



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  

---

**FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA  
QUÍMICA, AMBIENTAL Y DE LOS  
MATERIALES**

**TESIS DOCTORAL**  
**FRACCIONAMIENTO Y CONVERSIÓN  
BIOLÓGICA DE LA PODA DE OLIVO**

**PRESENTADA POR:  
JOSÉ CARLOS MARTÍNEZ PATIÑO**

**DIRIGIDA POR:  
DRA. DÑA. INMACULADA ROMERO PULIDO  
DRA. DÑA. ENCARNACIÓN RUIZ RAMOS**

**JAÉN, 25 DE MAYO DE 2018**

**ISBN 978-84-9159-219-8**





**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

---

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,  
AMBIENTAL Y DE LOS MATERIALES**

**TESIS DOCTORAL**



**FRACCIONAMIENTO Y CONVERSIÓN BIOLÓGICA  
DE LA PODA DE OLIVO**

José Carlos Martínez Patiño, doctorando del Programa de Doctorado en Energías Renovables presenta esta Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén con Mención Internacional.

Jaén, abril de 2018

Fdo.: José Carlos Martínez Patiño  
Doctorando en la Universidad de Jaén





**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

---

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,  
AMBIENTAL Y DE LOS MATERIALES**

**TESIS DOCTORAL**



**FRACCIONAMIENTO Y CONVERSIÓN BIOLÓGICA  
DE LA PODA DE OLIVO**

Las doctoras Inmaculada Romero Pulido y Encarnación Ruiz Ramos, tutora y directoras de la Tesis Doctoral realizada por José Carlos Martínez Patiño, autorizan su presentación a trámite, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa y así optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén con Mención Internacional.

Jaén, abril de 2018

Fdo.: Dra. Inmaculada Romero Pulido  
Profesora Titular de Universidad en la  
Universidad de Jaén

Fdo.: Dra. Encarnación Ruiz Ramos  
Profesora Titular de Universidad en la  
Universidad de Jaén



En estas primeras líneas me gustaría agradecer a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral:

En primer lugar a mis directoras de tesis, a la Dra. Inmaculada Romero Pulido y a la Dra. Encarnación Ruiz Ramos, por su confianza, cercanía y comprensión en los momentos de duda y por su dedicación, implicación y ayuda incansable durante cada uno de los días de estos años de investigación. Muchas gracias, os estaré siempre agradecido.

Al resto de doctores del grupo de investigación TEP-233; Eulogio Castro, por darme la oportunidad de comenzar a formar parte del grupo de investigación, Cristóbal Cara, por tener siempre un buen consejo y tiempo para escucharme y Manuel Moya y Francisco Espínola por su generosidad y amabilidad. También a la técnica de laboratorio Mariola de la Casa por su ayuda y su simpatía.

A mis compañeros de laboratorio, muy especialmente a aquellos que me han acompañado todo o prácticamente todo el tiempo de la realización de esta tesis doctoral, Juan Miguel, Sonia, Juan Carlos, Alfonso y Antonio Muñoz. Muchas gracias por vuestra paciencia, apoyo y ayuda. Gracias por ser buenos compañeros y mejores amigos. También a los que recientemente se han incorporado al grupo, Valeria, Rubén, Carmen, Irene, Dani, José Manuel, Manuel, M<sup>a</sup> José y Antonio Lama. Muchas gracias a todos

A todas las personas del grupo de investigación de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos de la Universidad de Santiago de Compostela, especialmente a Thelmo, Bea y María por la ayuda y amabilidad durante mi estancia.

Al Dr. Mladen Brnčić, al Dr. Filip Dujmić y a Marko Marelja por recibirme dentro de su grupo de investigación durante mi estancia en Zagreb.

A mis padres y a mi hermana por su ánimo, apoyo y sobre todo su cariño. Sin ellos nada de esto habría sido posible

A todos mis amigos que se preocupan, que me animan y ayudan en todo momento

Finalmente, agradecer la colaboración de distintas instituciones que me han permitido desarrollar esta tesis doctoral:

- Al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad que ha financiado los proyectos de investigación “Procesos avanzados de fraccionamiento y conversión biológica para la obtención de energía y productos químicos a partir de poda de olivo” (Ref. ENE2011-29112-C02-02) y “Diseño y optimización de una biorrefinería sostenible basada en biomasa del olivar y de la industria del aceite de oliva: análisis tecnoeconómico y ambiental” (Ref. ENE2014-60090-C2-2-R) con los que he sido contratado como personal científico durante la realización de esta tesis.

- A la Escuela de Doctorado de la Universidad de Jaén por la ayuda concedida para la realización de una estancia destinada a la obtención de la mención internacional en el título de doctor y por la ayuda para la asistencia a seminarios, cursos o congresos.

# ÍNDICE

---



1. RESUMEN .....	1
Abstract .....	7
2. INTRODUCCIÓN .....	13
2.1. Contexto energético y medioambiental .....	15
2.2. Bioetanol .....	19
2.3. Composición de la biomasa lignocelulósica .....	22
2.4. La biomasa de la poda de olivo .....	28
2.5. Fraccionamiento y conversión biológica .....	33
2.5.1. Extracción .....	33
2.5.2. Pretratamiento .....	40
2.5.3. Hidrólisis enzimática .....	46
2.5.4. Compuestos inhibidores y detoxificación .....	47
2.5.5. Fermentación .....	52
2.5.6. Configuraciones de proceso .....	54
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	59
4. RESUMEN DE RESULTADOS .....	63
4.1. Materia prima .....	68
4.2. Rendimiento en azúcares: pretratamiento e hidrólisis enzimática .....	61
4.3. Rendimiento en etanol: fermentación de azúcares celulósicos y hemicelulósicos .....	77
4.3.1. Utilización de la fracción sólida del pretratamiento para la producción de etanol .....	77
4.3.2. Utilización de la fracción hemicelulósica para la producción de etanol .....	78
4.3.3. Rendimiento global en etanol .....	82
4.4. Capacidad antioxidante de la fracción de extractos .....	84

5. CONCLUSIONES .....	87
Conclusions .....	91
6. BIBLIOGRAFÍA .....	95
7. ANEXO .....	111

Artículo 1. High solids loading pretreatment of olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by *Escherichia coli*

Artículo 2. Design and optimization of sulfuric acid pretreatment of extracted olive tree biomass using response surface methodology

Artículo 3. Advanced bioethanol production from olive tree biomass using different process configurations

Artículo 4. Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production

Artículo 5. Application of a combined fungal and diluted acid pretreatment on olive tree biomass

Artículo 6. Optimization of ultrasound- assisted extraction of biomass from olive trees using response surface methodology

# 1. RESUMEN

---



La presente tesis doctoral de título “Fraccionamiento y conversión biológica de la poda de olivo” tiene como objetivo el aprovechamiento del residuo agrícola resultante de la poda del olivar para la obtención de bioetanol y otros productos de alto valor añadido como antioxidantes naturales. Este trabajo se enmarca en las líneas de investigación del Programa de Doctorado en Energías Renovables de la Universidad de Jaén “Biocombustibles” y “Evaluación y aprovechamiento de recursos biomásicos”. Esta tesis se ha desarrollado en el grupo de investigación “Ingeniería Química y Ambiental” (TEP-233), vinculado al Centro de Estudios Avanzados en Energía y Medio Ambiente (CEAEMA), de la Universidad de Jaén. La investigación se ha realizado en el marco de los proyectos de investigación “Procesos avanzados de fraccionamiento y conversión biológica para la obtención de energía y productos químicos a partir de poda de olivo” (Ref. ENE2011-29112-C02-02) y “Diseño y optimización de una biorrefinería sostenible basada en biomasa del olivar y de la industria del aceite de oliva: análisis tecnoeconómico y ambiental” (Ref. ENE2014-60090-C2-2-R), ambos financiados por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

La poda de olivo (PO) es un residuo lignocelulósico que se genera durante la realización de la tarea agrícola en la que se eliminan las ramas improductivas del árbol con objeto de mejorar la productividad del olivar y facilitar la recolección del fruto en la siguiente campaña. Normalmente, este residuo se apila y se quema directamente en el campo, o bien es triturado y esparcido por el suelo para enriquecerlo en materia orgánica. En España se encuentra una cuarta parte de la superficie mundial destinada al olivar, por lo que se generan grandes cantidades de esta biomasa lignocelulósica sin una aplicación viable. La poda de olivo está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y extractos, y una alternativa de valorización podría ser su utilización como materia prima de una biorrefinería. La celulosa y la hemicelulosa son polímeros de azúcares que pueden ser una fuente de monómeros fermentables para la producción de etanol. La lignina puede ser usada para la síntesis de compuestos químicos o como combustible sólido para la generación de calor y electricidad. Los extractos contienen diferentes compuestos bioactivos, como los flavonoides o los compuestos fenólicos, con capacidad antioxidante. En este trabajo se han estudiado diferentes pretratamientos y configuraciones de proceso para el fraccionamiento de la poda de olivo en sus principales

componentes, con el objetivo de avanzar hacia una tecnología basada en el concepto de biorrefinería para la obtención de diversos productos a partir de esta biomasa residual.

En primer lugar, se estudió la influencia de las principales variables de operación en el pretratamiento con ácido diluido, empleando dos ácidos diferentes, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. Los pretratamientos se aplicaron sobre biomasa de poda de olivo previamente sometida a una extracción acuosa en autoclave a 120°C durante 60 minutos. Se comprobó que la eliminación de gran parte de los extractos mejora los rendimientos de sacarificación enzimática de los sólidos pretratados y favorece la fermentabilidad de los prehidrolizados (fracciones líquidas resultantes del pretratamiento). En el pretratamiento con ácido fosfórico se evaluó el efecto de la temperatura (170, 190 y 210°C) y la concentración de ácido (0,5; 1 y 1,5% p/v) como variables de proceso. En el caso del pretratamiento con ácido sulfúrico, se realizó de acuerdo con un diseño de experimentos tipo Box-Benhken en el que las variables estudiadas fueron la temperatura (160-200°C), la concentración de ácido sulfúrico (0-8 g de ácido/100 g de biomasa) y la relación sólido/líquido (15-35%).

Asimismo, se ensayó un pretratamiento secuencial en dos etapas sobre la poda de olivo extraída, con objeto de mejorar la eficiencia en el fraccionamiento de la biomasa. La primera etapa consistió en un tratamiento con ácido sulfúrico diluido a menor temperatura que las estudiadas anteriormente (130°C) con el objetivo de maximizar la recuperación de azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado. A continuación, los sólidos pretratados se sometieron a una etapa de oxidación con peróxido de hidrogeno en medio alcalino, a fin de deslignificar el material e incrementar así la digestibilidad enzimática de la celulosa. Ambas etapas de pretratamiento se llevaron a cabo de acuerdo con un diseño de experimentos central compuesto que permitió evaluar y optimizar las variables de operación en cada etapa. En la etapa ácida se estudió la influencia de la concentración de ácido sulfúrico (1-3% p/v) y el tiempo (60-120 min) con una carga de sólidos del 20%, y en la etapa alcalina se investigó el efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno (1-5% p/v) y el tiempo de pretratamiento (30-90 min) manteniendo la temperatura en 90°C y con una carga de sólidos del 10%.

Los prehidrolizados obtenidos en las etapas de pretratamiento con ácido (que contienen los azúcares hemicelulósicos solubilizados) se fermentaron con cepas etanológicas de la bacteria *Escherichia coli*, capaz de metabolizar tanto pentosas como hexosas. La presencia de diferentes compuestos generados durante el pretratamiento capaces de inhibir el crecimiento del microorganismo, hizo necesaria una etapa previa de acondicionamiento de los prehidrolizados. Para ello se utilizó un tratamiento con hidróxido cálcico (*overliming*) aunque también se estudiaron otros métodos de acondicionamiento, como la adsorción con carbón activo o el tratamiento con resinas de

intercambio iónico con algunos de los licores de ácido sulfúrico. Por otro lado, se llevó a cabo la conversión de la celulosa de los sólidos pretratados a etanol mediante una sacarificación y fermentación simultánea (SFS) usando un complejo enzimático celulolítico y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, excepto para el estudio del pretratamiento con ácido fosfórico, en el que se realizó una hidrólisis enzimática y fermentación secuencial con *E. coli*. Los mejores resultados en cuanto al rendimiento global en etanol se obtuvieron con la configuración de pretratamiento en dos etapas (ácida/oxidativa-alcalina), donde se alcanzaron 15 g de etanol/ 100 g de poda de olivo, 7,5 g producidos a partir del prehidrolizado y 7,5 g de la SSF del sólido.

Adicionalmente, con objeto de conseguir concentraciones finales de etanol más altas, se investigó la conversión biológica conjunta a etanol de todos los azúcares (hemicelulósicos y celulósicos) mediante una estrategia consistente en realizar la hidrólisis enzimática del *slurry* (fracciones sólidas y líquidas resultantes del pretratamiento sin separar) seguida de la co-fermentación del hidrolizado enzimático resultante con *E. coli*. Con esta configuración de proceso, aunque se alcanzaron concentraciones de azúcares de hasta 128 g/L (en el caso de un pretratamiento con ácido sulfúrico con una carga de sólidos del 35%), la máxima concentración de etanol obtenida fue de 31,7 g/L. En cambio, el proceso de conversión fue más eficiente cuando se empleó una carga de sólidos del 15% en el pretratamiento ácido, que dio lugar a un hidrolizado con 65 g/L de azúcares tras la sacarificación enzimática del *slurry*, que se fermentó con *E. coli* obteniendo un alto rendimiento (0,45 g/g) y productividad (0,545 g/L/h).

Asimismo, se estudió el pretratamiento biológico de la poda de olivo evaluando siete hongos de podredumbre blanca distintos y tres tiempos de pretratamiento (15, 30 y 45 días). Los mejores resultados se obtuvieron con el hongo *Irpex lacteus* a los 45 días donde se consiguió un rendimiento de hidrólisis enzimática del 31% frente al 13,5% del control. No obstante, la combinación del pretratamiento biológico con una etapa posterior de pretratamiento ácido mejoró el rendimiento de hidrólisis enzimática dando lugar a un rendimiento global en azúcares del 51%, respecto al contenido inicial en azúcares de la materia prima.

Finalmente, con objeto de extraer compuestos con capacidad antioxidante de la poda de olivo, se estudió la extracción asistida con ultrasonidos mediante un diseño experimental tipo Box-Behnken. Dicha metodología permitió evaluar las principales variables de proceso, la concentración de etanol (20-80%), la amplitud (30-70%) y el tiempo de extracción (5-15 min). Para las condiciones indicadas por el modelo como óptimas (54,6% de etanol; 70% de amplitud y 15 min) se determinó en los extractos 31,8 mg de fenoles/g PO (expresados como mg ácido gálico equivalente) y 74,2 mg de flavonoides /g PO (expresados como mg rutina equivalente).



# ABSTRACT

---



This doctoral thesis entitled "Fractionation and biological conversion of olive tree biomass" aims to use the agricultural residue resulting from the olive tree pruning to obtain bioethanol and other added value products such as natural antioxidants. This work is part of the research lines of the Doctoral Program in Renewable Energies of the Universidad de Jaén "Biofuels" and "Evaluation and use of biomass resources". It has been carried out in the research group "Chemical and Environmental Engineering" (TEP-233), linked to the Center for Advanced Studies on Energy and Environment (CEAEMA), of the Universidad de Jaén. This research has been carried out within the framework of the research projects "Advances towards a flexible multi-feedstock, multi-product biorefinery in regions with high density of agroindustrial biomass: the olive case" (Ref. ENE2011-29112-C02-02) and "Design and optimization of a sustainable biorefinery based on residues from olive crop and oil industry: technoeconomic and environmental analysis"(Ref. ENE2014-60090-C2-2-R), financed by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness.

Olive tree biomass is a lignocellulosic residue that is generated during the pruning of the olive trees. The unproductive branches are eliminated to increase the production of the olive cultivation in the next harvest. This residue is usually eliminated by burning or by grinding and spreading across the field to increase its organic matter content. However, these practices are associated with environmental damages such as carbon dioxide emission, fire risk and disease propagation. A quarter of the world surface dedicated to olive tree cultivation is located in Spain, and therefore, large quantities of this lignocellulosic biomass are generated yearly without a practical utilization. An alternative valorisation of olive tree biomass as raw material of a biorefinery is proposed. This agricultural residue is composed mainly of cellulose, hemicellulose, lignin and extracts. Cellulose and hemicellulose are polysaccharides that can be a source of fermentable sugars for ethanol production. Besides, lignin can be used for the synthesis of chemical compounds or as a solid fuel for heat and power. The extractive fraction contains bioactive compounds such as flavonoids or phenols with antioxidant capacity. In this work, different pretreatments and process configurations for the fractionation of olive tree biomass have been studied to develop the biorefinery concept based on this residual biomass.

Firstly, the influence of the main variables in the diluted acid pretreatment with phosphoric and sulfuric acid was assessed. Acid pretreatments were applied on olive tree biomass after a water extraction at 120 °C for 60 min. The partial removal of the extractives from the biomass improved the enzymatic saccharification yield and increased the fermentability of the prehydrolysates (liquid fractions resulting from the pretreatment). The effect of the temperature (170, 190 and 210°C) and the acid concentration (0.5, 1, 1.5% w/v) in the phosphoric acid pretreatment was evaluated. With regards to the sulfuric acid pretreatment, the influence of the temperature (160-200°C), sulfuric acid concentration (0-8 g acid/100 g biomass) and the solid/liquid ratio (15-35%) was determined according to a Box-Benhken experimental design.

Likewise, a sequential pretreatment of extracted olive tree biomass was studied to achieve a better fractionation. The first step consisted of a treatment with diluted sulfuric acid at a lower temperature than that previously studied (130°C), to maximize the hemicellulosic sugar recovery in the prehydrolysate. Next, the solids resulting from the first acid step were treated with hydrogen peroxide in an alkaline medium to delignify them and increase their enzymatic digestibility. The two pretreatment steps were carried out according to a central composite experimental design that allowed to evaluate and optimize the operation variables in each step. The influence of sulfuric acid concentration (1-3% w/v) and process time (60-120 min) with a solid loading of 20% was studied in the acid step. By the subsequent oxidative-alkaline step, the effect of the hydrogen peroxide concentration (1-5% w/v) and the time (30-90 min) was investigated at 90 °C and 10% solids.

