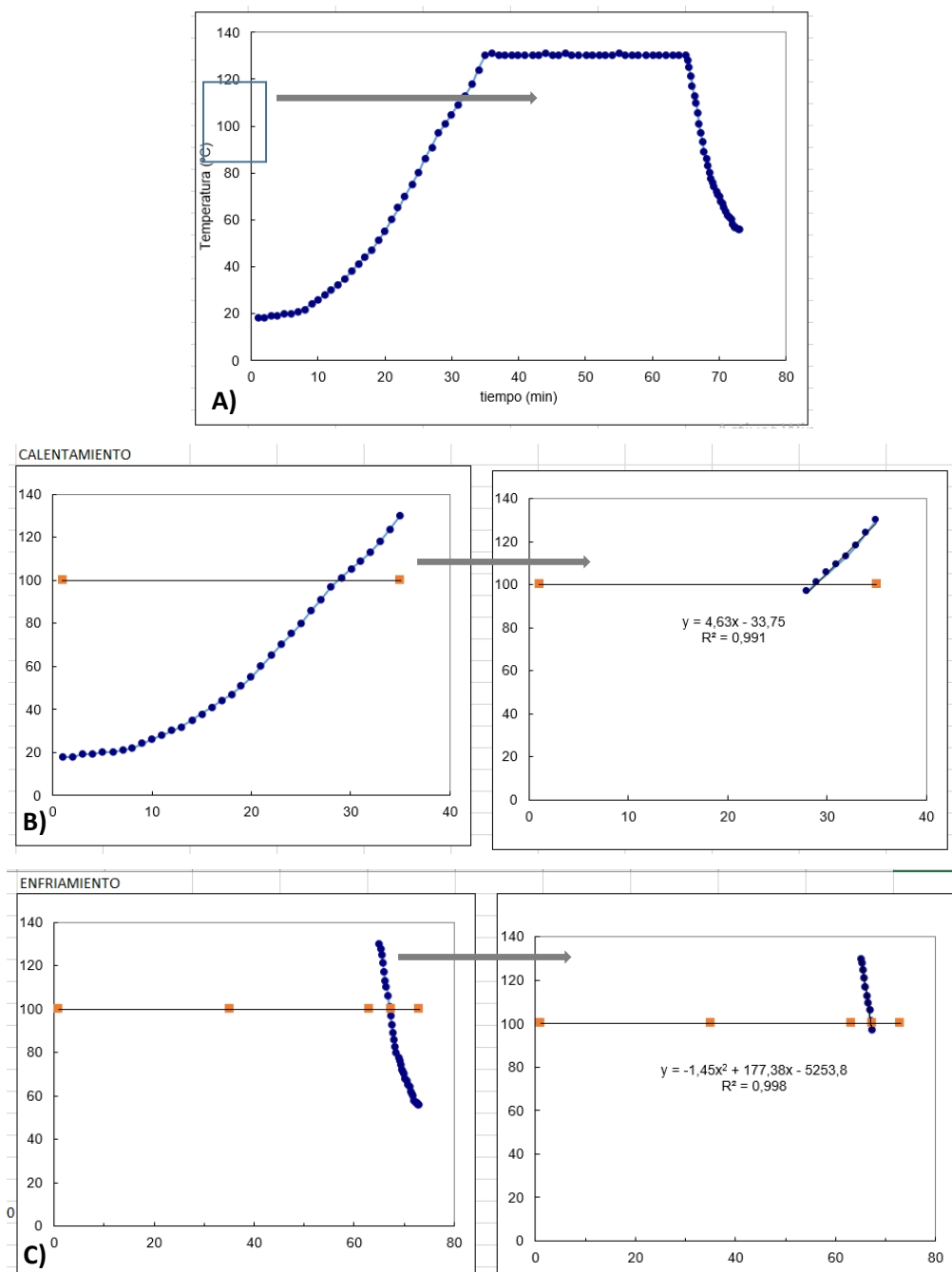


Fig. A.10. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-1 pretratado con hidróxido de sodio. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.11.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA2** pretratado con hidróxido de sodio

Condiciones experimentales		
Temperatura:	130	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,075	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,47	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	27	18,0	60	29,5	109
2,0	27	18,5	62	30,0	111
3,0	28	19,0	64	30,5	113
4,0	28	19,5	66	31,0	114
5,0	29	20,0	68	31,5	116
6,0	29	20,5	70	32,0	117
7,0	30	21,0	71	32,5	119
8,0	32	21,5	73	33,0	121
9,0	33	22,0	75	33,5	123
10,0	35	22,5	77	34,0	124
11,0	37	23,0	80	35,0	127
12,0	40	23,5	82	36,0	130
12,5	41	24,0	84	37,0	131
13,0	43	24,5	87	38,0	131
13,5	44	25,0	89	39,0	131
14,0	46	25,5	91	40,0	131
14,5	47	26,0	94	41,0	130
15,0	49	26,5	96	42,0	130
15,5	50	27,0	98	43,0	130
16,0	52	27,5	100	44,0	130
16,5	54	28,0	103	45,0	130
17,0	56	28,5	104	46,0	130
17,5	58	29,0	106	47,0	130

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
48,0	130	64,0	130	70,8	90
49,0	130	65,0	130	71,0	87
50,0	131	66,0	130	71,3	84
51,0	130	67,0	130	71,5	83
52,0	130	67,5	125	71,8	82
53,0	130	68,0	120	72,0	80
54,0	130	68,3	116	72,5	77
55,0	130	68,5	113	73,0	75
56,0	129	68,8	110	73,5	71
57,0	130	69,0	107	73,8	68
58,0	130	69,3	104	74,0	65
59,0	130	69,5	101	74,3	62
60,0	130	69,8	99	74,5	60
61,0	129	70,0	97	74,8	58
62,0	129	70,3	95	75,0	56
63,0	130	70,5	93	75,3	54

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	-0,13	11,49	-119,36	0,998	30,03		
Mantenimiento					229,31		
Enfriamiento	0,57	-84,86	3407	0,997	19,13		
Total					278,47	2,44	0,97

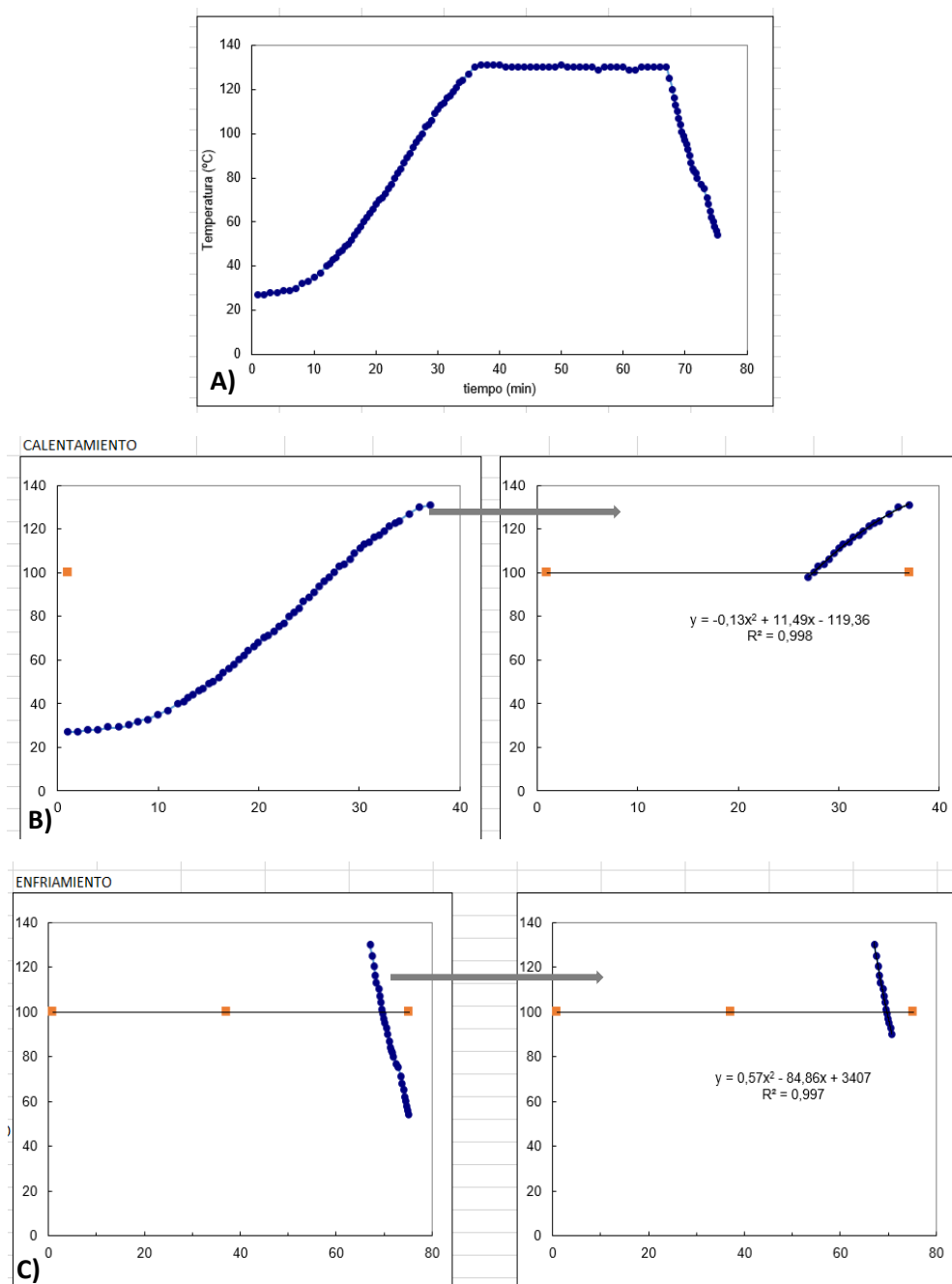


Fig. A.11. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-2. Pretratado con hidróxido de sodio A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.12.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA3 pretratado con hidróxido de sodio**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	130	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,100	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,40	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	27	20,5	70	32,0	116
2,0	27	21,0	72	33,0	119
3,0	28	21,5	74	34,0	122
4,0	28	22,0	76	35,0	125
5,0	29	22,5	78	36,0	127
6,0	30	23,0	80	37,0	129
7,0	31	23,5	83	38,0	131
8,0	32	24,0	85	39,0	131
9,0	34	24,5	87	40,0	130
10,0	36	25,0	90	41,0	130
11,0	39	25,5	93	42,0	131
12,0	41	26,0	96	43,0	131
13,0	44	26,5	98	44,0	129
14,0	46	27,0	101	45,0	129
15,0	49	27,5	103	46,0	129
16,0	53	28,0	104	47,0	129
17,0	56	28,5	106	48,0	130
17,5	58	29,0	108	49,0	130
18,0	60	29,5	109	50,0	130
18,5	62	30,0	111	51,0	129
19,0	64	30,5	112	52,0	129
19,5	66	31,0	113	53,0	128
20,0	67	31,5	115	54,0	129

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
55,0	129	69,5	118	74,0	84
56,0	129	70,0	116	74,3	82
57,0	129	70,5	115	74,5	80
58,0	129	70,8	114	74,8	78
59,0	130	71,0	112	75,0	76
60,0	130	71,3	110	75,3	74
61,0	130	71,5	109	75,5	73
62,0	130	71,8	106	75,8	71
63,0	130	72,0	103	76,0	70
64,0	130	72,3	100	76,5	68
65,0	130	72,5	98	77,0	65
66,0	131	72,8	96	77,5	63
67,0	131	73,0	93	78,0	61
68,0	125	73,3	91	78,5	59
68,5	123	73,5	89	79,0	57
69,0	121	73,8	87	79,5	55

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	-0,06	6,89	-39,33	0,998	30,66		
Mantenimiento					229,31		
Enfriamiento	-0,53	68,63	-2087,2	0,979	20,61		
Total					284,58	2,45	1,05

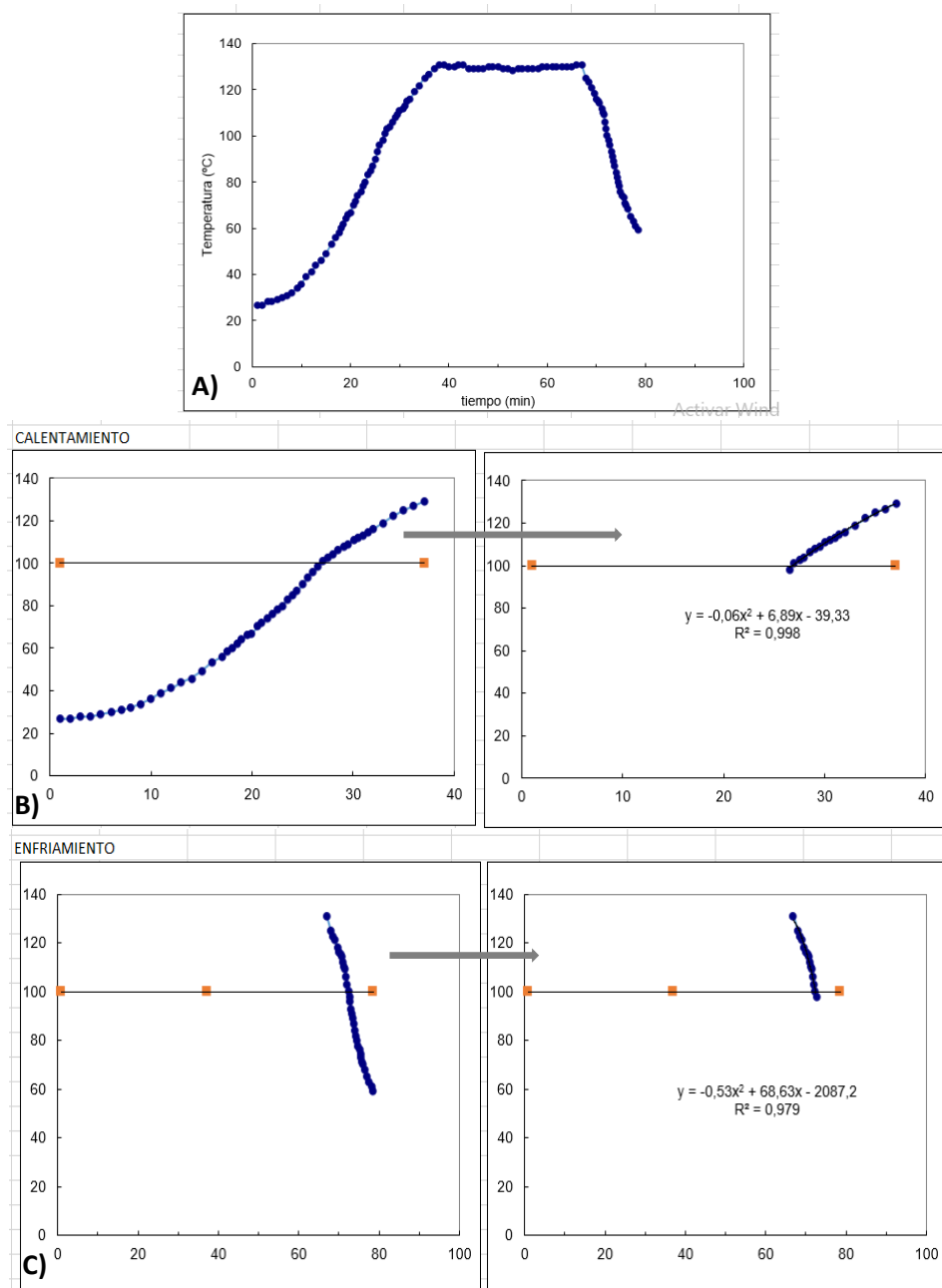


Fig. A.12. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-3 pretratado con hidróxido de sodio. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.13.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA4** pretratado con hidróxido de sodio

Condiciones experimentales		
Temperatura:	150	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,05	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,67	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	26	24,0	100	35,5	150
2,0	27	24,5	102	36,0	150
3,0	28	25,0	105	36,5	150
4,0	29	25,5	107	37,0	150
5,0	30	26,0	111	37,5	150
6,0	32	26,5	113	38,0	150
7,0	34	27,0	116	38,5	150
8,0	36	27,5	119	39,0	151
9,0	38	28,0	123	39,5	151
10,0	40	28,5	125	40,0	151
11,0	43	29,0	127	41,0	150
12,0	47	29,5	130	42,0	150
13,0	50	30,0	133	43,0	151
14,0	54	30,5	135	44,0	151
15,0	58	31,0	137	45,0	151
16,0	62	31,5	140	46,0	151
17,0	66	32,0	142	47,0	150
18,0	71	32,5	145	48,0	150
19,0	75	33,0	149	49,0	150
20,0	80	33,5	149	50,0	150
21,0	85	34,0	150	51,0	150
22,0	91	34,5	150	52,0	150
23,0	96	35,0	150	53,0	150

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
54,0	150	64,0	140	66,8	94
55,0	150	64,5	135	67,0	89
56,0	150	64,8	132	67,3	85
57,0	150	65,0	129	67,5	81
58,0	150	65,3	124	67,8	75
59,0	150	65,5	120	68,0	70
60,0	150	65,8	115	68,3	66
61,0	150	66,0	110	68,5	61
62,0	150	66,3	105	68,8	58
63,0	150	66,5	100	69,0	55