The prehydrolysates from the acid pretreatment that contain the solubilized hemicellulosic sugars were fermented with ethanogenic strains of the bacterium *Escherichia coli*, able to metabolize both pentoses and hexoses. The presence of toxic compounds, generated during the pretreatment, able to inhibit the microorganism growth, made necessary the conditioning of the prehydrolysates prior fermentation. A treatment with calcium hydroxide (overliming) was successfully used, although other detoxification methods such as adsorption with activated carbon or treatment with ion-exchange resins were also tested with the acid liquors. Moreover, the conversion of the cellulose from the pretreated solids into ethanol was carried out by a simultaneous saccharification and fermentation process using a cellulolytic enzyme complex and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However, the solids resulting from the phosphoric acid pretreatment were subjected to a sequential hydrolysis and fermentation with *E. coli*. The best results in terms of overall ethanol yield were obtained using the two-step pretreatment (acid/oxidative-alkaline), 15 g ethanol/100 g olive tree biomass, 7.5 g from the prehydrolysate and 7.5 g from the pretreated solid.

Additionally, the conversion of all sugars in olive tree biomass into ethanol using a strategy that implies the enzymatic hydrolysis of the slurry followed by the co-fermentation of both pentoses and hexoses with *E. coli* was investigated. This process configuration yielded a mixed sugar solution of 128 g/L, when the sulfuric acid pretreatment was performed with 35% solids, but only 31.7 g ethanol/L were obtained. However, the conversion process was more efficient when the acid pretreatment was carried out with 15% solids yielding an enzymatic hydrolysate with 65 g sugars/L (after the enzymatic saccharification of the whole slurry), which was fermented by *E. coli* with a yield as high as 0.45 g ethanol/g sugar and an ethanol productivity of 0.545 g/L/h.

Likewise, the biological pretreatment of olive tree biomass was investigated and the effect of seven white-rot fungi and three pretreatment times (15, 30 and 45 days) was evaluated. The best results were obtained with the fungus *Irpex lacteus*, which achieved an enzymatic hydrolysis yield of 31% at 45 days versus 13.5% of the control. However, the combination of the biological pretreatment followed by an acid pretreatment step improved the enzymatic hydrolysis yield resulting in an overall sugar yield of 51%, with respect to the sugar content in the raw material.

Finally, the ultrasound-assisted extraction was studied using a Box-Behnken experimental design in order to extract compounds with antioxidant capacity from olive tree biomass. This methodology allowed to evaluate the main process variables, ethanol concentration (20-80%), amplitude (30-70%) and extraction time (5-15 min). The optimal conditions determined by the model, 54.6% ethanol, 70% amplitude and 15 min, yielded 31.8 mg phenols/g olive tree biomass (expressed as gallic acid equivalents) and 74.2 mg flavonoids/g olive tree biomass (expressed as rutin equivalents).



## 2. INTRODUCCIÓN

---



## 2.1. CONTEXTO ENERGÉTICO Y MEDIOAMBIENTAL

Las fuentes de energía de origen fósil son la principal causa de emisión de gases de efecto invernadero (GEIs). La sustitución de los combustibles fósiles por energías renovables es uno de los principales retos de la sociedad actual para avanzar hacia un desarrollo sostenible, desde el punto de vista medioambiental, social y económico.

El empleo de biomasa como fuente energética (bioenergía) supone tres cuartas partes del consumo global de energías renovables en el mundo (IRENA, 2017). Por lo tanto, en el contexto del cambio climático y la seguridad energética, la bioenergía es clave para conseguir los compromisos adquiridos en el Acuerdo de París así como los objetivos de desarrollo sostenible de Naciones Unidas (NU, 2015). Concretamente, la bioenergía puede contribuir de manera significativa a los objetivos que se recogen en la Tabla 2.1

**Tabla 2.1.** Objetivos de desarrollo sostenible de Naciones Unidas a los que la bioenergía puede contribuir significativamente (IRENA, 2017)

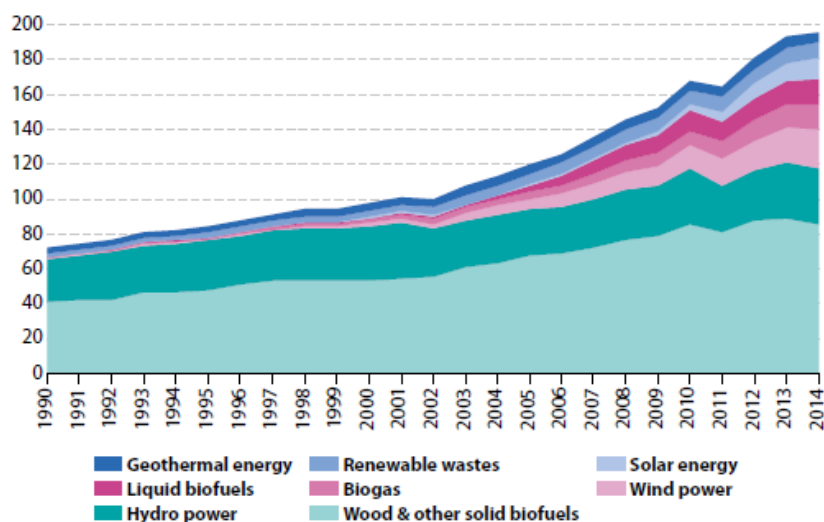
SDG-13	Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos
SDG-7	Garantizar el acceso a una energía asequible, segura, sostenible y moderna para todos
SDG-2	Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible
SDG-15	Gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad

SDG: Sustainable Development Goals (NU, 2015)

La bioenergía puede jugar un papel fundamental en el concepto de bioeconomía, que en la Cumbre Global sobre Bioeconomía celebrada en Berlín (2015) se definió 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”. Este concepto implica la conversión de fuentes de carbono renovables (biomasa agrícola y forestal, residuos orgánicos) en distintos productos para el sector alimentario, compuestos químicos, biomateriales y combustibles (Maina et al., 2017). Así, la bioenergía puede integrarse a nivel regional en biorrefinerías, en las que se realice la valorización en cascada de la biomasa (Zabaniotou, 2018). Estos conceptos están ligados con el de “economía circular”, que pretende transformar las cadenas de valor desde un modelo lineal (producción, uso y desecho) hacia un modelo circular de máxima eficiencia en la utilización de los recursos. La economía circular implica un impulso creciente de la reutilización y el reciclaje, que pretende reducir al mínimo la generación de residuos, que pasan a ser considerados como recursos. Esta estrategia se está impulsando activamente desde la Unión Europea (UE), en línea con sus objetivos de mejora del medioambiente, impulso de la competitividad global, crecimiento económico sostenible y creación de empleo (CE, 2015)

La dependencia energética del conjunto de países de la Unión Europea (UE-28) 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 (EUROSTAT, 2016). Por ello, resulta de especial interés potenciar las fuentes de energía renovables. La producción primaria de energías renovables en la UE ha experimentado una tendencia creciente (Figura 2.1). La biomasa es la fuente energética renovable con una mayor contribución, seguida de la energía hidroeléctrica y de la eólica.



**Figura 2.1** Producción primaria de energía de fuentes renovables en la Unión Europea, EU-28, 1990-2014, en millones de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep). Fuente: EUROSTAT, 2016

En los últimos veinte años, la Unión Europea ha reducido con éxito sus emisiones de GEIs. Así, mientras que las emisiones de UE-28 cayeron un 17% en el periodo 1990-

2011, el crecimiento económico global fue del 45%. Esto se ha debido, en gran medida, a la contribución de las energías renovables y a las medidas en eficiencia energética (CE, 2014). Sin embargo, la reducción de GEIs en el transporte ha sido menor que en otros sectores. El transporte actualmente consume un tercio del total de energía que se usa en la UE y genera una cuarta parte de las emisiones de GEIs. La contribución de la emisión de GEIs en el sector del transporte se estima que irá aumentando, hasta un 40% en 2050, pasando a ser el sector dominante en términos de emisiones de GEIs. Para contrarrestar esta proyección, debe incrementarse significativamente, en el futuro cercano, el uso de combustibles y fuentes energéticas con bajas emisiones de GEIs, como biocarburantes y electricidad de origen renovable (CE, 2017).

La movilidad eléctrica tiene un alto potencial a largo plazo, pero su desarrollo está siendo lento debido a la falta de disponibilidad de vehículos y de infraestructura, y también presenta limitaciones para la sustitución en determinados sectores del transporte (flotas pesadas y aviación). Por ello, los combustibles líquidos seguirán siendo la principal fuente de energía para el transporte en las próximas décadas (CE, 2017).

Desde el principio de este siglo, la Unión Europea está llevando a cabo políticas para contrarrestar el crecimiento en el uso de la energía y las emisiones de GEIs del sector del transporte, marcando objetivos tanto en la eficiencia de los vehículos como en los combustibles utilizados. En 2003, la directiva de biocombustibles (Directiva 2003/30/EC) estableció un objetivo energético del 5,7% para biocarburantes en el transporte por carretera para 2010, alcanzándose finalmente un 4,7% ese año. Los biocarburantes usados, principalmente biodiésel y etanol, se basaron en materias primas alimentarias, y a veces se asociaron con impactos negativos en el uso del suelo. Además, las importaciones fueron significativas. Estos hechos provocaron un debate sobre el valor de los biocarburantes como un instrumento efectivo para mitigar el cambio climático (CE, 2017).

La Directiva de Energías Renovables (Directiva 2009/28/CE) adoptó en 2009 un objetivo del 10% de fuentes energéticas renovables para el sector del transporte por carretera en 2020. En esta Directiva se establecieron exigentes criterios de sostenibilidad para los biocarburantes, con el requisito de que conseguir una reducción contrastable de GEIs mínima del 35% inicialmente, y del 60% a partir del 1 de enero de 2018 para las nuevas instalaciones con inicio de producción a partir de 2017. En el año 2014, el grado de cumplimiento del objetivo de la directiva RED fue sólo del 5,9% (aprox. 14 Mtep), siendo el mayor volumen de esta producción proveniente todavía de cultivos energéticos y alimentarios, aunque el uso actual de la capacidad instalada de producción de bioetanol y biodiésel está sólo entre 50 y 70%, respectivamente (CE, 2017).

El debate sobre el impacto de la expansión de los biocarburantes continúa en la actualidad. En 2015, la Directiva de Energías Renovables de 2009 fue modificada (Directiva 2015/1513/CE), estableciéndose una limitación para los biocarburantes de cultivos energéticos y cultivos alimentarios a un máximo del 7%. Además, se introdujo un objetivo del 0,5% para los “biocarburantes avanzados” que engloban a los residuos industriales, forestales y agrícolas.

Actualmente está en fase de negociación la nueva directiva que se aplicará en la próxima década. Precisamente, uno de los elementos en los que se está produciendo mayor controversia es en el establecimiento de objetivos para el sector del transporte, con una propuesta inicial de reducción progresiva del máximo permitido de biocarburantes obtenidos a partir de materias primas de uso alimentario, y a su vez un aumento progresivo del mínimo de biocarburantes avanzados (Eurobserv'er, 2017). El 3 de noviembre de 2016 la Comisión Europea publicó la propuesta de esa nueva directiva (CE, 2016) que pretende convertir a la UE en el líder mundial en energías renovables, con un objetivo mínimo del 27% de energías renovables en el consumo final de la UE en 2030. El 17 de enero de 2018 el Parlamento Europeo votó a favor de la directiva que servirá de base para las negociaciones en el marco del Consejo Europeo, que representa a los gobiernos de todos los estados miembros de la UE. Se espera que la nueva directiva se publique a mediados de 2018.

## 2.2. BIOETANOL

Según la definición incluida en la Orden ITC/2877/2008 (2008), “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”. Junto con el biodiésel y el hidrobiodiésel (conocido también como HVO, del inglés *Hydrotreated Vegetable Oil*), constituyen los principales biocarburantes presentes hoy día en el mercado (IDAE, 2018). Se entienden por biocarburantes “los combustibles líquidos o gaseosos para transporte producidos a partir de la biomasa” (Orden ITC/2877/2008). El bioetanol puede emplearse en sustitución de la gasolina o como aditivo (en forma de ETBE, etil-ter-butil-éter), mientras que el uso del biodiésel es alternativo al gasóleo.

El bioetanol es el principal biocarburante empleado a nivel mundial en el sector del transporte. Estados Unidos es el mayor productor de etanol con cerca de 15 billones de galones en 2015, seguido de Brasil y de la Unión Europea. Entre Estados Unidos y Brasil contribuyen en un 85% al total de bioetanol que se produce en el mundo (Mohd Azhar et al., 2017). La historia del uso del bioetanol en vehículos es antigua. A principios del siglo XX, su uso estaba ampliamente extendido en Europa y Estados Unidos, pero dejó de emplearse después de la segunda guerra mundial debido a la irrupción del petróleo en el mercado con costes más competitivos. Posteriormente, tras la crisis del petróleo de la década de los setenta, volvió a crecer el interés en el bioetanol como combustible alternativo a los fósiles (Demirbas, 2009).

El caso de Brasil es un ejemplo de éxito, con una importante producción de bioetanol a partir de caña de azúcar a partir de la crisis económica de 1929, que se impulsó en 1975 con el programa nacional de alcohol (Proalcool). El apoyo gubernamental, la innovación, el uso de la biomasa residual de caña para suministrar energía a la destilación y para generación eléctrica, están entre los factores que han llevado al bioetanol brasileño

a la primera posición mundial en cuanto a costes de producción competitivos y sostenibilidad (Scheiterle et al., 2018).

El bioetanol puede usarse directamente o mezclado con la gasolina en distintas proporciones. Aunque su contenido energético es un 66% menor que el de la gasolina, presenta un mayor índice de octano (106-108) que ésta (91-96), mayores velocidades de llama y calores de vaporización más altos (Zabed et al., 2017). Desde el punto de vista medioambiental, presenta múltiples ventajas frente a los combustibles fósiles al ser menos tóxico, fácilmente biodegradable y generar menos gases contaminantes (Mohd Azhar et al., 2017), ya que presenta una eficiencia de combustión 15% superior, debido a que el etanol contiene un 34,7% de oxígeno, que no está presente en la gasolina (Kar and Deveci, 2006).

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. Sin embargo, la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, el denominado bioetanol avanzado o de segunda generación, aún no se ha desarrollado comercialmente debido a su coste de producción relativamente alto comparado con los combustibles fósiles.

El etanol se obtiene principalmente por procesos bioquímicos, mediante la fermentación de azúcares con microorganismos. En el caso de la biomasa lignocelulósica, para lograr la solubilización de los azúcares fermentables, se requiere un pretratamiento para desestructurar el material y una hidrólisis de los carbohidratos, generalmente mediante enzimas. El requerimiento energético de los pretratamientos y el coste de las enzimas están entre los principales condicionantes para la viabilidad económica del proceso. En las últimas décadas, se ha dedicado un importante esfuerzo en investigación a nivel internacional para evaluar la producción de bioetanol a partir de distintas materias primas lignocelulósicas (Zabed et al., 2017), y se considera que el desarrollo comercial de esta tecnología está muy cercano, especialmente para residuos agrícolas. Sin embargo, aún es necesario un esfuerzo en investigación para abordar algunos retos que aún persisten, como el avance en técnicas de pretratamiento más avanzadas, el desarrollo de microorganismos estables para uso industrial, o la integración del proceso en el concepto de biorrefinería (Nair et al., 2016).

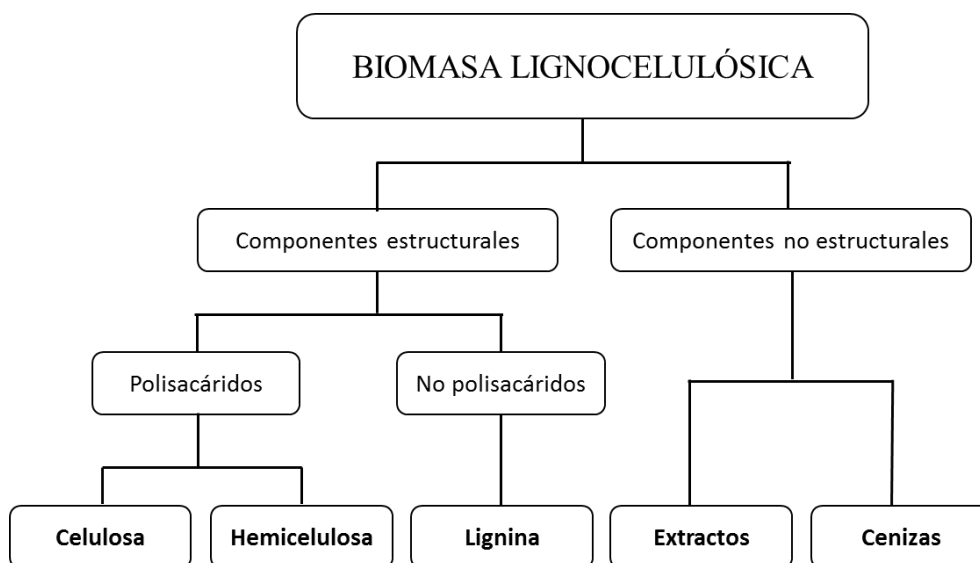
A nivel europeo, el grupo de expertos en biocarburantes avanzados, en su informe final (CE, 2017), considera que la única vía en la UE que puede asegurar, a corto y medio plazo, la utilización de combustibles sostenibles para descarbonizar el sector del transporte (y así cumplir sus compromisos del Acuerdo de París) es la industria de los

biocarburantes avanzados. Según sus estimaciones, el bioetanol de lignocelulosa puede contribuir entre un 3 y un 4,5 % a las necesidades energéticas del transporte en la UE en 2030, y el conjunto de los biocarburantes avanzados entre el 6 y el 9%. Para conseguir estos objetivos, es necesario un marco político y regulatorio apropiado para la próxima década, que se espera que se establezca a partir de la nueva directiva, así como un horizonte de planificación más allá de 2030 que ofrezca confianza a los inversores (CE, 2017).

La viabilidad de los procesos de obtención de bioetanol avanzado puede verse favorecida si se diversifican los productos que pueden obtenerse de la biomasa (Oh et al., 2018). En este sentido, se está haciendo un importante esfuerzo en investigación en el ámbito de las biorrefinerías, en las que se persigue una valorización en cascada de la biomasa, para la obtención de compuestos de alto valor añadido, como por ejemplo antioxidantes naturales, y otros productos de interés a partir de la lignina (Jin et al., 2018). Por otra parte, también se pueden conseguir sinergias con la integración entre procesos de producción de bioetanol de primera y segunda generación (Hahn-Hägerdal et al., 2006). En cualquier caso, las plantas industriales deben diseñarse teniendo en cuenta las variaciones de composición de la biomasa así como su disponibilidad de suministro (Neto et al., 2018).

## 2.3. COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Los componentes de los materiales lignocelulósicos se pueden clasificar en dos grupos: estructurales y no estructurales (Figura 2.2). Celulosa, hemicelulosa y lignina son los principales compuestos estructurales de la pared celular vegetal. La celulosa y la hemicelulosa son polímeros de azúcares de alto peso molecular, mientras que la lignina es un polímero no polisacárido formado por unidades de fenilpropano con una estructura tridimensional. La proporción entre los principales componentes estructurales de la biomasa es variable según el tipo de material. Generalmente, la pared primaria de las plantas está formada de microfibrillas de celulosa (9-25%), una matriz de hemicelulosas (25-50%), 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).