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento		5,35	-28,17	0,998	-258,69		
Mantenimiento					889,83		
Enfriamiento		-16,54	1201,7	0,983	784,53		
Total					1415,65	3,15	1,48

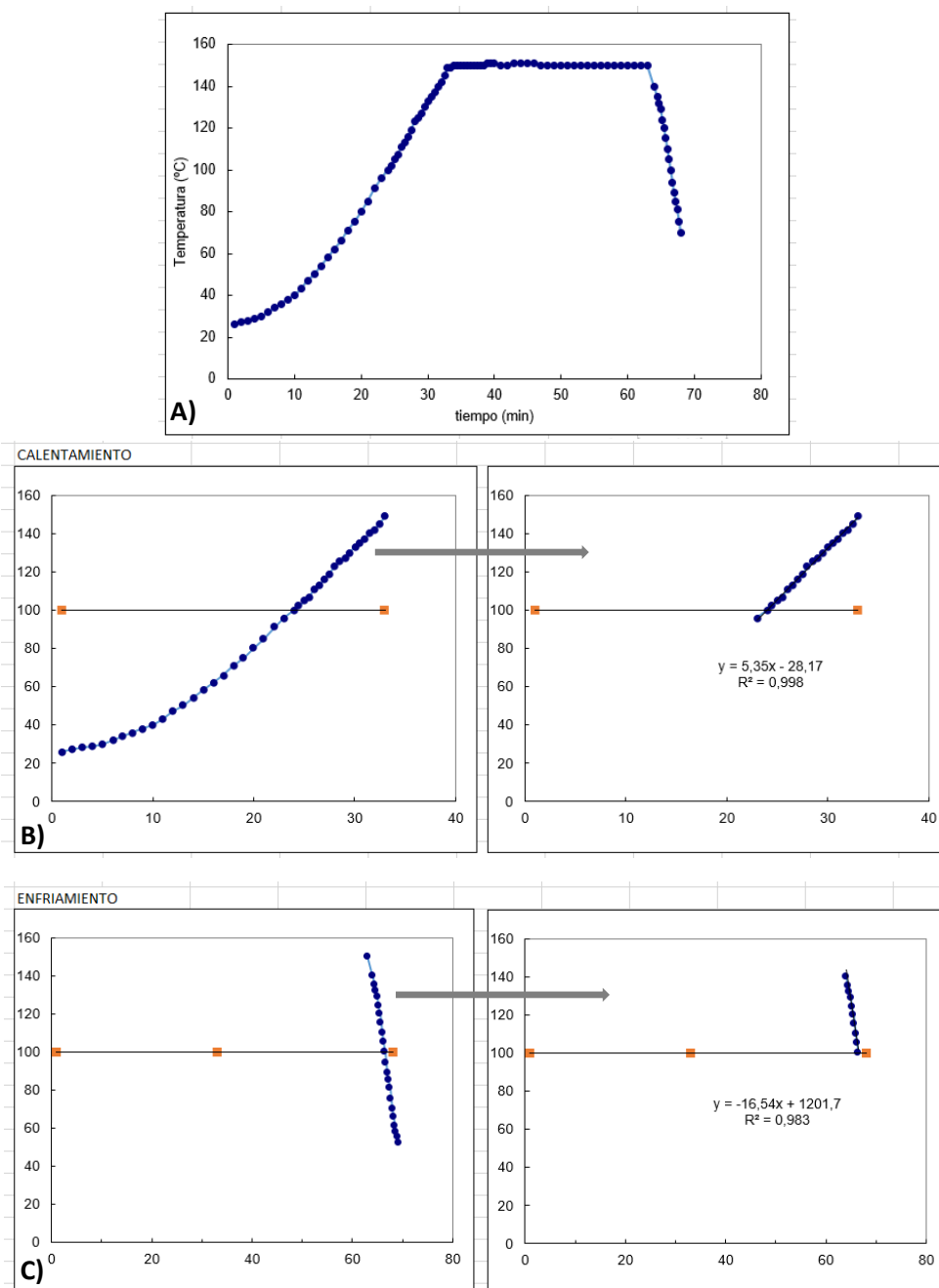


Fig. A.13. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-4 pretratado con hidróxido de sodio. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.14.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA5 pretratado con hidróxido de sodio**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	150	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,075	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,56	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	25	20,5	63	32,0	113
2,0	25	21,0	65	32,5	115
3,0	26	21,5	67	33,0	117
4,0	26	22,0	69	33,5	119
5,0	27	22,5	71	34,0	121
6,0	28	23,0	74	34,5	122
7,0	28	23,5	76	35,0	124
8,0	30	24,0	78	35,5	126
9,0	31	24,5	81	36,0	127
10,0	33	25,0	83	36,5	129
11,0	35	25,5	86	37,0	130
12,0	37	26,0	89	37,5	132
13,0	39	26,5	91	38,0	133
14,0	42	27,0	93	38,5	135
15,0	45	27,5	96	39,0	137
16,0	47	28,0	99	39,5	138
17,0	50	28,5	101	40,0	139
17,5	52	29,0	103	41,0	142
18,0	54	29,5	105	42,0	144
18,5	56	30,0	106	43,0	146
19,0	57	30,5	108	44,0	148
19,5	59	31,0	110	45,0	150
20,0	61	31,5	112	46,0	151

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
47,0	150	71,0	150	81,0	95
48,0	150	72,0	149	81,3	93
49,0	149	73,0	150	81,5	91
50,0	149	74,0	150	81,8	88
51,0	150	75,0	150	82,0	87
52,0	150	76,0	144	82,3	85
53,0	150	76,5	141	82,5	84
54,0	149	76,8	136	82,8	82
55,0	149	77,0	132	83,0	80
56,0	150	77,3	128	83,3	79
57,0	150	77,5	124	83,5	77
58,0	150	77,8	121	83,8	76
59,0	150	78,0	119	84,0	75
60,0	150	78,3	116	84,5	74
61,0	150	78,5	114	85,0	73
62,0	149	78,8	112	85,5	71
63,0	150	79,0	109	86,0	70
64,0	150	79,3	107	86,5	68
65,0	150	79,5	106	87,0	65
66,0	150	79,8	104	88,0	62
67,0	151	80,0	103	89,0	59
68,0	150	80,3	101	90,0	56
69,0	150	80,5	99	91,0	54
70,0	150	80,8	97		

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	-0,06	7,46	-63,28	0,999	170,38		
Mantenimiento					889,83		
Enfriamiento		-9,86	890,5	0,988	168,10		
Total					1228,31	3,09	1,53

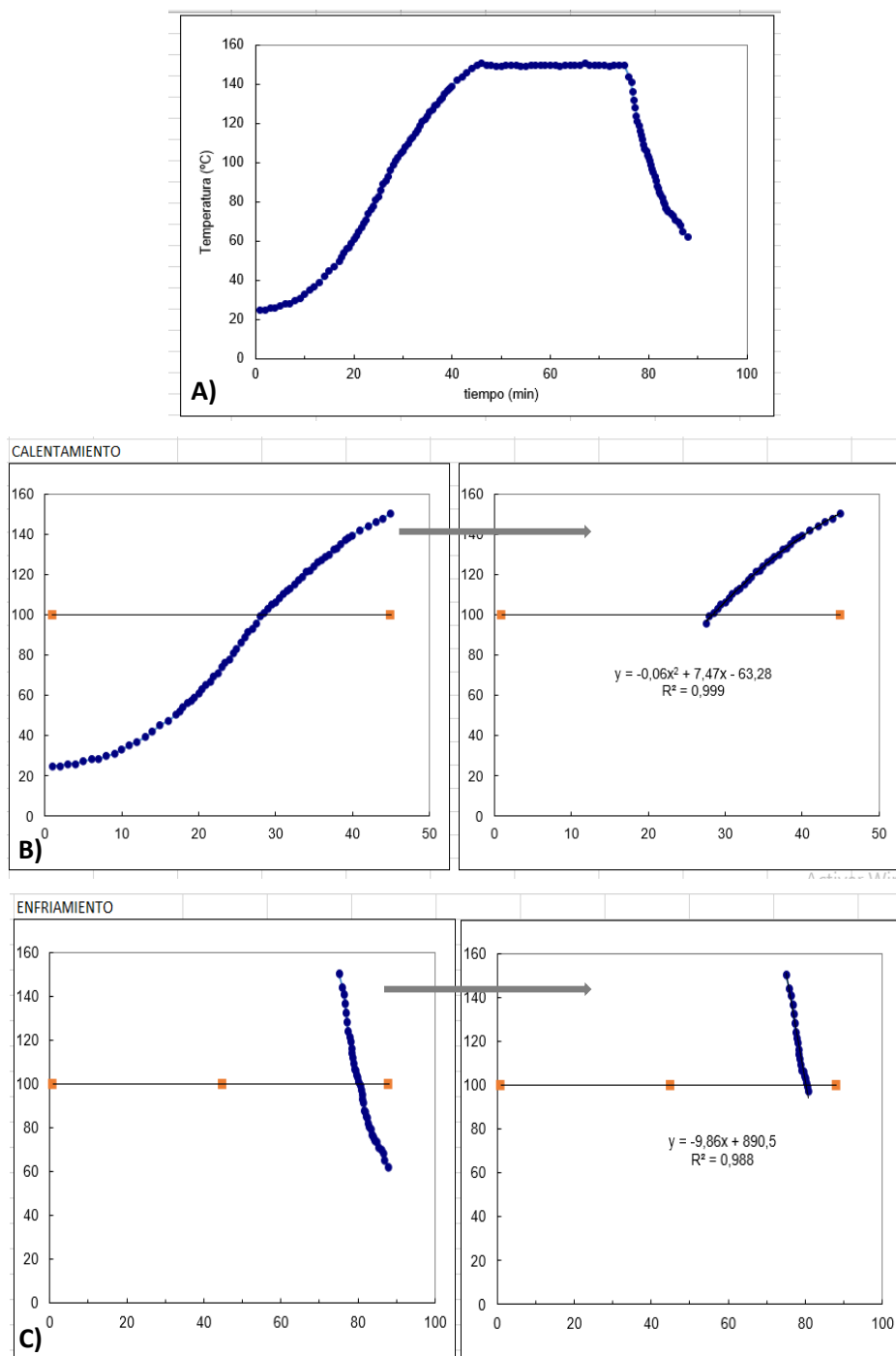


Fig. A.14. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-5 pretratado con hidróxido de sodio. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.15.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA6** pretratado con hidróxido de sodio

Condiciones experimentales		
Temperatura:	150	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,100	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,62	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	24	20,5	64	32,5	115
2,0	24	21,0	66	33,0	117
3,0	25	21,5	68	33,5	119
4,0	25	22,0	70	34,0	121
5,0	26	22,5	72	34,5	123
6,0	26	23,0	74	35,0	124
7,0	28	23,5	76	35,5	126
8,0	29	24,0	78	36,0	128
9,0	30	24,5	80	36,5	129
10,0	32	25,0	82	37,0	131
11,0	34	25,5	84	37,5	132
12,0	36	26,0	87	38,0	134
13,0	39	27,0	92	39,0	136
14,0	42	27,5	94	40,0	139
15,0	44	28,0	97	41,0	141
16,0	47	28,5	99	42,0	143
17,0	51	29,0	102	43,0	146
17,5	53	29,5	104	44,0	147
18,0	54	30,0	106	45,0	148
18,5	56	30,5	108	46,0	150
19,0	58	31,0	110	47,0	150
19,5	60	31,5	112	48,0	151
20,0	62	32,0	114	49,0	151

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
50,0	151	68,0	150	79,3	117
51,0	151	69,0	149	79,5	112
52,0	150	70,0	149	79,8	108
53,0	150	71,0	150	80,0	102
54,0	149	72,0	151	80,3	100
55,0	149	73,0	151	80,5	96
56,0	150	74,0	150	80,8	93
57,0	150	75,0	150	81,0	91
58,0	150	76,0	151	81,3	90
59,0	150	77,0	150	81,5	88
60,0	150	77,3	148	81,8	86
61,0	150	77,5	146	82,0	83
62,0	149	77,8	143	82,5	81
63,0	149	78,0	140	83,0	79
64,0	150	78,3	136	83,5	76
65,0	150	78,5	132	84,0	74
66,0	150	78,8	127	84,5	72
67,0	150	79,0	121	85,0	70

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	-0,09	9,44	-98,29	0,999	191,37		
Mantenimiento					889,83		
Enfriamiento		-16,56	1429,1	0,989	542,12		
Total					1623,32	3,21	1,59

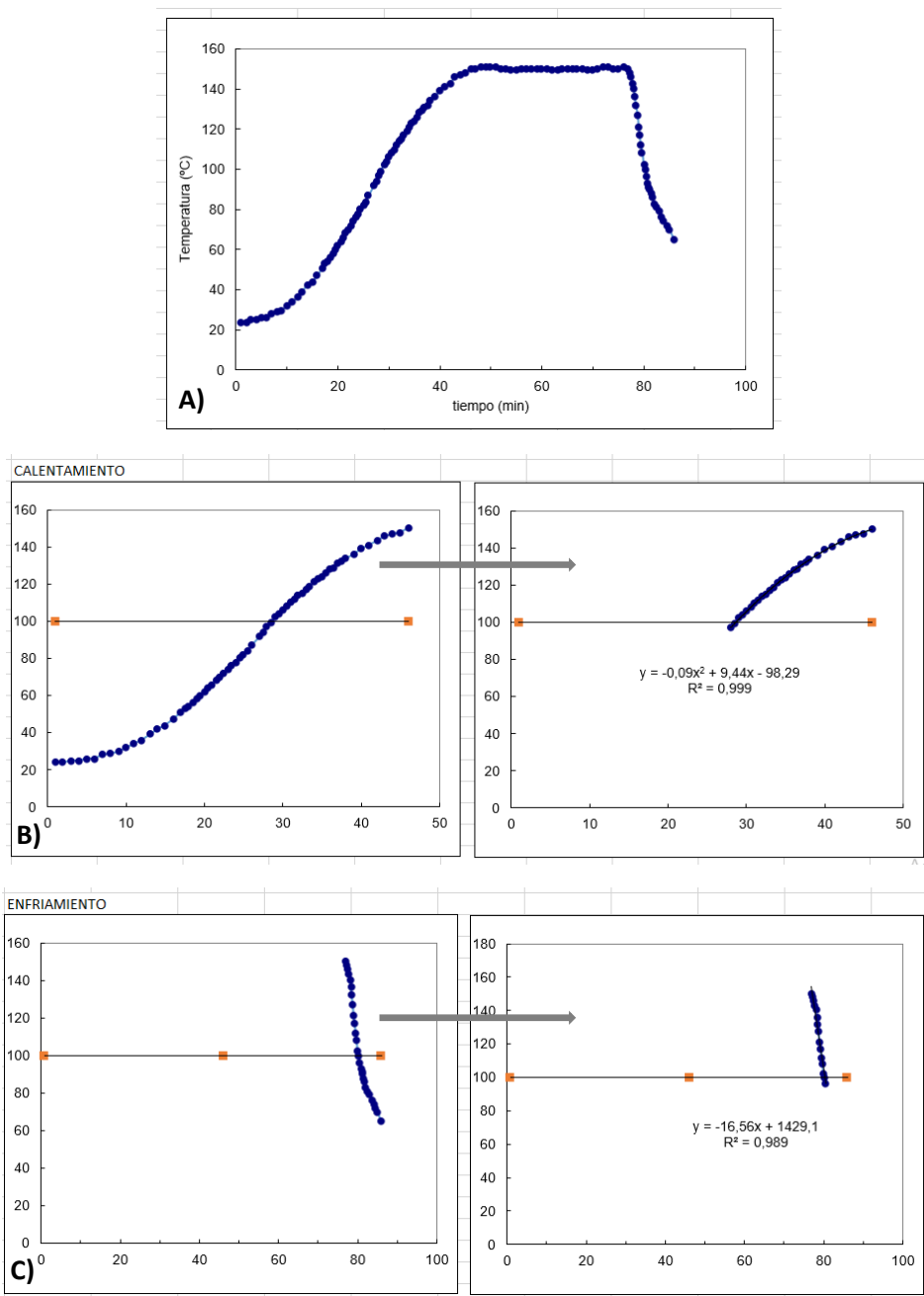


Fig. A.15. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-6 pretratado con hidróxido de sodio. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.16.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA7 pretratado con hidróxido de sodio**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	170	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,050	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,92	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	25	21,0	64	34,0	122
2,0	25	21,5	66	34,5	125
3,0	25	22,0	68	35,0	127
4,0	26	22,5	70	35,5	129
5,0	26	23,0	72	36,0	131
6,0	26	23,5	74	36,5	133
7,0	27	24,0	77	37,0	135
8,0	28	24,5	79	37,5	137
9,0	30	25,0	81	38,0	139
10,0	32	25,5	84	38,5	141
11,0	33	26,0	86	39,0	142
12,0	35	26,5	89	39,5	144
13,0	37	27,0	92	40,0	146
14,0	40	27,5	95	40,5	148
15,0	43	28,0	98	41,0	149
16,0	46	28,5	100	41,5	151
17,0	49	29,0	103	42,0	152
18,0	52	29,5	105	42,5	154
18,5	54	30,0	106	43,0	155
19,0	56	31,0	109	43,5	157
19,5	58	32,0	113	44,0	158
20,0	60	33,0	118	44,5	160
20,5	62	33,5	120	45,0	162