**Figura 2.2.** Componentes principales de la biomasa lignocelulósica

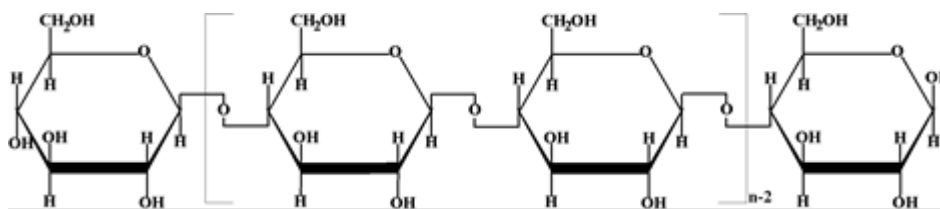
En función del tipo de biomasa, la proporción de los principales componentes lignocelulósicos varía. Así, en la Tabla 2.2 se muestran distintos ejemplos de la composición de diferentes materiales lignocelulósicos. Además de compuestos estructurales, en la biomasa también están presentes compuestos no estructurales como las cenizas y extractos.

**Tabla 2.2.** Ejemplos de composición de distintas biomásas (% peso seco)

	Materia Prima	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Referencia
Maderas	Pino	48,4	21,3	24,7	Safari et al., 2017
	Álamo	27,2	15,9	16,8	Duan et al., 2013
	Sauce	42,5	22,0	26,0	Sassner et al., 2008
	Abedul	40,3	19,5	20,3	Kallioinen et al., 2013
	Abeto	40,9	18,1	27,7	Kallioinen et al., 2013
	Eucalipto	44,7	17,1	27,7	Cunha et al., 2018
Subproductos agro-industriales	Bagazo de caña	41,2	20,2	22,0	Zhang et al., 2018
	Paja de trigo	42,8	25,0	19,8	Yuan et al., 2018
	Poda de olivo	25,1	18,8	18,5	Martínez-Patiño et al., 2017
	Paja de cebada	39,1	25,7	15,2	Duque et al., 2014
	Paja de colza	31,5	17,4	17,8	López-Linares et al., 2016
	Paja de arroz	31,9	15,3	22,0	Devendra y Pandey, 2016
	Rastrojo de maíz	34,8	19,0	21,0	Liu et al., 2018
	Hueso de aceituna	19,2	28,6	37,2	Lama-Muñoz et al., 2014
Cascarilla de arroz	36,0	12,0	27,0	Cabrera et al., 2014	

#### - Celulosa

La celulosa es la macromolécula más abundante del planeta siendo la base estructural de las células vegetales y representa entre 30% y 50% del peso total de la biomasa lignocelulósica. La celulosa es un homopolímero lineal y plano de unidades de D-glucosa en forma de piranos que se mantienen unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos, siendo el disacárido de celobiosa (4-0-( $\beta$ -D-glicopiranosil-D-glucopiranos) la unidad que se repite (Figura 2.3) (Zabed et al., 2016).



**Figura 2.3.** Estructura de la celulosa

Las fibras de celulosa están constituidas por unidades estructurales, llamadas microfibrillas, de aproximadamente 300 Å de largas y 150 Å de sección transversal. Cada microfibrilla contiene varias fibrillas elementales, estando estas formadas por grupos de moléculas lineales de celulosa. Los grupos OH del carbono 4 son capaces de interactuar entre sí o con otros átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre, originando puentes de hidrogeno. Algunas propiedades de la celulosa, como la longitud de las fibras y su cristalinidad, pueden ser diferentes según el tipo de biomasa. Por ejemplo las fibras son más cortas en maderas que en el caso de pajas de cereal, mientras que la cristalinidad es mayor en el caso de maderas (Liu y Sun, 2010).

La celulosa es muy insoluble en agua y disolventes orgánicos (etanol, benceno, cloroformo) y muy poco soluble en disoluciones diluidas de ácidos y álcalis, mientras que sí es muy soluble en ácidos concentrados (ácido sulfúrico al 72% o ácido clorhídrico al 44%) (Díaz et al., 2011a). Cuanto más ordenada y cristalina sea la estructura de la celulosa, esta será menos soluble y más difícil de degradar durante la hidrólisis.

#### - Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero heterogéneo que constituye generalmente entre un 15% y 35% del peso de la biomasa lignocelulósica y que puede estar formado por pentosas ( $\beta$ -D-xilosa,  $\alpha$ -L-arabinosa), hexosas ( $\beta$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa,  $\alpha$ -D galactosa) y ácidos urónicos (ácidos  $\alpha$ -D-glucurónico,  $\alpha$ -D-galacturónico y  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturónico). Otros azúcares como la  $\alpha$ -L-ramnosa y  $\alpha$ -L-fucosa pueden aparecer en pequeñas cantidades y los grupos hidroxilo de los azúcares pueden estar sustituidos parcialmente por grupos acetilo. Normalmente, la hemicelulosa tiene una estructura ramificada y amorfa y se encuentra rodeando a las fibras de celulosa, proporcionando la unión entre la celulosa y la lignina (Phitsuwan et al., 2013).

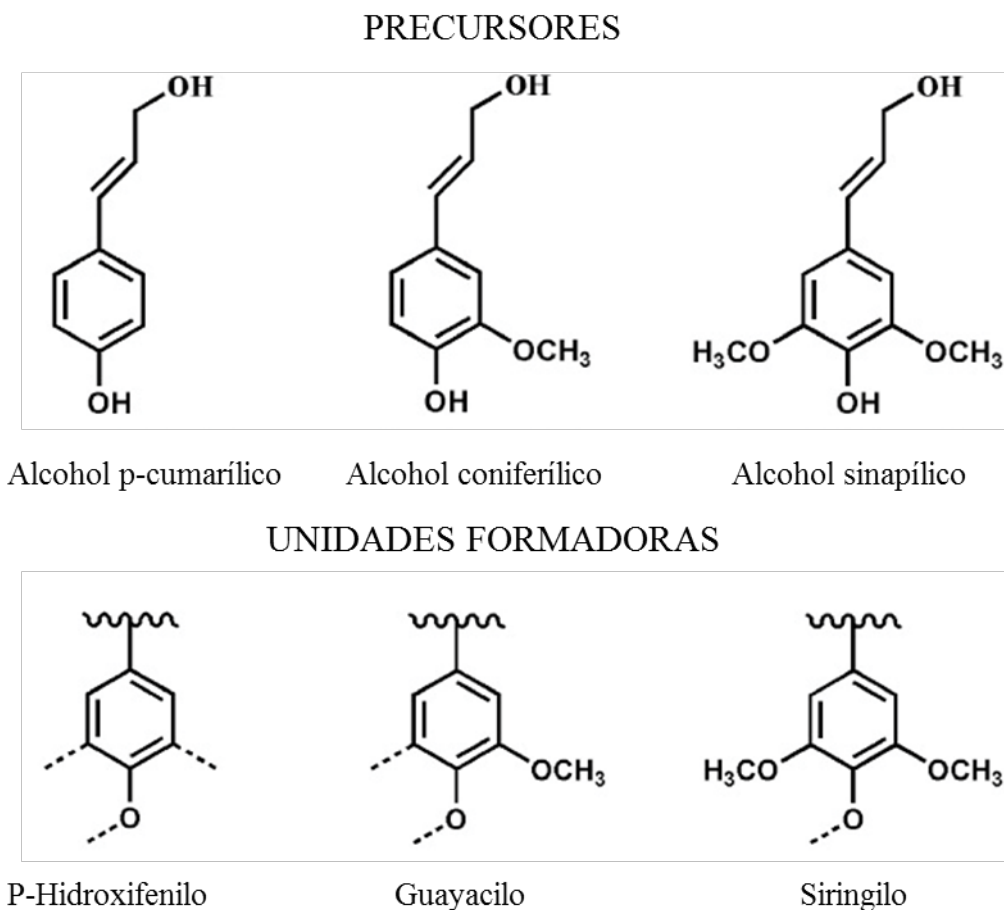
Las hemicelulosas más relevantes son los xilanos y los glucomananos, siendo los primeros los más abundantes (Gírio et al., 2010). En las maderas duras, el tipo de hemicelulosa más abundante es el glucuronoxilano (0-acetil-4-O-metilglucuronoxilano), representando entre 15% y 30% del peso seco total de la biomasa, con cantidades significativas de glucomananos (<5%). En las maderas blandas predominan los

galactoglucomananos (O-acetil-galactoglucomananos) suponiendo entre 20% y 25% del peso seco total, seguidos de los arabinoglucuronoxilanos (arabino-4-O-metilglucuronoxilanos) (5-10%). Estos últimos son la hemicelulosa predominante en los residuos agrícolas. La hemicelulosa es químicamente heterogénea con un grado de polimerización bajo, cadenas más cortas, y una baja cristalinidad con predominio de regiones amorfas, lo que hace que, a diferencia de la celulosa, sea soluble en ácidos inorgánicos diluidos y en álcalis a temperaturas altas (Pereira et al., 2008).

#### - Lignina

La lignina es un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano que se unen mediante diferentes tipos de enlaces alternados de manera desordenada dando lugar a una estructura altamente compleja. Esta fracción de la biomasa representa entre 10% y 30% del peso seco de la biomasa, siendo su proporción mayor en maderas blandas, seguidas de las maderas duras, residuos agrícolas y finalmente las herbáceas.

Tres alcoholes cinamílicos, que se diferencian por las sustituciones que presenta el anillo aromático, son los monómeros básicos precursores de las unidades formadoras de la lignina (Figura 2.4): el alcohol coniferílico, que presenta un grupo metoxilo en la posición 3 del anillo, da lugar a las unidades guayacilo (unidades G); el alcohol p-cumarílico, que no presenta ningún sustituyente, da lugar a las unidades p-hidroxifenilo (unidades H) y el alcohol sinapílico, que presenta dos grupos metoxilo en las posiciones 3 y 5, da lugar a las unidades siringilo (unidades S). Otros monómeros como coniferaldehído o los monolignoles acilados participan en las reacciones de acoplamiento que dan lugar a las macromoléculas de la lignina (Brett y Waldron, 1996).



**Figura 2.4.** Alcoholes precursores y unidades formadoras principales de la lignina (Yuan et al., 2013)

La gran dureza y rigidez de la pared celular vegetal se debe a la estructura heterogénea e irregular de la lignina, permitiendo la unión de las fibras de celulosa y hemicelulosa. Así, los tejidos lignificados resisten el ataque de los microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular.

La composición de la lignina varía según los tipos de biomasa. En las maderas blandas predominan las unidades tipo guayacilo mientras que en las maderas duras la lignina contiene principalmente unidades siringilo. La estructura de estas unidades hace que el grado de polimerización y condensación de la lignina sea menor en las maderas. En cambio, la biomasa herbácea contiene los tres tipos de unidades, H, G y S; haciendo que la complejidad y heterogeneidad de su lignina sea mayor que en las maderas. El grado de sustitución de los grupos alcohólicos está relacionado con el grado de entrecruzamiento, lo que condiciona la rigidez de la estructura (Doherty et al., 2011).

### - Compuestos no estructurales

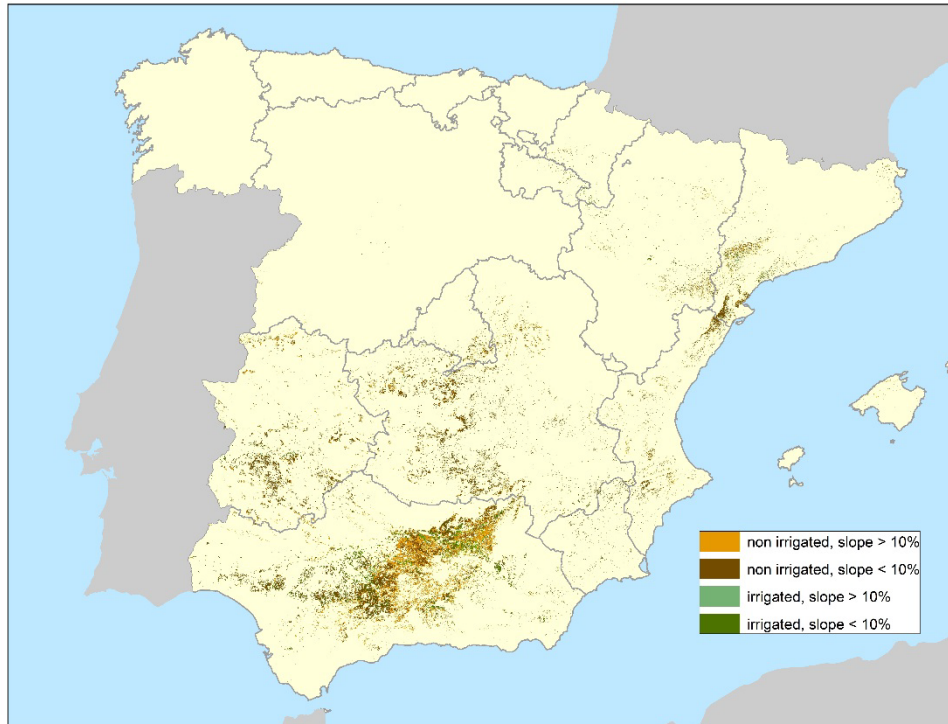
Dentro de este grupo se incluyen los extractos y cenizas, que en la biomasa lignocelulósica son fracciones minoritarias que no tienen una función estructural dentro de la pared celular. Por un lado, los extractos suponen entre un 4-10% del peso seco de la biomasa aunque en algunos casos puede alcanzar valores de hasta un tercio de total. Es un grupo bastante heterogéneo en el que se puede encontrar fenoles, proteínas, grasas, pectinas, resinas, gomas, alcaloides o terpenos, etc. Entre sus funciones están la de reservas de energía, intermediarios metabólicos o actuando como parte de mecanismos de defensa contra ataques microbianos. También son responsables del color y del olor de la planta (Rowell et al., 2013).

Por otro lado, las cenizas representan en torno al 1% del peso de la madera, mientras que alcanza valores mayores en plantas herbáceas. Contienen principalmente compuestos inorgánicos formados por elementos como calcio, potasio, magnesio o silicio que permanecen después de la incineración del material (Fenger y Wegener, 1983).

## 2.4. LA BIOMASA DE LA PODA DE OLIVO

La superficie de cultivo dedicada al olivar en el mundo en el año 2016 fue de 10.650.068 Ha, la mitad de ellas en países de la Unión Europea (5.028.637 Ha), entre los cuales España ocupa el primer lugar con 2.573.473 Ha, siendo el mayor productor de aceite de oliva del mundo y el país con un olivar más productivo (FAOSTAT, 2018).

El cultivo del olivar y la industria asociada a la producción de aceite de oliva generan una importante cantidad de residuos agroindustriales, como son la biomasa derivada de la poda del olivar (PO), los restos de hojas y ramas pequeñas que se separan de las aceitunas en las almazaras y el orujillo que queda como subproducto final una vez que se extrae el aceite de orujo en las extractoras. Se estima una producción anual de estos residuos en España superior a cuatro millones de toneladas, siendo el potencial de biomasa correspondiente a la poda de olivo el más importante, con unos tres millones de toneladas cada año (Manzanares et al., 2017). La mayor parte de la PO generada en España se concentra en Andalucía, principalmente en las provincias de Jaén y Córdoba (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Distribución geográfica de las áreas de cultivo de olivo en España potencialmente disponibles para la producción de biomasa de poda de olivo, sin considerar terrenos con pendientes superiores al 20 % ni cultivos mixtos o abandonados (Manzanares et al., 2017)

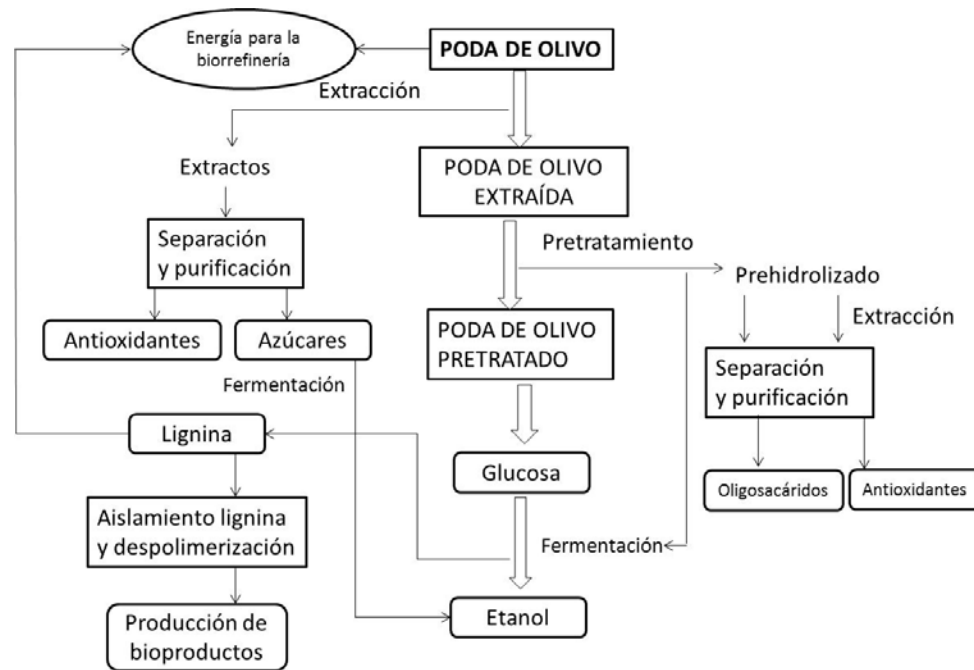
La poda del olivo es una operación agrícola que se realiza generalmente cada dos años, después de la cosecha de la aceituna (habitualmente entre los meses de febrero y abril) para eliminar las ramas menos productivas y preparar el árbol para la siguiente cosecha (Figura 2.6). La biomasa que se genera 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 (diámetro superior a 5 cm) (Romero-García et al., 2014). La leña suele emplearse para combustión en chimeneas domésticas o en pequeños hornos industriales, por ejemplo en panaderías, mientras que el resto (generalmente conocido como ramón de olivo) constituye un residuo agrícola sin aplicación viable en la actualidad. La eliminación de la PO del campo supone un coste importante para los agricultores, aproximadamente la mitad de ellos la eliminan por quema directa y el resto por trituración y esparcimiento en el terreno (La Cal et al., 2012).