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
45,5	163	64,0	169	81,3	134
46,0	163	65,0	169	81,5	129
46,5	164	66,0	170	81,8	125
47,0	166	67,0	170	82,0	122
47,5	167	68,0	170	82,3	120
48,0	167	69,0	170	82,5	117
48,5	168	70,0	170	82,8	115
49,0	169	71,0	171	83,0	110
49,5	170	72,0	170	83,5	104
50,0	170	73,0	169	84,0	100
50,5	169	74,0	170	84,5	97
51,0	169	75,0	170	85,0	95
52,0	169	76,0	171	85,5	92
53,0	169	77,0	171	86,0	90
54,0	170	78,0	170	86,5	88
55,0	170	79,0	170	87,0	86
56,0	171	79,3	168	88,0	82
57,0	170	79,5	167	89,0	81
58,0	170	79,8	163	90,0	75
59,0	170	80,0	158	91,0	74
60,0	169	80,3	153	92,0	68
61,0	169	80,5	147	93,0	62
62,0	169	80,8	142	94,0	59
63,0	169	81,0	138	95,0	57

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	-0,06	8,26	-86,01	0,999	690,90		
Mantenimiento					3452,87		
Enfriamiento		-13,90	1266,60	0,979	568,61		
Total					4712,38	3,67	1,75

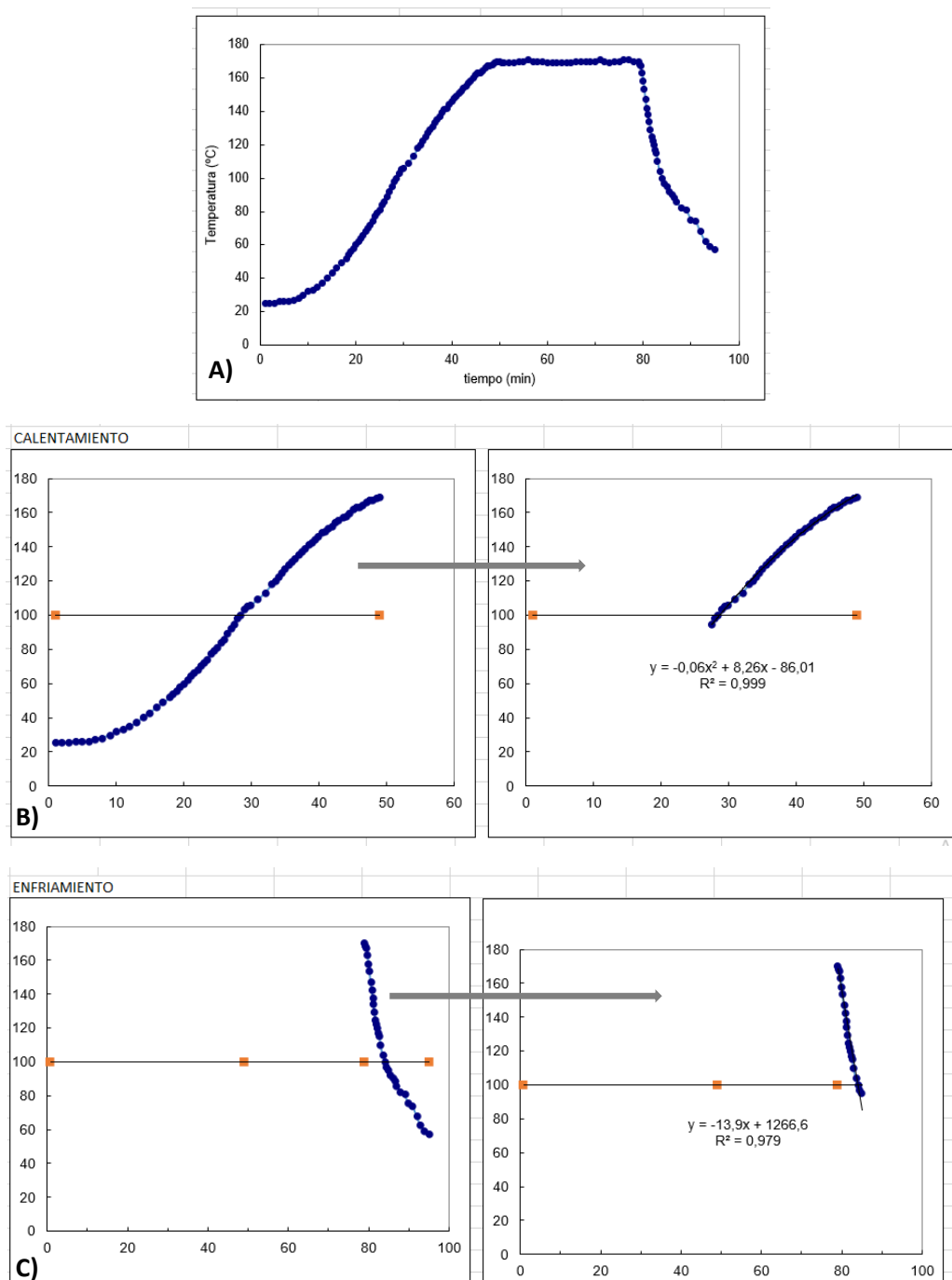


Fig. A.16. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-7 pretratado con hidróxido de sodio. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.17.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA8** pretratado con hidróxido de sodio

Condiciones experimentales		
Temperatura:	130	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,075	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,91	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	25	24,0	75	47,0	161
2,0	26	25,0	80	48,0	163
3,0	26	26,0	85	49,0	165
4,0	26	27,0	90	50,0	167
5,0	27	28,0	95	51,0	168
6,0	27	29,0	100	52,0	170
7,0	28	30,0	105	53,0	170
8,0	29	31,0	107	54,0	171
9,0	30	32,0	111	55,0	171
10,0	32	33,0	116	56,0	171
11,0	33	34,0	119	57,0	171
12,0	35	35,0	123	58,0	171
13,0	38	36,0	127	59,0	171
14,0	40	37,0	132	60,0	171
15,0	42	38,0	135	61,0	169
16,0	45	39,0	138	62,0	169
17,0	49	40,0	142	63,0	169
18,0	51	41,0	145	64,0	170
19,0	56	42,0	148	65,0	169
20,0	58	43,0	151	66,0	170
21,0	62	44,0	154	67,0	170
22,0	66	45,0	156	68,0	169
23,0	70	46,0	159	69,0	169

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
70,0	170	83,0	163	86,8	89
71,0	170	83,3	156	87,0	86
72,0	171	83,5	148	87,5	82
73,0	170	83,8	141	88,0	76
74,0	170	84,0	134	88,5	72
75,0	171	84,3	128	89,0	69
76,0	171	84,5	121	89,5	67
77,0	171	84,8	115	90,0	66
78,0	171	85,0	110	90,5	65
79,0	171	85,3	106	91,0	64
80,0	170	85,5	103	91,5	63
81,0	170	85,8	99	92,0	62
82,0	170	86,0	96	93,0	60
82,5	169	86,3	94	94,0	57
82,8	167	86,5	91	95,0	55

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	-0,06	8,22	-86,23	0,999	754,25		
Mantenimiento					3452,87		
Enfriamiento		-21,71	1959,10	0,988	782,42		
Total					4989,54	3,70	1,79

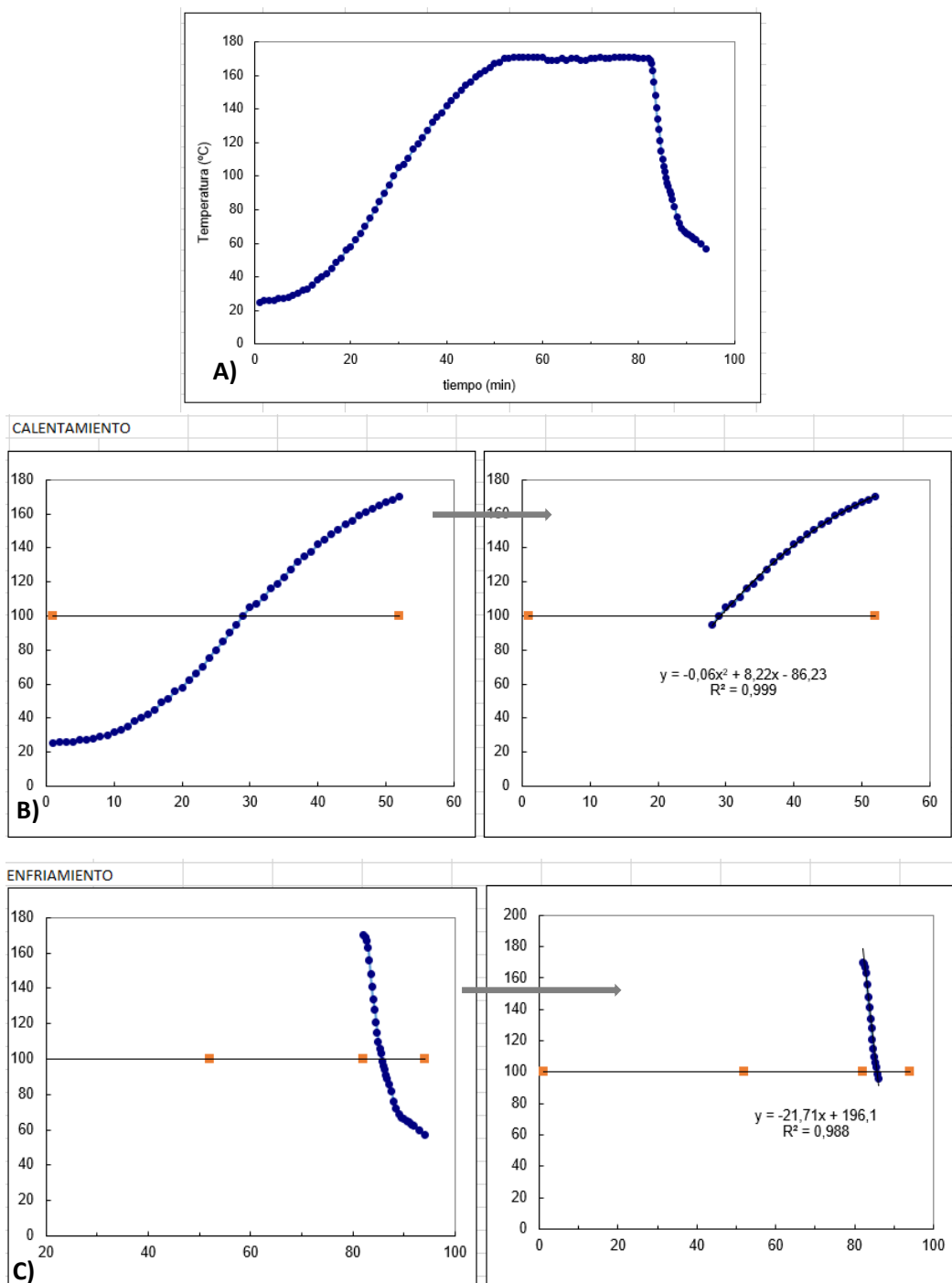


Fig. 5.17. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-8 pretratado con hidróxido de sodio. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

Tabla A.18.

Datos recogidos para el cálculo de la severidad en la hidrólisis ácida **OXA9 pretratado con hidróxido de sodio**

Condiciones experimentales		
Temperatura:	170	°C
Agitación:	150	rpm
Concentración:	0,100	M
Tiempo:	30	min
pH:	1,78	

Datos recogidos:

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
1,0	26	24,0	74	47,0	165
2,0	26	25,0	78	48,0	167
3,0	27	26,0	83	49,0	169
4,0	28	27,0	87	50,0	170
5,0	28	28,0	93	51,0	170
6,0	29	29,0	98	52,0	170
7,0	29	30,0	102	53,0	171
8,0	30	31,0	107	54,0	171
9,0	31	32,0	111	55,0	169
10,0	32	33,0	116	56,0	169
11,0	33	34,0	121	57,0	169
12,0	35	35,0	126	58,0	170
13,0	37	36,0	130	59,0	170
14,0	39	37,0	134	60,0	170
15,0	41	38,0	138	61,0	170
16,0	45	39,0	142	62,0	170
17,0	47	40,0	145	63,0	170
18,0	50	41,0	148	64,0	169
19,0	54	42,0	151	65,0	169
20,0	58	43,0	155	66,0	169
21,0	61	44,0	157	67,0	169
22,0	66	45,0	160	68,0	169
23,0	70	46,0	163	69,0	168

t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
70,0	168	80,8	153	84,5	103
71,0	168	81,0	148	84,8	101
72,0	168	81,3	145	85,0	99
73,0	168	81,5	141	85,3	96
74,0	169	81,8	137	85,5	94
75,0	169	82,0	134	85,8	92
76,0	169	82,3	132	86,0	90
77,0	170	82,5	130	86,5	86
78,0	170	82,8	127	87,0	81
79,0	170	83,0	124	87,5	78
79,5	169	83,3	120	88,0	74
79,8	167	83,5	117	88,5	71
80,0	165	83,8	114	89,0	68
80,3	160	84,0	110	90,0	63
80,5	157	84,3	106	91,0	58

Resultados obtenidos:

Fase	Variables ecuaciones ajuste			r ²	R _o	Log R _o	CSF
	x ²	x	ind.				
Calentamiento	-0,09	10,51	-134,24	0,999	594,47		
Mantenimiento					3452,87		
Enfriamiento		-12,86	1190,40	0,995	934,38		
Total					4981,72	3,70	1,92

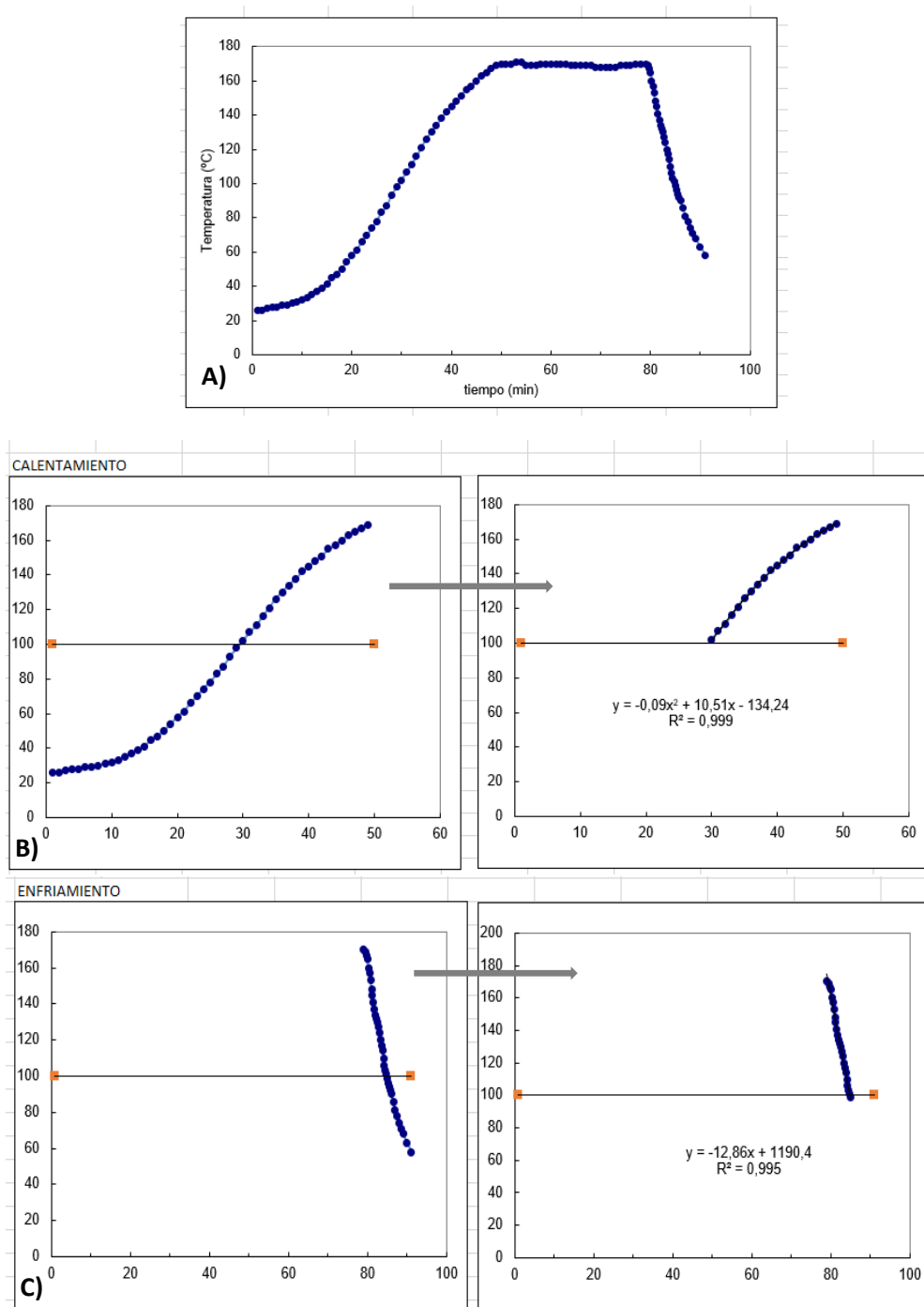


Fig. 5.18. Gráficas obtenidas para el cálculo del factor de severidad en el ensayo OXA-9 pretratada con hidróxido de sodio. A) proceso general; B) fase de calentamiento, con sección por encima de los 100 °C ampliada; C) fase de enfriamiento con sección por encima de los 100 °C ampliada