**Figura 2.6.** Biomasa de poda de olivar

Existen estudios sobre los posibles efectos beneficiosos del esparcimiento de PO en el suelo para mejorar sus características y frenar la erosión (Calatrava y Franco, 2011; Rodríguez-Lizana et al., 2017). Sin embargo, esta práctica puede conllevar riesgos de inducción de enfermedades en el olivar, por la presencia de ciertas especies de hongos endófitos (Cohen et al., 2017). Por otra parte, el coste de esta práctica es generalmente superior al de la quema del residuo, especialmente en terrenos de difícil acceso para las máquinas trituradoras. Por ello, la combustión directa del ramón en el propio olivar, a pesar de que conlleva la emisión de importantes cantidades de CO<sub>2</sub> y de partículas, es una práctica aún muy extendida, aunque está restringida a determinados periodos y debe someterse a un control riguroso, por el posible riesgo de incendios favorecidos por el viento (La Cal et al., 2012). Por todo ello, el estudio de alternativas de valorización para la PO resulta de gran interés desde el punto de vista medioambiental, social y económico.

Los principales componentes de la biomasa de poda de olivo son la celulosa (22-37%), hemicelulosa (15-25%) y lignina (17-28%). También presenta un elevado contenido en extractos (14-31%), en los que hay una importante cantidad de glucosa soluble y compuestos fenólicos (Romero-García et al., 2014; Manzanares et al., 2017). La PO ha sido investigada como materia prima para la obtención de bioetanol y otros compuestos de interés, en el contexto de una biorrefinería (Negro et al., 2017; Ruiz et al., 2017b). En la Figura 2.7 se muestra un esquema simplificado de una posible biorrefinería basada en la PO.



**Figura 2.7.** Diagrama de flujo simplificado para una biorrefinería basada en la biomasa de la poda del olivar

Las investigaciones realizadas han demostrado que resulta conveniente una primera etapa de extracción acuosa para retirar la mayor parte de la fracción de extractos, y así mejorar las recuperaciones globales de azúcares del proceso, al evitarse reacciones de recondensación de la lignina (Ballesteros et al., 2011). Hay diferentes estudios que demuestran la presencia de compuestos bioactivos en extractos de hojas de olivo (Rahmanian et al., 2015) y madera de olivo (Salido et al., 2015), por lo que la valorización de la fracción de extractos de la PO puede resultar de gran interés en el contexto de la biorrefinería.

La etapa de pretratamiento de la biomasa, necesaria para que la celulosa quede accesible a la sacarificación enzimática posterior, es una de las que más afectan a la viabilidad 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). Con la PO, se han ensayado distintos pretratamientos, como la explosión por vapor (Ballesteros et al., 2011), agua caliente a presión (Cara et al., 2007), organosolvente (Díaz et al., 2011b),  $\text{FeCl}_3$  (López-Linares et al., 2013) o prehidrólisis ácida (Cara et al., 2008). Sin embargo, en la mayor parte de los trabajos mencionados se utilizó como materia prima PO sin extracción previa.

Las condiciones de operación de los distintos pretratamientos estudiados se han optimizado con un doble objetivo: que en el material sólido pretratado quede la mayor parte de la celulosa accesible a la posterior sacarificación enzimática y, que en los

prehidrolizados líquidos se recupere una elevada proporción de los azúcares hemicelulósicos presentes en la materia prima. En los resultados obtenidos se ha detectado la dificultad de optimizar simultáneamente ambos objetivos, ya que en las condiciones más severas que se requieren para obtener altos rendimientos de hidrólisis enzimática se producen pérdidas significativas de azúcares hemicelulósicos por degradación. De entre los pretratamientos ensayados, el más efectivo para conseguir la mayor recuperación global de azúcares de la PO, considerando ambas fracciones, resultó ser la prehidrólisis ácida con ácido sulfúrico (Cara et al., 2008).

Por otra parte, como se observa en la Figura 3, también se han identificado bioproductos de interés en los prehidrolizados que pueden obtenerse de forma integrada con el proceso principal de producción de etanol, como es el caso de los compuestos con elevada actividad antioxidante (Conde et al., 2009) o los oligosacáridos (Cara et al., 2012), que tras un proceso de purificación y fraccionamiento, presentan propiedades prebióticas (Ruiz et al., 2017a). Asimismo, el residuo final, formado mayoritariamente por lignina, podría constituir la fuente de suministro energético que requiere la biorrefinería, o bien, investigarse para la obtención de biomateriales y compuestos químicos de alto valor añadido (Toledano et al., 2011).

La presente tesis doctoral supone un avance respecto de las investigaciones previas, especialmente dirigido a la profundización en la etapa de pretratamiento y a la obtención de etanol a partir de los azúcares solubilizados con microorganismos no convencionales capaces de fermentar hexosas y pentosas. También se ha abordado el estudio de la etapa de extracción mediante la técnica de ultrasonidos. En cuanto a pretratamientos, se ha realizado la optimización de la prehidrólisis con ácido sulfúrico diluido sobre poda de olivo extraída (con distintas cargas de sólidos), se ha ensayado la prehidrólisis con ácido fosfórico, el pretratamiento biológico con hongos así como la combinación de distintas etapas de pretratamiento, incluyendo la deslignificación alcalina, con el objetivo de incrementar los rendimientos globales del proceso.

## 2.5. FRACCIONAMIENTO Y CONVERSIÓN BIOLÓGICA A ETANOL

En el proceso de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica generalmente hay tres etapas principales: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación. Debido a la composición de la poda de olivo, con un alto contenido en extractos (aproximadamente una cuarta parte), a diferencia de otros residuos agrícolas en los que el contenido en extractos es mucho menor, se propone la realización de una etapa previa de extracción. Esta primera etapa permite el aprovechamiento y valorización de la fracción de extractos que contiene compuestos con un alto valor añadido. Esto permite avanzar hacia el concepto de biorrefinería que nos permite obtener diferentes productos a partir de una materia prima, aprovechando todos los componentes que la forman. La eliminación de los extractos en esta etapa previa, permite que estos no interfieran en las siguientes etapas, consiguiendo mejores rendimientos de hidrólisis enzimática y mejorando la fermentabilidad de los hidrolizados (Martínez-Patiño et al., 2015). Por otra parte, debido a la formación de inhibidores durante el pretratamiento, se requiere una etapa de acondicionamiento de los prehidrolizados antes de la fermentación.

### 2.5.1. Extracción

Los residuos agroindustriales pueden ser una fuente importante de compuestos fenólicos que pueden ser utilizados en una amplia variedad de aplicaciones, especialmente aquellas relacionadas con la actividad biológica, como por ejemplo actividad antioxidante.

Las técnicas convencionales para la extracción de compuestos bioactivos incluyen la maceración y la extracción con soxhlet. Estos métodos han sido asociados con un alto

consumo de disolventes orgánicos y largos tiempos de extracción lo que implica altos consumos energéticos y por lo tanto, un incremento en el coste (Xu et al., 2017). La implementación de nuevas técnicas de extracción usando diferentes mecanismos con el objetivo de reducir el tiempo de extracción y el consumo de energía se puede traducir en un coste final más bajo en el proceso de obtención de estos compuestos (Zekovic et al., 2017). El aspecto común de estas tecnologías es que son más sostenibles porque protegen el medioambiente y la salud de los consumidores y mejoran la economía y competitividad de las industrias. Entre ellas se encuentran la extracción asistida por ultrasonidos, extracción asistida por microondas, extracción con fluidos supercríticos y extracción acelerada con disolventes. En la Tabla 2.3 se exponen las principales ventajas y desventajas de los métodos convencionales y las nuevas tecnologías de extracción.

**Tabla 2.3.** Ventajas e inconvenientes de las técnicas convencionales y nuevas tecnologías de extracción (Chemat et al., 2011)

Método	Ventajas	Desventajas
<i>Técnicas convencionales de extracción</i>		
Agitación mecánica	-No usa equipamiento sofisticado	-A altas temperaturas, posible degradación de compuestos termolábiles -Se requiere una etapa de filtración -Riesgo de derrames -Riesgo de formación de vapores orgánicos
Soxhlet	-No usa equipamiento sofisticado	-Degradación de compuestos termolábiles -Formación de vapores orgánicos
<i>Nuevas tecnologías de extracción</i>		
Ultrasonidos	-Fácil de manejar y seguro (presión atmosférica y temperatura ambiente) -Uso moderado de disolvente -Reproducible	-Requiere una etapa de filtración -Posible degradación de compuestos a altas frecuencias
Microondas	-Rápido -Fácil de manejar -Uso moderado de disolvente	-Riesgo de explosión (el disolvente debe absorber la potencia del microondas) -Caro -Requiere una etapa de filtración
Fluidos supercríticos	-Rápido -No es necesaria una etapa de filtración -Alta selectividad	-Muchos parámetros a optimizar
Extracción acelerada con disolventes	-Rápido -Seguro -No es necesaria una filtración	-Posible degradación de compuestos termolábiles

#### 2.5.1.1. Extracción asistida por ultrasonidos

Las ondas ultrasónicas son aquellas que tienen frecuencias por encima del rango de las ondas audibles (>20 kHz) y por debajo de las ondas microondas (mayores a 10

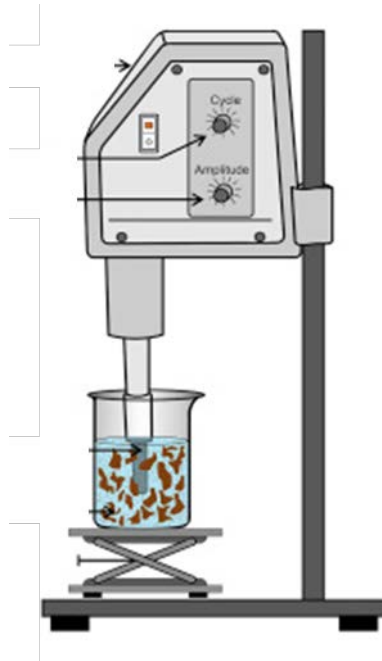
MHz). Los ultrasonidos pueden ser clasificados como sonicación de baja intensidad ( $<1 \text{ W/cm}^2$ ) o sonicación de alta intensidad ( $10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$ ).

Varios fenómenos físicos y químicos incluidos la agitación, la vibración, la presión, las ondas de choque, las fuerzas de cizalladura, las microcorrientes, la compresión y rarefacción, las corrientes acústicas, la cavitación y la formación de radicales son responsables del efecto de los ultrasonidos (Tiwari, 2015). Los efectos físicos y químicos de los ultrasonidos están asociados con la frecuencia, por ejemplo, los efectos físicos dominan a bajas frecuencias (20-100 kHz), mientras que los efectos químicos dominan a frecuencias de 200-500 kHz. A frecuencias más altas ( $> 1 \text{ MHz}$ ) los efectos dominantes son debidos a las corrientes acústicas.

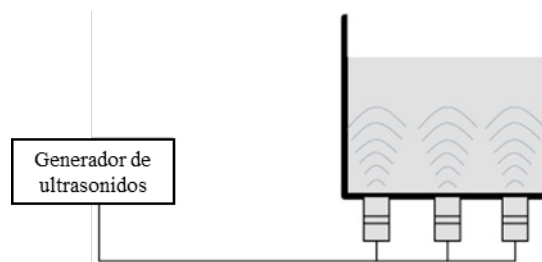
Cuando los ultrasonidos se propagan a través de un medio, inducen una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del medio. Cada cambio de presión causa la formación y finalmente, el colapso de las burbujas en el medio líquido. Este fenómeno de creación, expansión e implosión de las microburbujas en líquidos irradiados con ultrasonidos es conocido como cavitación acústica (Chemat et al., 2017). Este es el principal fenómeno causante de la extracción durante la sonicación. Durante el colapso violento de las burbujas de cavitación se generan cambios de temperatura y presión a nivel microscópico que provocan el adelgazamiento y rotura de la membrana celular y por lo tanto, una mejor penetración del disolvente en las células y una mejor transferencia de materia de los compuestos objetivo en el disolvente. La implosión de las burbujas de cavitación también genera turbulencia a un nivel microscópico, colisiones a alta velocidad entre partículas y agitación en microporos de la matriz que acelera la difusión. Las ondas ultrasónicas también facilitan la hidratación y aumento de tamaño de la matriz con el alargamiento de los poros que incrementa la difusión del disolvente dentro de la matriz y mejora la transferencia de materia (Toma et al., 2001). La capacidad de los ultrasonidos de provocar cavitación depende de sus características (frecuencia e intensidad), propiedades del medio (viscosidad y tensión superficial) y condiciones ambientales (temperatura y presión) (Tiwari, 2015).

Otro de los fenómenos causantes de la extracción asistida con ultrasonidos es la formación de radicales (Roselló-Soto et al., 2015). Bajo condiciones extremas de temperatura y presión que se alcanzan a nivel microscópico durante el colapso de las burbujas, se generan radicales libres que son los responsables de los efectos químicos de los ultrasonidos. Por ejemplo, si el medio es agua, se generan radicales  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$  por disociación del agua. Esos radicales libres son químicamente reactivos y pueden causar daños en cualquier célula con la que entren en contacto (Henglein y Kormann, 1985). Estos radicales primarios pueden inducir una amplia variedad de reacciones químicas incluidas la degradación de los compuestos que queremos extraer.

Las dos clases más importantes de equipos usados para la extracción asistida por ultrasonidos son el sistema tipo sonda (Figura 2.8) y el baño de ultrasonidos (Figura 2.9). El equipo más adecuado para cada caso dependerá de las características de la matriz, del disolvente y de los objetivos de la extracción (Khemakhem et al., 2017). En el baño de ultrasonidos, el transductor no está en contacto con la muestra. Con el sistema de ultrasonidos, tipo sonda, la energía es directamente aplicada en la muestra por lo que la pérdida de energía es mínima.



**Figura 2.8.** Esquema de sistema de ultrasonidos tipo sonda



**Figura 2.9.** Esquema de baño de ultrasonidos

Los principales parámetros del proceso de extracción con ultrasonidos, aparte de la selección del reactor, son la frecuencia, la potencia o intensidad aplicada, tiempo de extracción, la temperatura, el tipo de disolvente, la relación sólido-líquido. En la Tabla 2.4 se muestran los factores clave de cada uno de estos parámetros

**Tabla 2.4.** Parámetros que influyen en la extracción asistida con ultrasonidos  
(Tiwari, 2015)

Parámetro	Factores clave
Amplitud, intensidad y potencia	-Amplitudes altas mejoran la agitación -Amplitudes altas reducen la formación de cavitación -Altas intensidades pueden provocar la degradación de los compuestos extraídos
Frecuencia	-Las frecuencias normalmente usadas restringen la formación de burbujas y deben de ser seleccionadas en conjunto con la intensidad para obtener la cavitación deseada -Muchos sistemas trabajan a una frecuencia fija -Rendimientos de extracción altos se han alcanzado a bajas frecuencias (20-40 kHz)
Temperatura	-Temperaturas altas ayudan a la interacción entre la matriz y el disolvente
Tiempo	-Tiempos largos mejoran los rendimientos de extracción -Tiempos largos pueden producir cambios indeseados en los compuestos extraídos
Propiedades del disolvente	-Disolventes viscosos reducen la cavitación -Disolventes volátiles pueden evaporarse si la extracción se realiza a altas temperaturas durante largos periodos -Polaridad y solubilidad de los compuestos objetivo en el disolvente -La presión de vapor y la tensión superficial influyen en la cavitación
Matriz	-Tamaño de partícula -Interacción entre el disolvente y la matriz -Relación entre el disolvente y la matriz

#### 2.5.1.2. Compuestos antioxidantes

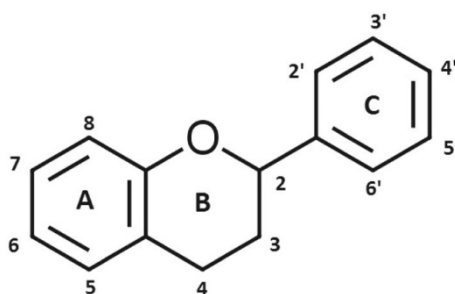
Un antioxidante se puede definir como cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente biomoléculas. En la industria alimentaria se usan como aditivos que aumentan la vida media de los alimentos protegiéndolos contra su deterioro por oxidación. Los antioxidantes pueden ser de origen sintético como la terbutilhidroquinona (TBHQ, E319), el butilhidroxianisol (BHA, E320) o el butilhidroxitolueno (BHT, E321), o bien de origen natural. En los últimos años, hay un gran interés en la industria para sustituir antioxidantes sintéticos por naturales ya que presentan capacidades antioxidantes similares o superiores y además muestran efectos adicionales beneficiosos para la salud (Gullón et al., 2017).

Los antioxidantes incluyen diferentes clases de compuestos que pueden interferir en los ciclos de oxidación al inhibir o retardar el daño por oxidación de las biomoléculas (Oroian y Escriche, 2015). Las principales clases de compuestos con actividad antioxidante son las vitaminas (C y E), los carotenoides y los polifenoles.

Los compuestos fenólicos son la fuente más importante de compuestos bioactivos de la dieta humana estando presentes en los extractos de frutas, vegetales, cereales y legumbres. Se caracterizan por la presencia de uno o varios grupos hidroxilo (-OH) unidos a un anillo aromático de seis átomos de carbono, que se puede encontrar como glucósidos libres y formas glucosídicas, y esto significa que están vinculados a azúcares como la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa (Medina-Torres et al., 2017). Estos compuestos son muy sensibles a varios factores ambientales, como el calor o la luz y también muestran baja solubilidad en agua en su forma libre que contribuye a su falta de estabilidad a tiempos largos.

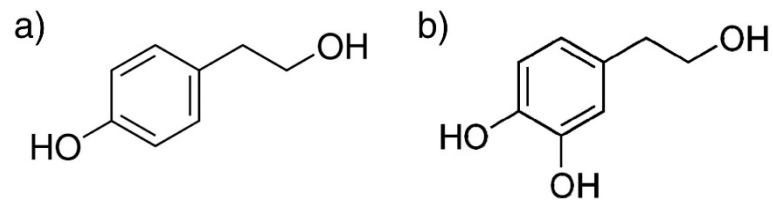
Los compuestos fenólicos se dividen en varios grupos en función de su estructura química. El número y la posición de grupos hidroxilo, la glicosilación y otras sustituciones como la metoxilación determinan la actividad de secuestro de radicales por los compuestos fenólicos. Se clasifican en:

- Flavonoides formados por dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado, se dividen a su vez en varios subgrupos a partir de sus variaciones estructurales, como por ejemplo las flavonas (ej: luteolina o rutina); flavonoles (ej: quercetina); flavanonas (ej: narigenina); flavanoles (ej: epicatequina); antocianinas (ej: cianidina) e isoflavonas. (ej: daidzeina o genisteina). Además de su poder antioxidante, algunos de estos compuestos tienen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas o neuroprotectoras (Caridi et al., 2007; Rodrigo et al., 2012; Sagrera et al., 2011; Yu et al., 2012).