APÉNDICE B

DATOS DE FERMENTACIÓN

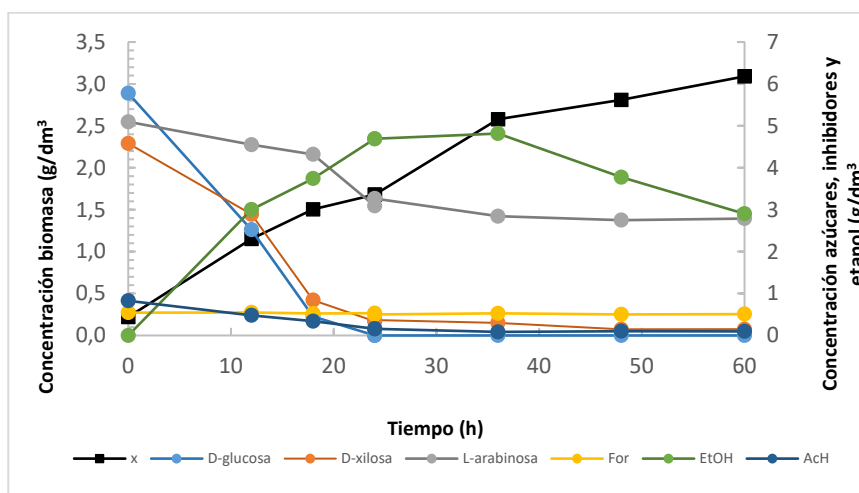
B.1. Fermentación de hidrolizados procedentes de biomasa de poda de olivo de partida

Tabla B.1.

Evolución temporal de la concentración (g/dm^3) de biomasa, azúcares, inhibidores y bioetanol durante la fermentación del hidrolizado del ensayo OXA-1

t, h	x	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	For	AcH	Etanol	S _T
0	0,220	5,777	4,581	5,097	0,545	0,827	0,000	15,46
12	1,152	2,521	2,891	4,551	0,548	0,480	3,003	9,96
18	1,504	0,453	0,842	4,319	0,524	0,341	3,744	5,61
24	1,680	0,000	0,336	3,090	0,532	0,157	4,691	3,63
36	2,580	0,000	0,301	2,845	0,501	0,159	4,817	3,15
48	2,810	0,000	0,147	2,750	0,528	0,085	3,775	2,90
60	3,090	0,000	0,149	2,789	0,503	0,102	2,903	2,94

t: tiempo en horas, x: Concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3), S_T: azúcares totales (g/dm^3)



x: Concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), EtOH: etanol (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3)

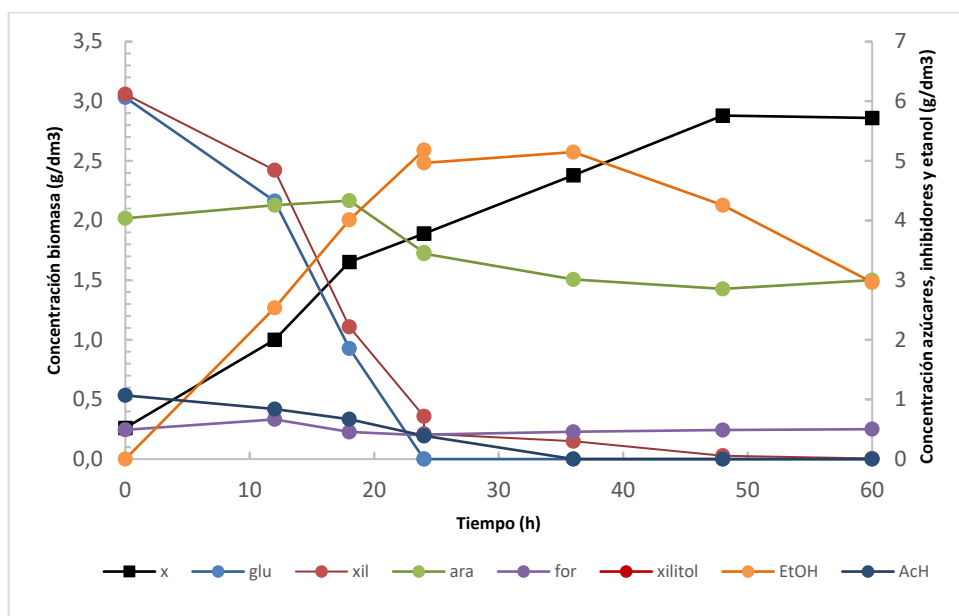
Fig. B.1. Ensayo fermentativo del hidrolizado derivado del tratamiento OXA-1, obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida

Tabla B.2.

Evolución temporal de la concentración (g/dm^3) de biomasa, azúcares, inhibidores y bioetanol durante la fermentación del hidrolizado del ensayo OXA-2

t, h	x	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	For	AcH	Etanol	S _T
0	0,262	6,063	6,118	4,038	0,491	1,068	0,000	16,22
12	1,000	4,325	4,844	4,256	0,665	0,839	2,535	13,43
18	1,652	1,856	2,216	4,333	0,455	0,668	4,011	8,41
24	1,890	0,000	0,716	3,464	0,398	0,391	5,182	4,18
36	2,380	0,000	0,299	3,012	0,458	0,000	5,148	3,31
48	2,880	0,000	0,057	2,854	0,487	0,000	4,257	2,91
60	2,860	0,000	0,010	3,001	0,502	0,000	2,963	3,01

t: tiempo en horas, x: Concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3), S_T: azúcares totales (g/dm^3)



x: Concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), EtOH: etanol (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3)

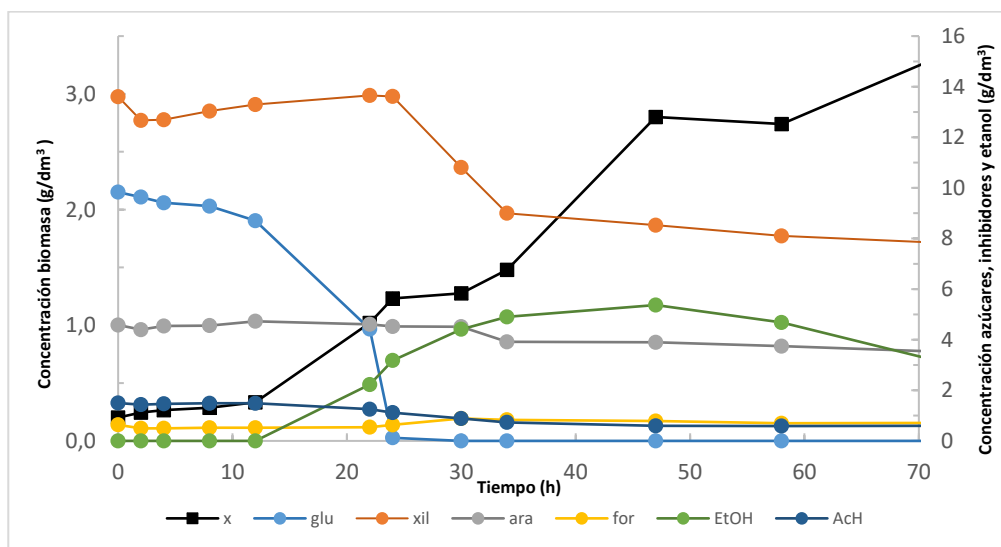
Fig. B.2. Ensayo fermentativo del hidrolizado derivado del tratamiento OXA-2, obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida

Tabla B.3.

Evolución temporal de la concentración (g/dm^3) de biomasa, azúcares, inhibidores y bioetanol durante la fermentación del hidrolizado del ensayo OXA-3

t, h	x	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	For	AcH	Etanol	S _T
0	0,202	9,832	13,604	4,581	0,636	1,497	0,000	28,02
2	0,246	9,637	12,667	4,396	0,499	1,434	0,000	26,70
4	0,266	9,412	12,694	4,543	0,496	1,464	0,000	26,65
8	0,287	9,279	13,034	4,559	0,520	1,488	0,000	26,87
12	0,334	8,703	13,295	4,727	0,519	1,486	0,000	26,73
22	1,020	4,421	13,656	4,608	0,542	1,253	2,227	22,68
24	1,232	0,125	13,615	4,524	0,632	1,117	3,178	18,26
30	1,276	0,000	10,805	4,514	0,887	0,887	4,413	15,32
34	1,480	0,000	8,998	3,917	0,832	0,730	4,903	12,92
47	2,800	0,000	8,527	3,897	0,785	0,596	5,371	12,42
58	2,740	0,000	8,101	3,745	0,698	0,587	4,681	11,85
72	3,330	0,000	7,827	3,524	0,710	0,599	3,118	11,35

t: tiempo en horas, x: Concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3), S_T: azúcares totales (g/dm^3)



x: Concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), EtOH: etanol (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3)

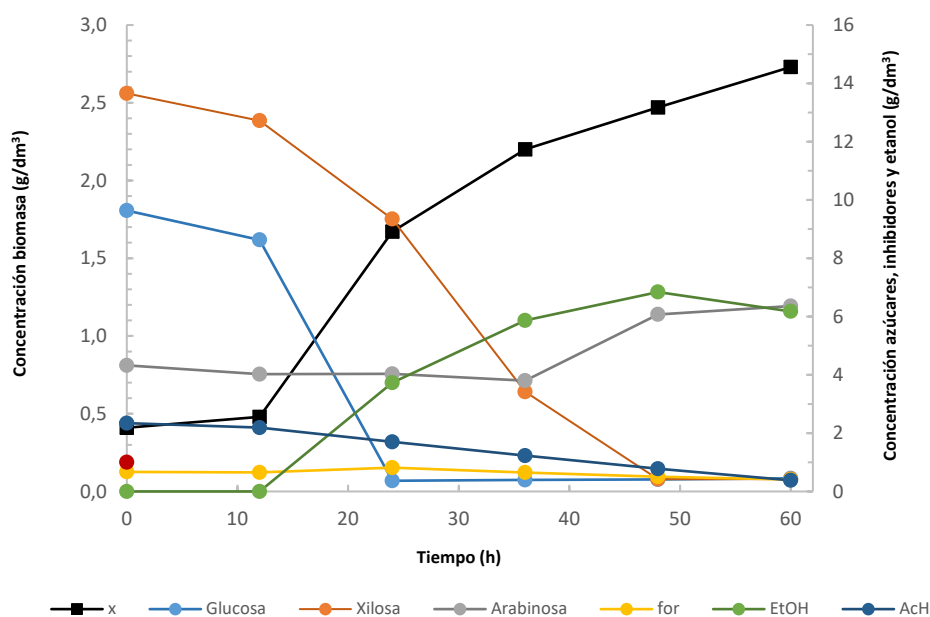
Fig. B.3. Ensayo fermentativo del hidrolizado derivado del tratamiento OXA-3, obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida

Tabla B.4.

Evolución temporal de la concentración (g/dm^3) de biomasa, azúcares, inhibidores y bioetanol durante la fermentación del hidrolizado del ensayo OXA-4

t, h	x	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	For	AcH	Etanol	S _T
0	0,410	9,637	13,655	4,324	0,671	2,344	0,000	27,62
12	0,480	8,630	12,719	4,023	0,653	2,189	0,000	25,37
24	1,672	0,367	9,345	4,035	0,817	1,702	3,731	13,75
36	2,200	0,395	3,418	3,801	0,651	1,229	5,868	7,61
48	2,470	0,412	0,421	6,072	0,506	0,779	6,840	6,91
60	2,730	0,449	0,424	6,360	0,410	0,383	6,177	7,23

t: tiempo en horas, x: Concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3), S_T: azúcares totales (g/dm^3)



x: Concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), EtOH: etanol (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3)

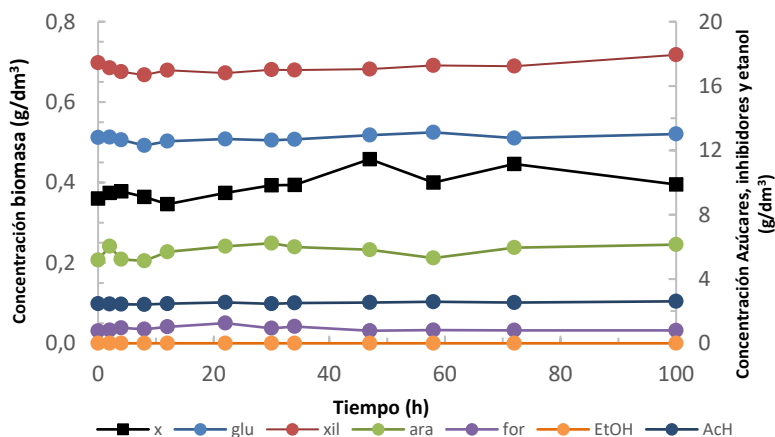
Fig. B.4. Ensayo fermentativo del hidrolizado derivado del tratamiento OXA-4, obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida

Tabla B.5.

Evolución temporal de la concentración (g/dm^3) de biomasa, azúcares, inhibidores y bioetanol durante la fermentación del hidrolizado del ensayo OXA-5

t, h	x	D-glucosa	D-xilosa	L-arabinosa	For	AcH	EtOH	St
0	0,360	12,799	17,441	5,178	0,770	2,454	0,000	35,42
2	0,374	12,815	17,121	6,030	0,811	2,433	0,000	35,97
4	0,378	12,652	16,882	5,221	0,957	2,427	0,000	34,76
8	0,364	12,298	16,686	5,121	0,873	2,410	0,000	34,10
12	0,346	12,564	16,981	5,683	1,022	2,461	0,000	35,23
22	0,374	12,698	16,804	6,030	1,252	2,541	0,000	35,53
30	0,393	12,628	17,012	6,223	0,931	2,455	0,000	35,86
34	0,394	12,678	16,991	5,989	1,040	2,504	0,000	35,66
47	0,458	12,946	17,050	5,814	0,777	2,537	0,000	35,81
58	0,400	13,118	17,278	5,302	0,820	2,579	0,000	35,70
72	0,446	12,758	17,233	5,948	0,802	2,528	0,000	35,94
100	0,395	13,014	17,937	6,137	0,798	2,608	0,000	37,09

t: tiempo en horas, x: concentración de biomasa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3), EtOH: etanol (g/dm^3), St: azúcares totales (g/dm^3)



x: Concentración de biomasa (g/dm^3), glu: D-glucosa (g/dm^3), xil: D-xilosa (g/dm^3), ara: L-arabinosa (g/dm^3), For: ácido fórmico (g/dm^3), EtOH: etanol (g/dm^3), AcH: ácido acético (g/dm^3)

Fig. 5.6. Ensayo fermentativo del hidrolizado derivado del tratamiento OXA-5, (CSF= 1,56) obtenido a partir de biomasa de poda de olivo de partida

APÉNDICE C

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

En el desarrollo de esta tesis doctoral, derivados de las investigaciones llevadas a cabo, fueron publicados tres artículos científicos que se enumeran a continuación. La versión completa de los mismos quedará recogida en el pendrive adjunto a la memoria.

C.1. Artículo: “Improving bioethanol production from olive pruning biomass by deacetylation step prior acid hydrolysis and fermentation processes”



C.2. Artículo: Effectiveness of Sodium Borohydride Treatment on Acid Hydrolyzates from Olive-Tree Pruning Biomass for Bioethanol Production

BioEnergy Research (2019) 12:302–311
<https://doi.org/10.1007/s12155-019-09979-4>

Effectiveness of Sodium Borohydride Treatment on Acid Hydrolyzates from Olive-Tree Pruning Biomass for Bioethanol Production

Silvia Peinado¹ · Soledad Mateo¹ · Sebastián Sánchez¹ · Alberto J. Moya¹ 

Published online: 15 May 2019
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019



C.3. Artículo: Nanocellulose from Agricultural Wastes: Products and Applications—A Review



Review

Nanocellulose from Agricultural Wastes: Products and Applications—A Review

Soledad Mateo, Silvia Peinado, Francisca Morillas-Gutiérrez, M. Dolores La Rubia  and Alberto J. Moya 

Department of Chemical, Environmental and Material Engineering, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain; smateo@ujaen.es (S.M.); silviapeinadoserrano@gmail.com (S.P.); fmmg0008@red.ujaen.es (F.M.-G.); mdrubia@ujaen.es (M.D.L.R.)

* Correspondence: ajmoya@ujaen.es; Tel.: +34-953-212780

Abstract: The isolation of nanocellulose from different agricultural residues is becoming an important research field due to its versatile applications. This work collects different production processes, including conditioning steps, pretreatments, bleaching processes and finally purification for the production of nanocellulose in its main types of morphologies: cellulose nanofiber (CNF) and cellulose nanocrystal (CNC). This review highlights the importance of agricultural wastes in the production of nanocellulose in order to reduce environmental impact, use of fossil resources, guarantee sustainable economic growth and close the circle of resource use. Finally, the possible applications of the nanocellulose obtained as a new source of raw material in various industrial fields are discussed.