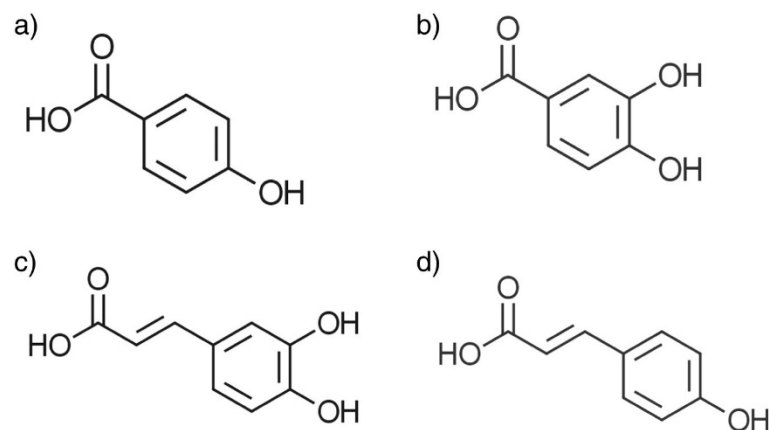
**Figura 2.10.** Estructura química de un flavonoide

- Alcoholes fenólicos, como tirosol e hidroxitirosol, que además de ser compuestos antioxidantes tienen propiedades de regulación del colesterol (LDL) (Ilavarasi et al., 2011; Kulawik et al., 2013).



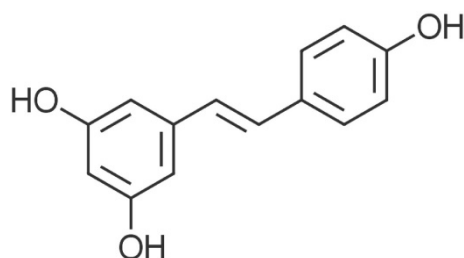
**Figura 2.11.** Alcoholes fenólicos: a) tirosol y b) hidroxitirosol

- Ácidos fenólicos que, a su vez, se subdividen en los derivados del ácido benzoico (ej: ácido gálico) y del ácido cinámico (ej: ácido cafeico). También presentan actividad antiinflamatoria y antimicrobiana junto con su alta capacidad antioxidante (Lima et al., 2014).



**Figura 2.12.** Ácidos fenólicos: a) Ácido p-hidroxibenzoico; b) Ácido 3,4-dihidroxidobenzoico; c) Ácido cafeico y d) Ácido p-cumárico

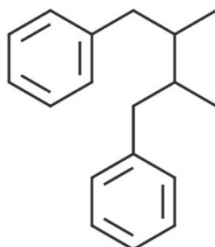
- Estilbenos: existen en forma monomérica (ej: resveratrol) u oligomérica. Presentan propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antimicrobianas (Frombaum et al., 2012).



**Figura 2.13.** Estilbenos: trans-resveratrol

- Taninos con masas moleculares que pueden ser superiores a los 30000 Da; se pueden dividir en hidrosolubles y condensados. Tienen una gran variedad de propiedades entre las que destacan las antiinflamatorias, antimutagénicas o antimicrobianas (Landete, 2011).

- Lignanós, presentan una elevada diversidad de estructuras aunque todas poseen la característica común de estar formadas por dos unidades de fenil-propapano enlazadas por el átomo central de sus cadenas laterales. Junto con sus propiedades antioxidantes, destacan sus propiedades hepatoprotectoras, antivirales y antihipertensivas (Fang et al., 2014).



**2.14.** Estructura química de los lignanos

### 2.5.2. Pretratamiento

Es una etapa clave del proceso de aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica. El objetivo global es alterar la compleja estructura de la biomasa, facilitando la acción de las enzimas en la siguiente etapa (Tahezadeh y Karimi, 2008). Partiendo de que cada materia prima tiene características físico-químicas distintas, se deberá escoger el pretratamiento en función de esas propiedades y de los objetivos del proceso. Además, la selección de un determinado pretratamiento tiene un importante impacto en las siguientes etapas del proceso en aspectos como la digestibilidad de la celulosa, la generación de compuestos tóxicos en los hidrolizados, requerimientos de agitación, la demanda de energía y la necesidad de tratamiento de las aguas residuales generadas en el mismo.

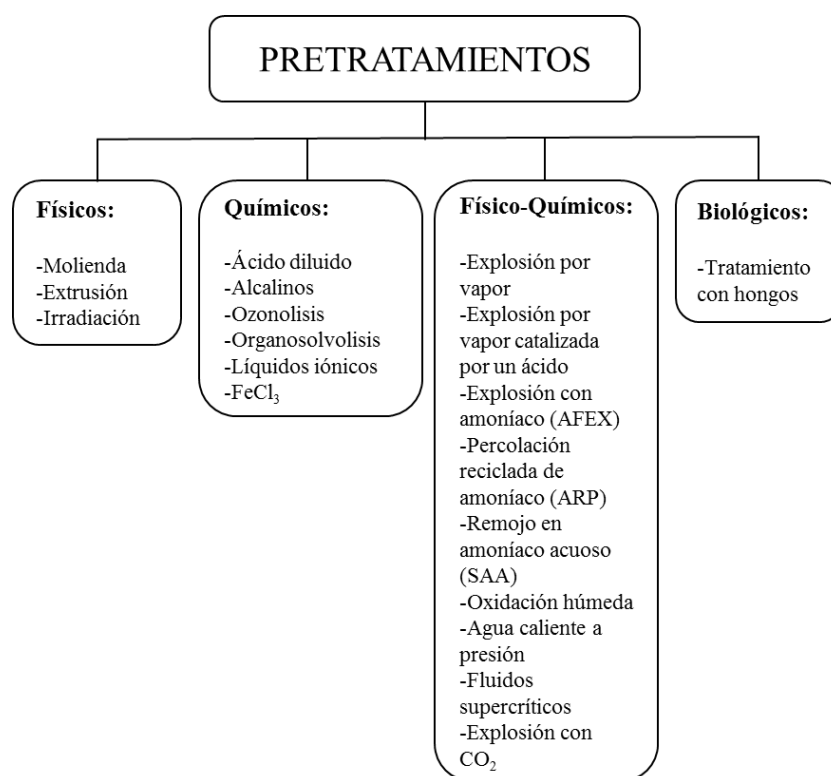
Las principales características que debe tener un pretratamiento para el proceso de producción de etanol son (Alvira et al., 2010; Zabed et al., 2016):

- Obtener sólidos con alta digestibilidad de celulosa.
- Evitar una degradación significativa de azúcares.
- Generar la menor cantidad posible de compuestos tóxicos.
- No requerir una reducción del tamaño de la biomasa.
- Operar con reactores de un tamaño razonable y de coste moderado.
- No generar residuos sólidos.
- Trabajar con altas cargas de biomasa.

- Obtener hidrolizados con una alta concentración de azúcares.
- Recuperación y valorización de la lignina.
- Bajos requerimientos de energía y calefacción.

Según su naturaleza, los pretratamientos capaces de alterar la estructura de los materiales lignocelulósicos pueden clasificarse en cuatro grandes grupos, físicos, químicos, físico-químicos o biológicos (Figura 2.15). Estos a su vez pueden combinarse, es decir, aplicar varios pretratamientos a una misma biomasa en varias etapas.

A continuación se describen los pretratamientos aplicados durante la realización de esta tesis doctoral.



**Figura 2.15.** Clasificación de distintos pretratamientos

- Pretratamiento ácido

El principal objetivo de este pretratamiento es solubilizar la fracción de hemicelulosa de la biomasa y hacer más accesible la celulosa a las enzimas. Este tipo de pretratamiento puede realizarse con ácido concentrado o diluido. El uso de ácido concentrado presenta problemas de corrosión en los equipos y su alto coste de mantenimiento y operación reducen el interés de aplicar esta modalidad a nivel comercial (Jung y Kim, 2014). En cambio, el pretratamiento con ácido diluido es un método más favorable para una aplicación industrial y ha sido estudiado para pretratar una amplia

variedad de biomásas lignocelulósicas. Este pretratamiento se puede realizar a altas temperaturas (180°C) durante cortos periodos de tiempo, o a bajas temperaturas con largos tiempos de pretratamiento (30-90 min). Presenta la ventaja de hidrolizar la hemicelulosa, principalmente los xilanos, convirtiendo así la hemicelulosa solubilizada en azúcares fermentables en forma de monómeros. Además, el pretratamiento ácido produce la alteración estructural de la lignina y consigue una reducción del grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa. El aumento del área superficial y porosidad de la biomasa lignocelulósica facilita la etapa posterior de hidrólisis enzimática. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de pretratamiento, pueden aparecer compuestos inhibidores como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) debido a la degradación de los azúcares y compuestos fenólicos derivados de la degradación de la lignina, que pueden afectar al metabolismo de los microorganismos en la etapa de fermentación (Zabed et al., 2016). Otros inconvenientes de este pretratamiento son el elevado coste de los materiales necesarios para la construcción de los equipos o la necesidad de neutralización y acondicionamiento de los hidrolizados antes de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación.

El ácido sulfúrico es el ácido más empleado como catalizador en el pretratamiento ácido de residuos lignocelulósicos (Martínez-Patiño et al., 2017). Algunas de sus ventajas son su alta disponibilidad y bajo coste. También se han empleado otros ácidos como el ácido fosfórico, ácido clorhídrico o ácido nítrico para estudiar el pretratamiento ácido de diferentes biomásas. El ácido fosfórico a pesar de su mayor coste presenta algunas ventajas como su menor corrosión y toxicidad y por ser una fuente de fósforo que puede ser utilizado como nutriente por los microorganismos en la etapa de fermentación (Castro et al., 2014).

#### - Agua caliente a presión

El pretratamiento de agua caliente a presión o autohidrólisis es un pretratamiento físico-químico que no emplea ningún catalizador o compuesto químico. Su objetivo es solubilizar la hemicelulosa y hacer la celulosa más accesible al ataque de las enzimas, evitando la formación de inhibidores (Alvira et al., 2010). Este pretratamiento hidrotérmico combina fuerzas mecánicas que se generan debido a la presión que se produce al mantener agua en estado líquido a elevadas temperaturas (160°-240°C) provocando alteraciones en la estructura lignocelulósica y efectos químicos debido a la hidrólisis de los grupos acetilo presentes en la hemicelulosa (autohidrólisis). Esta autohidrólisis tiene lugar cuando las altas temperaturas provocan la formación de ácido acético, a partir de los grupos acetilo que forman parte de la estructura de la hemicelulosa, y además el agua puede actuar como ácido a altas temperaturas.

Una vez acabado el pretratamiento se obtienen dos fracciones: una sólida con una mayor proporción de celulosa y una fracción líquida rica en azúcares hemicelulósicos, generalmente en forma oligomérica. Para evitar la formación de compuestos inhibidores, el pH debe mantenerse entre 4 y 7 durante el pretratamiento porque en esos niveles de pH los azúcares hemicelulósicos se mantienen en forma oligomérica y la formación de productos de degradación es más baja (Mosier et al., 2005).

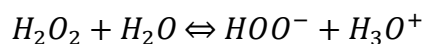
La principal ventaja de este pretratamiento es el potencial ahorro de costes respecto a otros pretratamientos al no requerir el empleo de un catalizador y porque el coste del reactor es menor ya que no presenta grandes problemas de corrosión. Otra ventaja es una menor generación de compuestos inhibidores que en el caso de los pretratamientos ácidos (Cara et al., 2007). No obstante, hay que tener presente que en muchas condiciones los azúcares se obtienen en forma oligomérica.

#### - Pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrogeno en medio alcalino

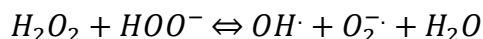
Los pretratamientos alcalinos incrementan la digestibilidad de la celulosa y solubilizan de manera efectiva la lignina, mostrando una menor solubilización de la celulosa y hemicelulosa que los pretratamientos hidrotérmicos o ácidos (Carvalho et al., 2008). Se trata de un pretratamiento que puede realizarse a temperatura ambiente y con tiempos que van desde minutos hasta días. Los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio son las bases más empleadas en los pretratamientos alcalinos. La sosa causa esponjamiento en la biomasa, incrementando la superficie interna de la celulosa y disminuyendo su grado de polimerización y cristalinidad, lo que provoca la ruptura de la estructura de la lignina (Taherzadeh y Karimi, 2008).

En muchos casos, el pretratamiento alcalino se combina con la adición de un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno que es un compuesto altamente reactivo y un poderoso oxidante, que no es inflamable y es miscible con agua en todas las proporciones (Dutra et al., 2018). Ha sido un compuesto usado durante mucho tiempo en la industria de la celulosa y el papel como agente blanqueante y en el tratamiento de efluentes como reactivo en procesos avanzados de oxidación.

El uso de peróxido de hidrogeno para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica se basa en las reacciones que este oxidante produce en medio alcalino. La disociación del peróxido de hidrógeno genera un anión hidroperóxido ( $\text{HOO}^-$ ) (Gould, 1985):



En medio alcalino, el anión hidroperóxido puede reaccionar con  $H_2O_2$ , dando lugar a la formación de radicales hidroxil y superóxido.



Estos radicales reaccionan con la presencia de otros compuestos y, en su ausencia se combinan y generan oxígeno y agua. Los radicales que se generan por la descomposición del peróxido de hidrógeno en medio alcalino atacan principalmente a la lignina, aunque también pueden producir cambios físicos y morfológicos en las fibras de celulosa (Wang et al., 2010).

Los principales parámetros a tener en cuenta en este pretratamiento son el pH, la temperatura, la concentración de peróxido, la concentración de sólido y el tiempo de pretratamiento (Li et al., 2016). Las principales ventajas son el bajo consumo de energía, la no generación de inhibidores que provengan de la degradación de los azúcares, la fácil disponibilidad de peróxido de hidrógeno y del agente alcalino, el no usar reactores con requerimientos especiales y su compatibilidad con el empleo de altas cargas de biomasa. Entre sus desventajas se encuentra el alto pH al que se encuentra la biomasa, lo que implica un lavado de la fracción sólida hasta pH neutro usando grandes volúmenes de agua. Además, el alto coste de los reactivos y la generación de inhibidores por la degradación de la lignina son otros inconvenientes de este pretratamiento (Dutra et al., 2018).

#### - Pretratamiento biológico

Este pretratamiento emplea microorganismos, principalmente hongos de podredumbre blanca, marrón o blanda, que son capaces de degradar los principales componentes que forman la biomasa lignocelulósica (Deswal et al., 2014). Los hongos de podredumbre marrón atacan fuertemente la holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) con una pequeña alteración en la estructura de la lignina, mientras que los de podredumbre blanca y blanda degradan tanto las cadenas de carbohidratos como la lignina, mostrando algunos de ellos una mayor selectividad hacia la degradación de lignina con respecto a la celulosa.

Los hongos de podredumbre blanca han sido los más estudiados para el pretratamiento biológico de residuos lignocelulósicos debido a su capacidad para degradar lignina (Ishola et al., 2014). Estos hongos tienen un sistema enzimático único y durante el metabolismo secundario, en respuesta a limitaciones de carbono y nitrógeno, producen diversas enzimas celulolíticas y ligninolíticas. La degradación de la lignina se atribuye a tres enzimas principales, lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa

(MnP) y lacasa (Lac), aunque producen otras enzimas generadoras de peróxido de hidrogeno capaces también de degradar lignina (Wan y Li, 2012). No obstante, cabe indicar que no todos los hongos de podredumbre blanca producen todas esas enzimas.

Los principales parámetros que afectan al pretratamiento biológico son el tipo de biomasa, la temperatura y el tiempo de incubación, la humedad, el tipo de hongo, la aireación, el pH, el tamaño de partícula de la biomasa o la concentración inicial de inóculo (Sindhu et al., 2016).

En comparación con los pretratamientos más usados para la producción de bioetanol (explosión de vapor, autohidrólisis, con ácido diluido o alcalino), el pretratamiento con hongos es considerado más respetuoso con el medio ambiente, ya que no usa compuestos químicos y presenta menores requerimientos energéticos que el resto de pretratamientos debido a las suaves condiciones ambientales en las que se produce. Además, emplea equipamientos que no requieren una alta inversión (no corrosión, no presión) y evita la formación de compuestos inhibidores (García-Torreiro et al., 2016; Salvachúa et al., 2011). Los principales inconvenientes son la pérdida de carbohidratos durante el pretratamiento junto con una tasa de hidrólisis demasiado lenta en comparación con otras tecnologías.

Una estrategia para superar alguno de estos inconvenientes sería la de combinar un pretratamiento biológico con otro químico o físico. En la Tabla 2.5 se muestran ejemplos de pretratamientos secuenciales, en dos etapas, en los que se combina una primera etapa biológica con pretratamientos de distinta naturaleza en una segunda etapa

**Tabla 2.5.** Ejemplos de combinación de pretratamiento biológico (PB) y otro físico o químico

Estrategia	Biomasa	Referencia
PB + ácido	Poda de olivo	Martín-Sampedro et al., 2017
PB+ alcalino	Tallos de maíz	Zhong et al., 2011
PB+ explosión por vapor	Paja de arroz	Taniguchi et al., 2010
PB+ organosolvente	<i>Pinus radiata</i>	Monrroy et al., 2010
PB + autohidrólisis	Eucalipto	Martín-Sampedro et al., 2015
PB+FeCl <sub>3</sub>	Álamo	W. Wang et al., 2013
Ultrasound+PB	Haya	Kadimaliev et al., 2003

Un ejemplo de pretratamiento combinado es la suma de una etapa biológica más una etapa con ácido diluido que presenta entre sus ventajas una reducción en la generación de compuestos tóxicos con respecto a realizar el pretratamiento ácido solo, ya que las condiciones en la etapa ácida necesarias para obtener similares rendimientos son más suaves. Generalmente, la configuración en la que se realiza primero la etapa biológica

seguida de una etapa ácida consigue mejores resultados que al realizarlos a la inversa (Shirkavand et al., 2016).

### 2.5.3. Hidrólisis enzimática

Tras el pretratamiento, la fracción sólida resultante tendrá una composición diferente en función de tipo de pretratamiento que se haya aplicado al material lignocelulósico. El objetivo de esta etapa de hidrólisis es transformar los oligómeros que conforman la celulosa y la hemicelulosa que aún permanezca en la fracción sólida en monómeros.

La hidrolisis enzimática se considera un proceso efectivo debido a la especificidad de las enzimas, las temperaturas de trabajo relativamente bajas y la mínima generación de compuestos inhibidores. Sin embargo, el coste de las enzimas es un desafío para la producción de etanol a escala comercial (Zabed et al., 2016). Además, los rendimientos de hidrólisis enzimática con los cócteles actuales son inferiores al máximo teórico debido a la elevada cristalinidad de la celulosa y a la protección que ejercen la lignina y la hemicelulosa sobre la celulosa. Los principales sistemas enzimáticos usan celulasas y hemicelulasas.

#### - Celulasas

Las celulasas son una mezcla de enzimas que actúan de modo sinérgico sobre la celulosa y la hidroliza a glucosa. Se requieren, al menos tres enzimas, en un complejo enzimático típico como la endo 1-4- $\beta$ -glucanasa o carboximetilcelulasas (EC 3.2.1.4); la exoglucanasa o celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) y la  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21). La endoglucanasa segmenta aleatoriamente enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídico de las cadenas de glucanos en las regiones amorfas de la celulosa o en la superficie de las microfibrillas y produce cadenas libres con extremos reductores y no reductores. Las celobiohidrolasas (CHB) actúan sobre esos finales reductores y no reductores y los segmenta hasta convertirlos en celobiosa. Finalmente, la  $\beta$ -glucosidasa convierte la celobiosa en glucosa. La celobiosa tiene un efecto inhibitor en endo y exoglucasas por lo que en algunos complejos enzimáticos es necesario suplementar con  $\beta$ -glucosidasa a fin de evitar su acumulación (Lynd et al., 2002; Wang y Sun, 2010). Un sistema celulolítico eficiente debería ser capaz de degradar la celulosa cristalina de manera eficiente y tolerar pH ácidos (4-5) y condiciones de proceso estresantes.

## - Hemicelulasas

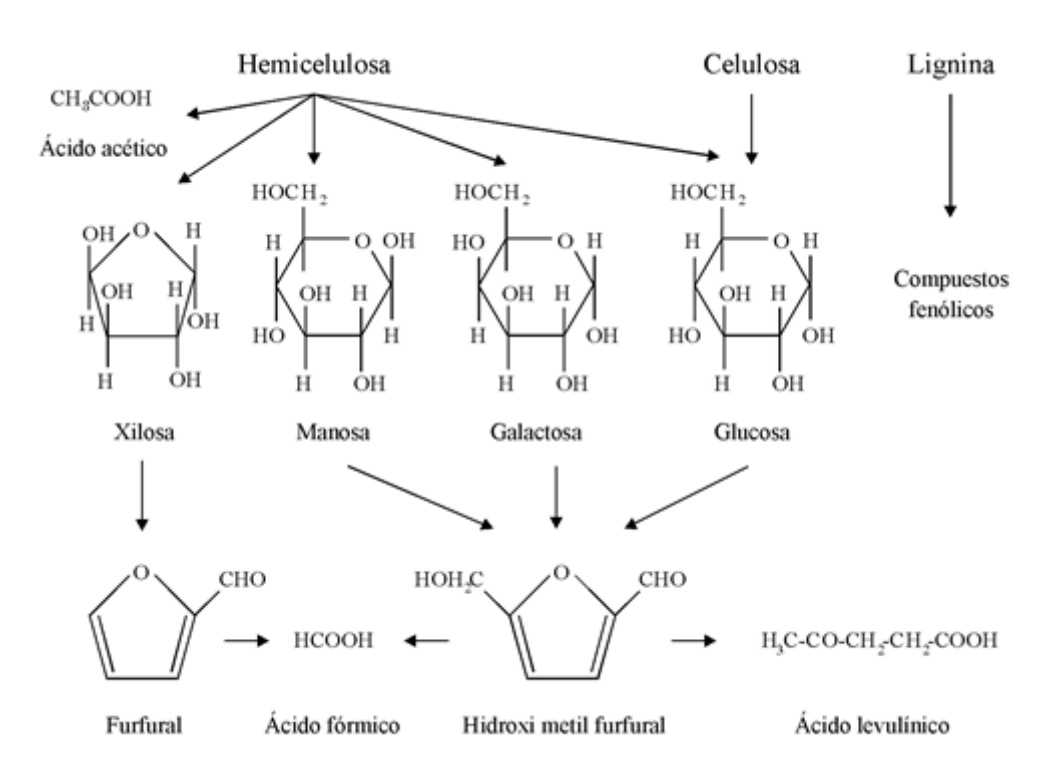
A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa es químicamente bastante más compleja y su degradación requiere múltiples sistemas enzimáticos más específicos. Un sistema típico hemicelulolítico incluye endo 1,4- $\beta$ -xilanasas o endoxilanasas (E.C.3.2.1.8) xilano 1,4- $\beta$ -xilano esterasas, ferúlico esterasas y p-cumárico esterasas,  $\alpha$ -1-arabinofuranosidasas,  $\alpha$ -glucuronosidasa (E.C.3.2.1.139),  $\alpha$ -arabinofuranosidasa (E.C.3.2.1.55), acetilxilano esterasa (E.C.3.1.1.72) y  $\alpha$ -4-O-metilglucuronosidasas xilosidasa (E.C.3.2.1.37). Las endoxilanasas hidrolizan las principales cadenas de xilano y la  $\beta$ -xilano esterasa ataca los xilooligosacáridos y los convierte en xilosa. La  $\alpha$ -arabinofuranosidasa y  $\alpha$ -glucuronidasa actúan sobre la columna principal de los xilanos y liberan moléculas de arabinosa y ácido 4-o-metil glucurónico. Las acetil esterasas atacan las sustituciones acetilo en la xilosa, mientras las ferúlico esterasas hidrolizan los enlaces éster localizados entre las sustituciones de arabinosa y el ácido ferúlico. Las enzimas ferúlico esterasas también hacen más fácil liberar a la hemicelulosa de la lignina (Gírio et al., 2010; Saha, 2003).

### 2.5.4. Compuestos inhibidores y métodos de detoxificación

Durante la etapa de pretratamiento no solo se solubilizan azúcares procedentes de los polímeros de polisacáridos, sino que se solubilizan y generan otros compuestos debido a las condiciones severas a las que se realiza el pretratamiento. Estos compuestos pueden afectar al funcionamiento de las siguientes etapas de proceso, afectando la acción de las enzimas durante la hidrólisis e inhibiendo al microorganismo en la fermentación (Kim, 2018). La clase y la concentración de compuestos inhibidores que se generan durante el pretratamiento dependen del tipo de biomasa, del propio pretratamiento y de las condiciones del mismo (temperatura, tiempo, presión, pH, carga de sólidos).

#### 2.5.4.1. Compuestos inhibidores

Los compuestos inhibidores se pueden dividir en tres grupos según su naturaleza: compuestos fenólicos, derivados del furano y ácidos alifáticos (Figura 2.16). Su potencial tóxico no solo se debe al efecto individual de cada uno de ellos, sino que se ha observado un efecto sinérgico en la combinación de ácidos y furanos, así como también las combinaciones de diferentes compuestos fenólicos (Jönsson et al., 2013). En los extractos, que se pueden solubilizar durante el pretratamiento, hay diferentes compuestos (ácidos grasos, terpenoides, ceras, resinas, compuestos fenólicos) que pueden actuar inhibiendo al microorganismo durante la fermentación.



**Figura 2.16.** Origen de los principales compuestos inhibidores

- Compuestos fenólicos

Una gran cantidad de compuestos fenólicos se producen por la degradación de la lignina durante el pretratamiento de la biomasa. Es un grupo muy heterogéneo, en el que los compuestos pueden estar como monómero o en forma de polímero y con una gran variedad de sustituyentes alifáticos con diferentes grupos funcionales (Medina-Torres et al., 2017). Su concentración y composición va a depender enormemente de la biomasa pretratada así como de las condiciones del pretratamiento. Algunas investigaciones indican que los compuestos fenólicos son más tóxicos que otros compuestos inhibidores incluso en concentraciones inferiores, ya que su bajo peso molecular les permite penetrar en las membranas celulares y dañar las estructuras internas, causando cambios en la morfología de las células (Klinke et al., 2004). Existen microorganismos capaces de metabolizar algunos compuestos fenólicos en otros compuestos menos tóxicos.

- Derivados del furano

El furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) son derivados del furano producto de la degradación de las pentosas y hexosas, respectivamente. Su formación se debe a la deshidratación y pérdida de tres moléculas de agua en los carbohidratos (Zabed et al., 2016). La concentración de estos compuestos depende principalmente de las condiciones de operación utilizadas en el pretratamiento. Por ejemplo, se producen en grandes cantidades en pretratamientos ácidos a altas temperaturas y tiempos largos. Estas

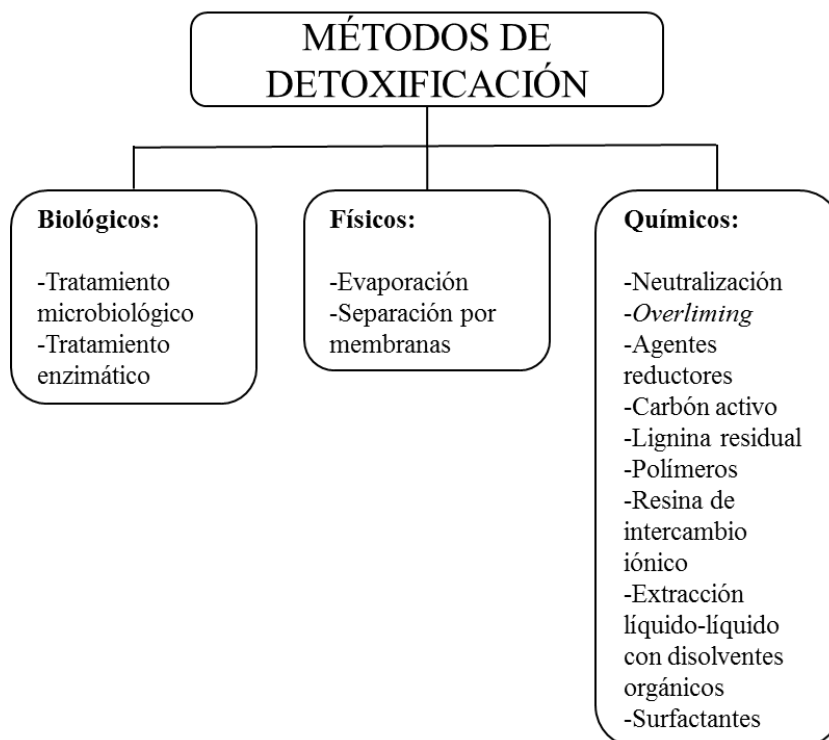
moléculas pueden afectar de manera negativa a la fermentación de los microorganismos, inhibiendo el crecimiento celular y la velocidad de consumo de azúcar y por lo tanto la producción de etanol. Su alta toxicidad se debe a que provocan daños sobre la membrana plasmática, inhiben la síntesis de macromoléculas y deterioran las membranas, el material genético y algunas proteínas (Kim, 2018). El furfural presenta una mayor toxicidad que el HMF. Algunos microorganismos tienen la capacidad de transformar el furfural y HMF en otros compuestos derivados (como alcoholes o ácidos) que presentan una menor toxicidad.

#### - Ácidos alifáticos

Los principales ácidos que se generan durante el pretratamiento son el ácido fórmico, el ácido acético y el ácido levulínico. El ácido acético se forma por la hidrólisis de los grupos acetilo de la hemicelulosa, el ácido fórmico se forma como consecuencia de la degradación del furfural e HMF y el ácido levulínico se forma por la degradación del HMF. La degradación de HMF a ácido fórmico y ácido levulínico solo se da en condiciones muy ácidas y a altas temperaturas. De los tres ácidos, el ácido acético es el que generalmente se encuentra en mayores concentraciones, pero es el que tiene una menor toxicidad de los tres (Jönsson et al., 2013). El ácido fórmico es el que presenta una mayor toxicidad. La presencia de ácidos alifáticos durante la fermentación muestra efectos negativos como una menor concentración de biomasa celular, una menor tasa de consumo específico de azúcares y una menor producción de etanol. La toxicidad de estos compuestos depende mucho del pH ya que solo la forma no disociada puede atravesar la membrana celular (Almeida et al., 2007).

#### 2.5.4.2. Métodos de detoxificación

La necesidad de una etapa de acondicionamiento de los hidrolizados dependerá de la concentración de inhibidores en el medio y de la tolerancia a ellos que tenga el microorganismo que se vaya a utilizar en la fermentación. En el caso de ser necesaria esta etapa extra, el método de detoxificación escogido dependerá también del tipo de inhibidores presentes. Los métodos de detoxificación pueden clasificarse en métodos biológicos, físicos y químicos (Figura 2.17).



**Figura 2.17.** Métodos de detoxificación empleados para aumentar la fermentabilidad de los hidrolizados

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 degradan parte de los azúcares.

A continuación se describen las técnicas de detoxificación empleadas en la presente tesis doctoral.

- *Overliming*

Este método consiste en la adición de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  al prehidrolizado hasta pH básico (pH 9-12) manteniéndolo a una temperatura de  $50^\circ\text{C}$  durante un periodo de tiempo, antes de la reducción de su pH hasta el valor adecuado para la fermentación (Martinez et al., 2000). Durante este proceso se produce un precipitado de sales de calcio que será necesario eliminar antes de la fermentación. Este método consigue eliminaciones parciales o totales de furfural, HMF y compuestos fenólicos, mejorando la fermentabilidad del prehidrolizado. El mecanismo por el cual el método *overliming* elimina compuestos inhibidores no está claro. Algunos autores sugieren que la detoxificación se produce por la precipitación de las sustancias tóxicas (Van Zyl et al., 1988), mientras que otros lo atribuyen más a la conversión química que a la eliminación por precipitación (Persson et al., 2002).

Uno de los inconvenientes de esta técnica, y en general de todas las detoxificaciones alcalinas, es la pérdida de una parte de los azúcares del hidrolizado. El porcentaje de degradación de azúcares depende de las condiciones del método (pH y tiempo de residencia). Por ejemplo, la pérdida de azúcares se incrementó en un hidrolizado de paja de maíz del 7% al 29% al pasar de un pH de 9 a 11 en su acondicionamiento con *overliming* (Mohagheghi et al., 2006).

#### - Adsorción con carbón activo

Esta técnica se basa en la retención de los contaminantes sobre la superficie de un sólido adsorbente muy poroso, como es el carbón activo. Suele tener una alta efectividad, con una gran capacidad de adsorber los compuestos inhibidores sin afectar a los niveles de azúcares de los hidrolizados. El carbón activo tiene un bajo coste además de poder de ser reutilizado a través de métodos de regeneración. Los principales parámetros que afectan al proceso son el pH, el tiempo de contacto, la temperatura y la concentración de carbón activo (Mussatto y Roberto, 2001).

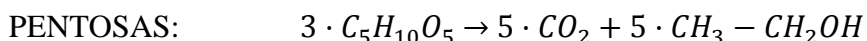
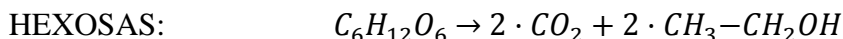
El pH es una variable que influye fuertemente en el proceso de adsorción por parte del carbón activo. Los ácidos orgánicos débiles son más fácilmente adsorbidos en el estado no ionizado o neutro por lo que se adsorben mejor a pH bajos, mientras que las bases débiles son más fácilmente eliminables a pH altos (Mateo et al., 2013). El tiempo de contacto, la temperatura y la concentración de carbón activo son variables que generalmente tienen una influencia positiva sobre la eliminación de compuestos inhibidores, dentro de los rangos experimentales que generalmente se utilizan en la bibliografía.

#### - Resinas de intercambio iónico

Hay diferentes tipos de resinas: catiónicas, aniónicas y mixtas. El pH del hidrolizado es un factor muy importante a tener en cuenta en función del tipo de resina empleada. En general, se obtienen buenas eliminaciones de compuestos fenólicos, ácido acético y furanos. La mayor desventaja de esta técnica es el elevado precio de las resinas. Negro et al., (2014) consiguieron eliminar por completo los compuestos fenólicos y los ácidos alifáticos de un hidrolizado de poda de olivo utilizando una resina iónica como método de detoxificación. También consiguieron eliminaciones de furanos cercanas al 90% y la pérdida de azúcares fue inferior al 2%.

### 2.5.5. Fermentación

La fermentación alcohólica es la conversión de azúcares a etanol mediante microorganismos, principalmente levaduras y algunas bacterias. Es la última etapa del proceso de conversión de biomasa en etanol antes de la separación final del producto, que se realiza generalmente por destilación. Durante la fermentación los microorganismos convierten las pentosas y hexosas derivadas de la celulosa y la hemicelulosa en etanol según las siguientes reacciones:



A partir de estas ecuaciones puede calcularse un rendimiento teórico máximo de 0,51 gramos de etanol por gramo de azúcar, tanto de hexosas como de pentosas (Quintero et al., 2011). En la práctica no se alcanza 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.

Las levaduras son 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). Entre los diferentes tipos de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más usado para la producción de etanol mediante fermentación a nivel industrial debido a su robustez. Sin embargo, esta levadura solo tiene capacidad para fermentar hexosas. Para conseguir la viabilidad de la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es necesario conseguir aumentar la recuperación de azúcares de la biomasa inicial. Esto incluye el aprovechamiento de las hemicelulosas formadas principalmente por pentosas (Gírio et al., 2010). Para ello, son necesarios microorganismos que sean capaces de fermentar azúcares como la xilosa, galactosa, arabinosa y manosa, para hacer económicamente viable la conversión de la lignocelulosa a etanol. 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). Sin embargo, una baja eficiencia de conversión a etanol y su sensibilidad a compuestos inhibidores y concentraciones elevadas de etanol no los hacen adecuados para una escala industrial. En los últimos años los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de nuevos microorganismos mediante ingeniería genética capaces de cofermentar pentosas y hexosas. Las modificaciones

genéticas han sido ampliamente estudiadas en organismos como *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* y *E. coli* (Zabed et al., 2016).

#### 2.5.5.1. Cepas etanológicas de *Escherichia coli*

Especies Gram +, no patogénicas de la bacteria *E. coli* pueden fermentar un amplio rango de azúcares monoméricos incluyendo todos los azúcares presentes en hidrolizados hemicelulósicos y celulósicos (Castro, 2013). Sin embargo, el cultivo de cepas silvestres de *E. coli* producen una gran variedad de productos como lactato, succinato, acetato, fórmico y pequeñas cantidades de etanol.

La introducción de genes externos, usando plásmidos o clones dentro del cromosoma de *E. coli*, la eliminación de rutas metabólicas competitivas, la evolución adaptativa e impedir la producción de otros metabolitos han sido algunas de las estrategias usadas para mejorar la utilización de los azúcares, el rendimiento de etanol, la productividad o la tolerancia a inhibidores y a etanol (Orencio-Trejo et al., 2010). Pero algunos problemas persisten como la baja tolerancia a etanol y el estrecho rango de pH (6-8) al que la bacteria puede trabajar. Sin embargo, diferentes cepas recombinantes consiguieron rendimientos de etanol superiores al 95% del máximo teórico, usando medios con mezclas de hexosas o pentosas o hidrolizados lignocelulósicos.

Un ejemplo es la cepa *E. coli* KO11, desarrollada a finales de los 80. Esta cepa se obtuvo primero integrando en su cromosoma al operon *pet*, que contiene los genes que codifican las enzimas piruvato decarboxilasa (*pdc*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Zymomonas* bajo el control de la región de regulación de la piruvato-formato liasa (*pfl*) (Castro, 2013). También se eliminó una subunidad del gen que codifica la fumarato reductasa (*frd*), lo cual evita la formación de succinato, y finalmente se hizo una selección de variantes, cogiendo aquellas que mostraban una alta actividad enzimática de las dos enzimas anteriores a través de la evolución adaptativa.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con la cepa *E. coli* KO11 su tolerancia a etanol era menor que la de las levaduras. Así, a través de evolución metabólica se consiguió una mejora en la tolerancia a etanol y en su producción, dando lugar a *E. coli* LY01 (Yomano et al., 1998). Se siguieron haciendo mejoras, como reducir los suplementos de nutrientes necesarios en los medios de cultivo para reducir su coste (*E. coli* LY168) (Yomano et al., 2009), hasta llegar a la cepa *E. coli* MM160, que presentó una gran tolerancia a los inhibidores presentes en hidrolizados de bagazo de caña.

Otras cepas etanológicas han sido desarrolladas por diferentes investigadores con muy buenos resultados. Diferentes cepas *E. coli* se han utilizado para fermentar hidrolizados de paja de colza (López-Linares et al., 2016), bagazo de caña (Nieves et al.,

2011a), rastrojo de maíz (Saha et al., 2013), paja de trigo (Saha et al., 2011) o poda de olivo (Martínez-Patiño et al., 2015) obteniéndose altos rendimiento de etanol.

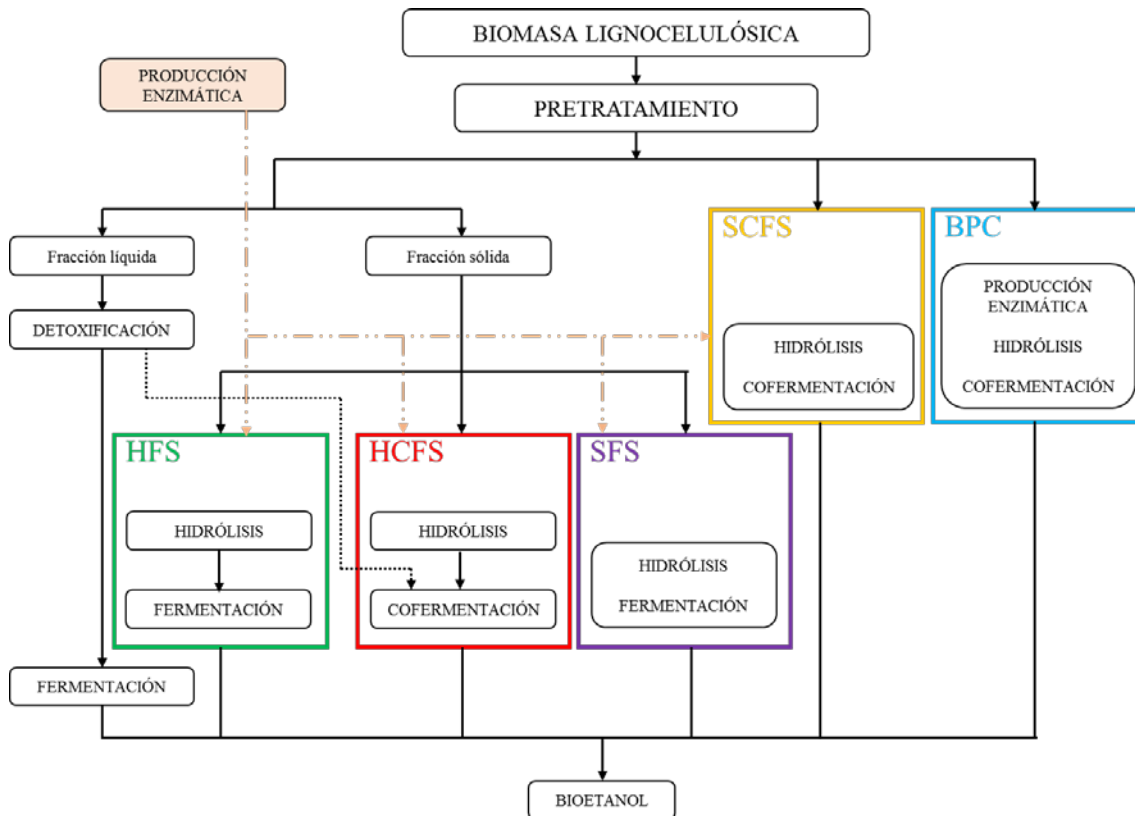
En esta tesis doctoral se han utilizado dos cepas etanológicas de *E. coli*. Por un lado la cepa *E. coli* MS04 (Fernández-Sandoval et al., 2012), que presenta una alta tolerancia a la presencia de ácido acético en el medio, como es el caso de los hidrolizados de poda de olivo de esta tesis doctoral, debido a la alta carga de sólidos que se emplea durante el pretatamiento. Por otra parte, también se ha utilizado la cepa *E. coli* MM160, citada anteriormente, que presenta una alta tolerancia a la presencia de compuestos inhibidores en los hidrolizados (Nieves et al., 2011b).

### **2.5.6. Configuraciones de proceso**

La conversión biológica de los azúcares de la biomasa lignocelulósica a etanol requiere de la fermentación eficiente de los distintos azúcares, procedentes tanto de la fracción celulósica como de la hemicelulósica (Hahn-Hägerdal et al., 2006). Se han realizado numerosas investigaciones sobre la integración de las distintas etapas del proceso en diferentes configuraciones, con el objetivo de reducir el consumo energético, los costes de inversión y los tiempos de operación (Zabed et al., 2016). Se pueden distinguir principalmente cinco configuraciones de proceso en función de cómo se realicen las etapas de hidrólisis enzimática y de fermentación para la producción de etanol (Figura 2.18). Las principales ventajas e inconvenientes de cada una de ellas se recogen en la Tabla 2.6.

#### **2.5.6.1. Hidrólisis y fermentación secuenciales (HFS)**

La HFS es la configuración más utilizada para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica. La fracción sólida que resulta del pretratamiento se somete a una hidrólisis enzimática y, una vez acabada esta etapa, la glucosa del hidrolizado enzimático es fermentada a etanol. La principal ventaja de la HFS es que permite que tanto la etapa de hidrólisis como la de fermentación se realicen en sus respectivas condiciones óptimas. Por ejemplo, en cuanto a temperatura, las enzimas suelen tener rendimientos más elevados a 45-50°C mientras que la fermentación se suele realizar entorno a los 30°C. Sin embargo, el principal inconveniente es el riesgo de inhibición de las enzimas durante la hidrólisis cuando pasa un cierto periodo de tiempo, debido a la acumulación de azúcares en el hidrolizado, que pueden ejercer inhibición por producto (Philippidis et al., 1993).



**Figura 2.18.** Esquema de las principales configuraciones de proceso para la obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

#### 2.5.6.2. Hidrólisis y co-fermentación secuenciales (HCFS)

Esta configuración es una variante de la HFS donde, una vez acabada HE, se mezclan el hidrolizado enzimático y la fracción líquida que sale del pretratamiento que contiene azúcares hemicelulósicos, para ser fermentado de forma conjunta por microorganismos capaces de fermentar pentosas y hexosas (Gírio et al., 2010).

En esta tesis doctoral se estudió una modificación de esta configuración en la que se realiza la hidrólisis enzimática del *slurry* (conjunto de las fracciones sólida y líquida resultantes del pretratamiento sin separar por filtración). Una vez concluida la HE, se retira el sólido hidrolizado, y el líquido (que contiene la mezcla de azúcares hemicelulósicos y celulósicos) se detoxifica y se fermenta. Esta configuración ha sido empleada para fermentar hidrolizados de los residuos de la mazorca de maíz (Pedraza et al., 2016), rastrojo de maíz (Saha et al., 2013), paja de colza (López-Linares et al., 2016) o *Agave lechuguilla* (Díaz-Blanco et al., 2018).

**Tabla 2.6.** Principales ventajas y desventajas de las distintas configuración de integración de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación (Zabed et al., 2016)

<b>Configuración</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>HFS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La hidrólisis y la fermentación se realizan en sus condiciones óptimas</li> <li>-La fermentación se puede hacer en continuo con recirculación de células</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Proceso en dos etapas: mayor coste de inversión</li> <li>-Riesgo de inhibición de enzimas por producto final en la HE</li> <li>-Riesgo de estrés osmótico del microorganismo a altas concentraciones de azúcares</li> </ul>
<b>HCFS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Las de la configuración HFS</li> <li>-Conversión simultánea de hexosas y pentosas en una única etapa</li> <li>-Posibilidad de obtener mayores concentraciones de etanol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Las de la configuración HFS</li> <li>-Necesidad de usar microorganismos que fermenten pentosas, no los ampliamente utilizados a nivel industrial</li> </ul>
<b>SFS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Permite altas cargas de sólido</li> <li>-Se evita la inhibición enzimática por producto final</li> <li>-Disminución de costes de inversión</li> <li>-Empleo de menores concentraciones de enzima</li> <li>-Menor tiempo de proceso</li> <li>-Altos rendimientos de etanol</li> <li>-Menor posibilidad de contaminación microbiana</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Requiere un compromiso entre las condiciones óptimas de la HE y la fermentación</li> <li>-Las células no pueden ser recirculadas</li> <li>-Alta viscosidad que provoca una mala mezcla en el reactor cuando se trabaja a altas cargas de sólidos</li> </ul>
<b>SCFS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Las mismas que la SFS</li> <li>-Aprovechamiento de todos los azúcares presentes en la materia prima</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Las de la SFS</li> <li>-Necesidad de usar microorganismos que fermenten pentosas, no los ampliamente utilizados a nivel industrial</li> </ul>
<b>BCP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Menores costes</li> <li>-No se necesitan enzimas externas para realizar la HE</li> <li>-Simplificación de la operación</li> <li>-Reducción del número de reactores</li> <li>-Reducción de reactivos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Se encuentra en etapa de investigación</li> <li>-No existen actualmente microorganismos con todas las características requeridas para un proceso eficiente (inestabilidad, bajas tolerancias a etanol, crecimiento limitado...)</li> <li>-Bajos rendimientos en etanol</li> <li>-Formación de otros bioproductos (ácido acético, glicerol y ácido láctico)</li> </ul>

#### 2.5.6.3. Sacarificación y fermentación simultánea (SFS)

En esta configuración la HE de la fracción sólida del pretratamiento se realiza simultáneamente con la fermentación de los azúcares que van siendo liberados en un mismo reactor, con lo que se evita la inhibición de las enzimas, y disminuyen los costes de equipamiento y los tiempos de proceso (Olofsson et al., 2008). El principal inconveniente de la SSF es que las condiciones óptimas de enzimas y microorganismo no coinciden, por lo que ha de realizarse a valores intermedios entre ambas. Esto se ha intentado solventar mediante el empleo de microorganismos termotolerantes, con

temperaturas óptimas de fermentación más próximas a las de las enzimas (Ballesteros et al., 2004).

La SFS permite usar altas cargas de sustrato que permiten alcanzar concentraciones elevadas de etanol, que hagan más viable económicamente el posterior proceso de destilación. Cuando se usan altas cargas de sólido, la viscosidad del medio dificulta el manejo del proceso en el reactor. Para solucionar este inconveniente se han propuesto dos estrategias. Una etapa de presacarificación previa a la SFS que reduzca la viscosidad inicial del medio (García-Aparicio et al., 2011) o realizar un proceso semicontinuo (fed-batch) en la que la adición del sustrato es por lotes (Hoyer et al., 2010).

#### 2.5.6.4. Sacarificación y co-fermentación simultánea (SCFS)

En esta configuración se realizan simultáneamente la HE del slurry (conjunto de la fracción sólida y líquida) con la fermentación de los azúcares celulósicos y hemicelulósicos usando microorganismos capaces de fermentar hexosas y pentosas (Öhgren et al., 2007).

#### 2.5.6.5. Bioproceso consolidado (BPC)

En esta configuración un único microorganismo lleva a cabo en un mismo reactor las tres etapas biológicas del proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica: la producción de enzimas (celulasas y hemicelulasas), la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada y la fermentación de los azúcares celulósicos y hemicelulósicos. A pesar de las ventajas de este tipo de proceso (Tabla 2.6), su desarrollo no se ha producido aún debido a que en la actualidad no existen microorganismos lo suficientemente consolidados que pueden realizar todas las etapas simultáneamente, por lo que se investiga la posibilidad de mejorarlos mediante modificación genética (Parisutham et al., 2014).



# 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



La hipótesis de partida es que en España se generan grandes cantidades de un residuo agrícola, la poda del olivo, que actualmente no tiene una aplicación viable y que necesita ser eliminado adecuadamente sin generar problemas medioambientales. Debido a su composición, este residuo resulta ser una materia prima adecuada para la producción de etanol, así como para la obtención de otros productos de alto valor añadido. La valorización y aprovechamiento de esta biomasa tendría beneficios medioambientales, sociales y económicos.

El objetivo general es valorizar la biomasa procedente de la poda del olivar, principalmente mediante la conversión biológica de las fracciones de celulosa y de hemicelulosa para la producción de etanol, evaluando diferentes pretratamientos y configuraciones de proceso a escala de laboratorio.

Para alcanzar este objetivo general, se pretende la consecución de los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la influencia de una etapa previa de extracción acuosa antes del pretratamiento ácido.
2. Estudiar las principales variables de operación del pretratamiento con ácido diluido empleando dos ácidos diferentes, fosfórico y sulfúrico.
3. Estudiar un pretratamiento secuencial consistente en una primera etapa ácida y una segunda etapa oxidativa con peróxido de hidrógeno en medio alcalino.
4. Evaluar diferentes métodos de acondicionamiento en prehidrolizados reales de poda de olivo.
5. Ensayar la fermentación de licores hemicelulósicos procedentes de distintos pretratamientos aplicados a la poda de olivo mediante cepas etanológicas de *Escherichia coli* capaces de metabolizar pentosas y hexosas.
6. Comparar la bioconversión conjunta de azúcares celulósicos y hemicelulósicos a etanol con la configuración de proceso convencional que supone la conversión a etanol por separado de ambos tipos de azúcares.

7. Evaluar el pretratamiento biológico de la poda de olivo, solo y combinado con una etapa ácida, usando diferentes hongos de podredumbre blanca y tiempos de pretratamiento.
8. Estudiar la combinación de un pretratamiento biológico con una etapa ácida.
9. Evaluar el potencial de obtención de compuestos con capacidad antioxidante, presentes en la poda de olivo, mediante la extracción asistida con ultrasonidos.

# 4. RESUMEN DE RESULTADOS

---

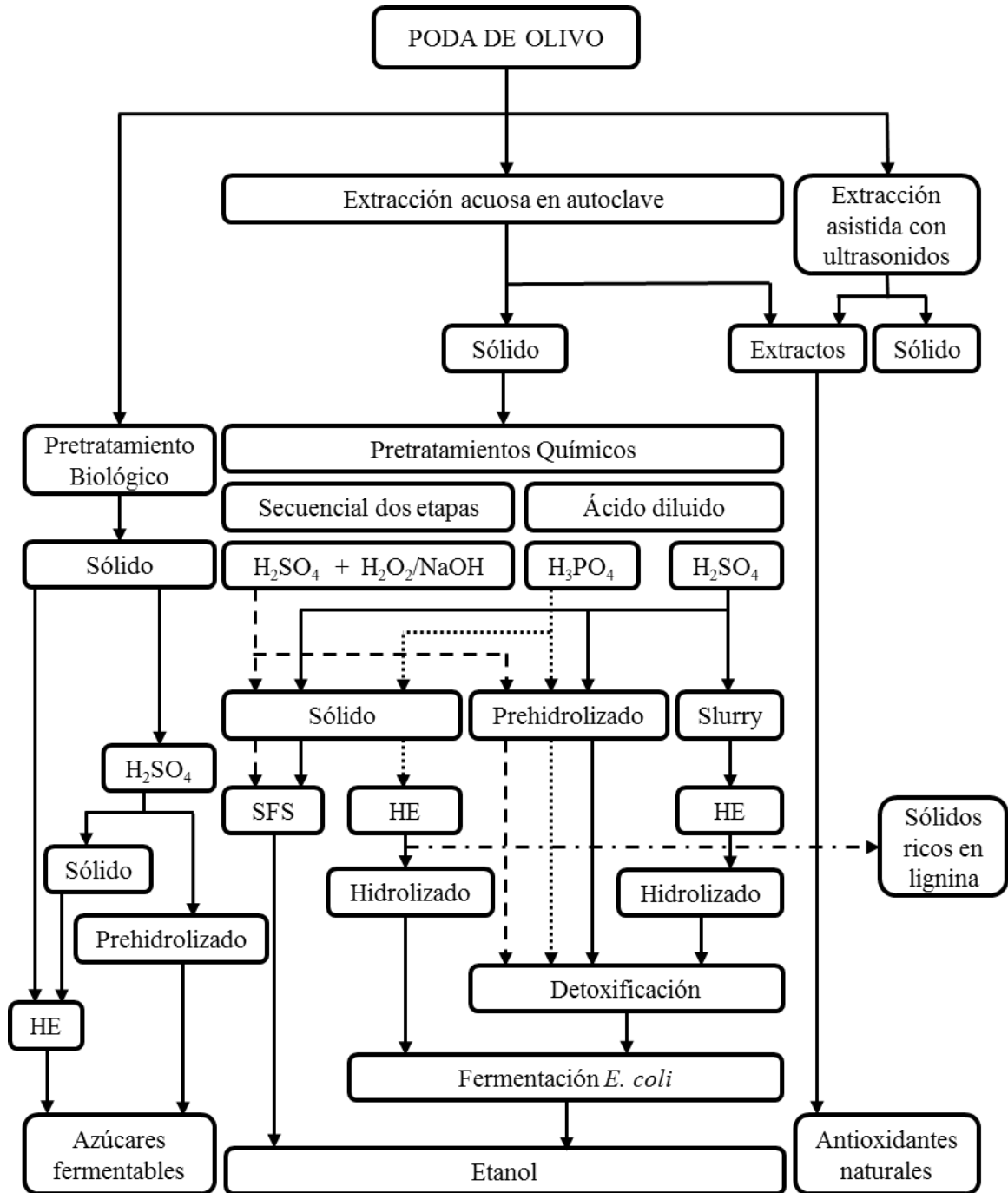


Como resultado de la presente tesis doctoral se han realizado 6 artículos que se recogen como anexos y se enumeran a continuación:

1. Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Juan Miguel Romero-García, Encarnación Ruiz, José Miguel Oliva, Cristina Álvarez, Inmaculada Romero, María José Negro, Eulogio Castro  
Título: High solid loading pretreatment of olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by *Escherichia coli*.  
Publicación: Energy & Fuels, 29, 1735-1742 (2015)
2. Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Cristóbal Cara, Juan Miguel Romero-García, Eulogio Castro  
Título: Design and optimization of sulfuric acid pretreatment of extracted olive tree biomass using response surface methodology.  
Publicación: BioResources 12(1), 1779-1797 (2017)
3. Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Encarnación Ruiz, Cristóbal Cara, Inmaculada Romero, Eulogio Castro.  
Título: Advanced bioethanol production from olive tree biomass using different process configurations  
Publicación: Biochemical Engineering Journal (enviado)
4. Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Cristóbal Cara, Juan Carlos López-Linares, Eulogio Castro  
Título: Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production  
Publicación: Bioresource Technology 239, 326-335 (2017)

5. Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Thelmo A. Lu-Chau, Beatriz Gullón, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Eulogio Castro, Juan M. Lema  
Título: Application of a combined fungal and dilute acid pretreatment on olive tree biomass.  
Publicación: Industrial Crops and Products (aceptado)
  
6. Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Beatriz Gullón, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Mladen Brnčić, Jana Šic Žlabur, Eulogio Castro  
Título: Optimization of ultrasound- assisted extraction of biomass from olive trees using response surface methodology  
Publicación: Ultrasound Sonochemistry (en fase de revisión)

En la Figura 4.1 se muestra un esquema simplificado de todo el trabajo experimental que se ha realizado en la presente tesis doctoral. En primer lugar, se abordó el estudio el pretratamiento con ácido fosfórico diluido de la poda de olivo extraída tras evaluar el interés de una etapa previa de extracción con agua (artículo 1). Asimismo, se aplicó el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido también a la poda de olivo extraída (artículo 2). Seguidamente, se fermentaron a etanol los azúcares de las fracciones sólidas y líquidas resultantes del pretratamiento con ácido sulfúrico en sus condiciones óptimas. Para ello se emplearon dos configuraciones de proceso diferentes, conversión a etanol de azúcares celulósicos y hemicelulósicos por separado o bioconversión conjunta de ambos tipos de azúcares (artículo 3). Por otra parte, la poda de olivo extraída se sometió a un pretratamiento secuencial con una primera etapa ácida seguida de una etapa oxidativa en medio alcalino (artículo 4). Además, se ensayó un pretratamiento biológico en la poda de olivo, así como la combinación de este con un pretratamiento ácido (artículo 5). Finalmente, se estudió la extracción asistida con ultrasonidos de la poda de olivo para la obtención de compuestos con capacidad antioxidante (artículo 6). Cabe resaltar que el trabajo experimental correspondiente a estos dos últimos artículos se ha efectuado en el marco de estancias de investigación realizadas en centros distintos a la Universidad de Jaén. Concretamente, el artículo 5 es fruto de una estancia de tres meses en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela, efectuada de noviembre de 2015 a febrero de 2016, y supervisada por el Dr. Thelmo A. Lu-Chau. El artículo 6 es resultado de la estancia internacional de investigación realizada en el Departamento de Ingeniería de Procesos de la Universidad de Zagreb (Croacia), bajo la supervisión del Dr. Mladen Brnčić, llevada a cabo de abril a junio de 2017.



**Figura 4.1.** Esquema resumen del proceso experimental

A continuación, se presenta un resumen conjunto de los resultados más destacados de los seis artículos que forman parte de esta tesis doctoral.

## 4.1. MATERIA PRIMA

La biomasa resultante de la poda del olivo (PO), utilizada como materia prima en la presente tesis doctoral, se recogió de olivares de la provincia de Jaén en diferentes campañas, entorno al mes de febrero, una vez finalizada la recolección de la aceituna. Esta biomasa consiste en hojas y ramas de un diámetro inferior a 5 cm, que fueron astilladas y homogenizadas mediante su trituración en un molino de cuchillas con una malla de 4 mm. Después, se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenó en un lugar seco. Para la mayor parte de los pretratamientos ensayados en esta investigación se usó como materia prima la poda de olivo extraída con agua (POE) debido al alto contenido en extractos de esta biomasa (componentes no estructurales) y a los resultados de investigaciones previas, en los que se evidenció que la eliminación parcial de los extractos aumentaba los rendimientos de azúcares en etapas posteriores al evitar, probablemente, la formación de complejos carbohidratos-lignina durante el pretratamiento (Ballesteros et al., 2011). La etapa de extracción acuosa de la biomasa de poda de olivo se realizó a 120°C durante 60 min en un autoclave, con una relación sólido/líquido del 10% (p/v). En la Tabla 4.1 se recogen los resultados de la caracterización de los distintos lotes de poda empleados en esta tesis doctoral, antes (PO) y después (POE) de la etapa de extracción acuosa. Los ensayos de caracterización de cada lote se realizaron al menos por triplicado y los resultados mostrados corresponden a los valores medios determinados en cada caso.

**Tabla 4.1.** Composición de la poda de olivo (PO) y de la poda de olivo extraída (POE) de los distintos lotes utilizados en esta investigación

Componente (% en peso seco)	Lote 1		Lote 2		Lote 3
	PO	POE	PO	POE	PO
<b>Celulosa</b>	<b>23,4±0,3</b>	<b>27,8±0,3</b>	<b>25,1±1,0</b>	<b>31,0±1,2</b>	<b>21,0±0,6</b>
Glucosa	26,0±0,3	30,9±0,3	27,9±1,1	34,4±1,3	23,3
<b>Hemicelulosa</b>	<b>15,5±0,2</b>	<b>17,5±0,2</b>	<b>18,8±0,7</b>	<b>23,4±0,4</b>	<b>17,4±0,5</b>
Xilosa	11,7±0,2	13,9±0,2	13,5±0,8	16,4±0,6	nd
Galactosa	1,7±0,1	1,9±0,1	2,6±0,1	3,2±0,1	nd
Arabinosa	2,7±0,2	2,4±0,1	3,1±0,2	4,6±0,2	3,2±0,5
Manosa	1,4±0,0	1,6±0,0	2,1±0,1	2,3±0,1	nd
<b>Lignina</b>	<b>20,1±0,1</b>	<b>24,4±0,2</b>	<b>18,5±0,3</b>	<b>23,2±0,2</b>	<b>20,6±0,3</b>
<b>Extractos</b>	<b>25,6±0,3</b>	<b>8,8±0,7</b>	<b>24,8±0,7</b>	<b>8,9±0,5</b>	<b>25,0±0,4</b>
Glucosa	5,9±0,1	1,0±0,2	5,7±0,2	0,8±0,1	5,0±0,2
<b>Grupos acetilo</b>	-	-	<b>2,0±0,1</b>	<b>2,3±0,1</b>	<b>2,2±0,2</b>
<b>Cenizas</b>	<b>2,8±0,2</b>	<b>3,4±0,1</b>	<b>2,9±0,4</b>	<b>3,8±0,2</b>	<b>2,4±0,3</b>

nd: no determinado de forma individual

En el estudio del pretratamiento con ácido fosfórico se realizaron varios experimentos para evaluar las mejoras que se producían en el proceso al existir una etapa de extracción acuosa previa al pretratamiento ácido (artículo 1). Las condiciones del pretratamiento ácido (170°C y 0,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) fueron las mismas en los dos casos, pero en uno se usó como materia prima PO y en otro POE. Se demostró que esta etapa previa mejoraba la digestibilidad de la celulosa del sólido pretratado así como la fermentabilidad de los prehidrolizados. En los hidrolizados con PO detoxificados posteriormente mediante *overliming* no se produjo crecimiento celular ni consumo de azúcares en 72 h, mientras que, en las mismas condiciones, el prehidrolizado de POE se fermentó con buenos rendimientos en etanol. Este hecho puede deberse a que en la etapa de extracción acuosa se retira una importante cantidad de compuestos fenólicos, que pueden inhibir a los microorganismos fermentadores y que de no realizarse esta extracción previa se solubilizarían y estarían presentes en el prehidrolizado.

La caracterización de la materia prima se ha realizado de acuerdo con los métodos para biomasa del National Renewable Energy Laboratory (NREL) de EE.UU (Sluiter et al., 2010). Esta metodología incluye una extracción en dos etapas para determinar el contenido total en extractos, una primera etapa con agua en la que se determinan también los azúcares solubles, y una segunda extracción con etanol. Por otra parte, en cuanto a la determinación de los componentes estructurales, se realiza analizando mediante HPLC los azúcares resultantes de una hidrólisis ácida cuantitativa en dos etapas, tras la cual la glucosa que se obtiene se considera celulosa y el resto de los monosacáridos se cuantifica como hemicelulosa. El contenido en polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) se calcula multiplicando las concentraciones de los distintos azúcares monoméricos (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) por un factor de 0,9 para las hexosas y 0,88 para las pentosas.

Durante la realización de esta investigación se emplearon tres lotes distintos de poda de olivo. El lote 1 se usó en el estudio del pretratamiento de POE con ácido fosfórico diluido en distintas condiciones experimentales (artículo 1). El lote 2, también con POE, se utilizó para estudiar pretratamientos con ácido sulfúrico diluido en una etapa y también en una configuración de pretratamiento secuencial ácido/oxidativo-alcalino (artículos 2, 3 y 4). El lote 3 de poda se empleó sin extracción previa (PO) como materia prima en el estudio del pretratamiento biológico (artículo 5) y de la extracción asistida con ultrasonidos (artículo 6). En los resultados que se muestran en la Tabla 4.1 no se aprecian diferencias destacables en la proporción de los principales componentes (celulosa, hemicelulosa, lignina y extractos) de los distintos lotes. El porcentaje de extractos prácticamente permanece constante entorno al 25% mientras que en los carbohidratos estructurales las diferencias son algo más significativas (entre el 38,4% del lote 3 y el 43,9% del lote 2). Se puede observar que el azúcar más abundante en la poda de olivo es la glucosa, la mayor parte formando parte de la celulosa (21-25,1%) aunque también se determina una parte no estructural en la fracción de extractos (5-5,9%). En las hemicelulosas de PO (15,5-18,8%) el azúcar predominante es la xilosa (entorno al 65% del total de los azúcares hemicelulósicos), seguido de la arabinosa, la galactosa y la manosa.

En la extracción acuosa en autoclave de la poda de olivo se recuperó en torno a 80% del peso inicial de biomasa y se consiguió solubilizar un 70% de los extractos presentes en dicha biomasa. Cabe destacar que no se producen pérdidas de celulosa ni de hemicelulosa durante la extracción, que incrementan ligeramente su porcentaje de composición relativa en la POE como consecuencia de la solubilización de extractos. La mayor parte de la glucosa soluble queda en la fase acuosa, en la que también se ha determinado la presencia de compuestos fenólicos. La posible valorización de esa fracción líquida para la obtención de antioxidantes naturales puede ser de gran interés para la viabilidad de una biorrefinería basada en la obtención de bioetanol a partir de los azúcares presentes en la poda del olivar.

Los valores de azúcares determinados en la caracterización de las materias primas empleadas en esta tesis doctoral, PO y POE (Tabla 4.1), se han considerado como base para el cálculo de los rendimientos de las distintas etapas de proceso (pretratamiento, hidrólisis y fermentación) con objeto de expresar los resultados con respecto al potencial máximo que podría obtenerse de esta biomasa residual.

## **4.2. RENDIMIENTO EN AZÚCARES: PRETRATAMIENTO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

Durante la realización de esta tesis doctoral se han evaluado diferentes pretratamientos para la poda de olivo. En la Tabla 4.2 se resumen los pretratamientos aplicados a esta biomasa lignocelulósica residual así como los rangos de las variables estudiadas y el artículo que recoge cada pretratamiento. En algunos pretratamientos se utilizó la metodología de diseño de experimentos para evaluar la influencia de las distintas variables y sus posibles interacciones (artículos 2 y 4), mientras que en otros se siguió el clásico desarrollo experimental (artículos 1 y 5). En todos los experimentos se realizó la caracterización posterior de los sólidos pretratados y de las fracciones líquidas (prehidrolizados) resultantes del pretratamiento, en las que se determinó la concentración de azúcares solubilizados y de compuestos potencialmente inhibidores para la fermentación. También se realizaron ensayos de hidrólisis enzimática (HE) sobre los sólidos pretratados, con una relación sólido/líquido del 5% (p/v). En todas las pruebas de HE se usó el complejo de enzimas celulasas Cellic CTec 3 (Novozymes) suplementado con una pequeña cantidad de  $\beta$ -glucosidasa, excepto en los ensayos correspondientes al pretratamiento biológico donde se usó el cocktail enzimático Celluclast (Novozymes) (artículo 5). La efectividad del pretratamiento se evaluó de acuerdo con la recuperación de total de azúcares, en el prehidrolizado y en el hidrolizado enzimático.

En el primer artículo se determinó el interés de realizar una etapa previa de extracción acuosa de la poda de olivo para reducir el contenido en extractos de la poda de olivo y se estudió un pretratamiento con ácido fosfórico diluido de la poda de olivo extraída. Se observó que al aumentar la temperatura en el rango ensayado, la recuperación de azúcares en el prehidrolizado disminuía debido a una mayor degradación de éstos, lo que se tradujo en una mayor concentración de compuestos inhibidores en esos

prehidrolizados (Tablas 3 y 4, artículo 1). La concentración de ácido fosfórico prácticamente no tuvo influencia en la solubilización de los azúcares a 170°C y 210°C, pero si a 190°C, donde una mayor concentración de ácido produjo una degradación mayor de azúcares. La alta relación sólido/líquido empleada (30%) permitió obtener prehidrolizados con una concentración en azúcares superior a los 50 g/L, donde el azúcar principal fue la xilosa. Una gran parte de esos azúcares se encontraba en forma oligomérica en los experimentos realizados en las condiciones más suaves.

**Tabla 4.2.** Variables de operación empleadas en los diferentes pretratamientos aplicados a la biomasa de poda de olivo

Pretratamiento		Materia prima	Condiciones de operación	Artículo
Ácido fosfórico diluido		POE (lote 1)	T: 170, 190 y 210°C C <sub>A</sub> : 0,5, 1, 1,5% (p/v) Variables fijas: S/L: 30% (p/v) t: 10_min	1
Ácido sulfúrico diluido		POE (lote 2)	Diseño Box-Behnken T:160-200°C C <sub>A</sub> :0-8 g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /100 g POE S/L: 15-35 % (p/v) Variable fija: t: 10 min	2
Secuencial	Ácido sulfúrico diluido	POE (lote 2)	Diseño central compuesto C <sub>A</sub> : 1-3% (p/v); t: 60-120 min Variables fijas: T: 130°C S/L: 20% (p/v)	4
	Peróxido de hidrógeno en medio alcalino		Diseño central compuesto C <sub>p</sub> : 1-7% (p/v); t: 30-90 min Variables fijas: pH 11,5 T: 80°C S/L: 10% (p/v)	
Biológico		PO (lote 3)	7 basidomicetes t: 15, 30, 45 días	5
Combinado	Biológico	PO (lote 3)	<i>I. lacteus</i> t: 28 días T: 30°C	5
	Ácido sulfúrico diluido		T: 130°C C <sub>A</sub> : 2% (p/v) S/L: 20% (p/v) t: 90 min	

PO: Poda de olivo, POE: Poda de olivo extraída; C<sub>A</sub>: Concentración de ácido; C<sub>p</sub>: Concentración de peróxido de hidrógeno; T: Temperatura; t: Tiempo y S/L: relación sólido/líquido

En cuanto a la hidrólisis enzimática, si se atiende al rendimiento con respecto a la glucosa presente en el sólido pretratado, se observa que aumentó con la temperatura y que la concentración de ácido fosfórico tuvo una mayor influencia a una temperatura de 170°C, donde mejoró desde 59,4% a 69,4% al pasar de una concentración de ácido fosfórico de 0,5 a 1,5% (p/v) (Tabla 5, artículo 1). En cuanto a la glucosa recuperada por hidrólisis enzimática (rendimiento referido a la glucosa de la materia prima inicial), los mayores valores se alcanzaron a una temperatura de 190° C. Esto se debe, a que a 210°C se obtuvo un sólido pretratado con menor contenido en celulosa debido a su solubilización

y posterior degradación a hidroximetilfurfural. Atendiendo a la recuperación global de azúcares, se obtuvieron los mayores rendimientos a una temperatura de pretratamiento de 170°C con mínimas diferencias cuando se varió la concentración de ácido fosfórico.

En el artículo 2 también se aplicó un pretratamiento con ácido diluido a la poda de olivo extraída, pero en este caso con ácido sulfúrico y se incluyó como variable la relación sólido/líquido para evaluar su influencia en la recuperación de azúcares. Este pretratamiento se realizó de acuerdo con un diseño de experimentos tipo Box-Behnken. Se observó que un incremento de la temperatura en el rango estudiado produjo una disminución de la concentración de azúcares en el prehidrolizado mientras que, como era esperable, con una mayor relación sólido/líquido se obtuvo un incremento en esa concentración. El aumento de la concentración de ácido sulfúrico produjo un incremento en la concentración de azúcares hasta llegar a un máximo con una concentración intermedia de ácido (aprox. 4 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/100 g de POE) y a partir de ahí empezó a decrecer. Por otro lado, el mejor rendimiento de hidrólisis enzimática respecto al sólido pretratado (97,7%) se alcanzó en el experimento con mayor temperatura (200°C) y concentración de ácido (8 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/100 g de POE), pero con una baja recuperación de glucosa por hidrólisis enzimática (24,3%) (Tabla 5, artículo 2). La mayor recuperación de glucosa por HE se alcanzó en el experimento a 200°C sin ácido (autohidrólisis) seguido del experimento a la misma temperatura y con una concentración de ácido intermedia (4%). La optimización de las condiciones experimentales mediante una metodología de superficie de respuesta se realizó con base en dos criterios. Un primer criterio buscó maximizar el rendimiento global de azúcares y el modelo determinó como condiciones óptimas 164°C, 5.9% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/g POE (0.9% p/v) y 15% sólidos (óptimo 1). Un segundo criterio de optimización maximizó simultáneamente la recuperación de azúcares y la concentración de azúcares en el prehidrolizado determinando unas condiciones óptimas de 160°C, 4,9% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/g POE (1.7% p/v) y 35% sólidos (óptimo 2).

En el artículo 4 se llevó a cabo un pretratamiento en dos etapas sobre la poda de olivo extraída. En primer lugar, se realizó un pretratamiento con ácido sulfúrico a una menor temperatura (130°C) de las estudiadas en el artículo 2, con el objetivo de recuperar la mayor parte de los azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado. A continuación, el sólido pretratado se sometió a un segundo pretratamiento de oxidación con peróxido de hidrógeno en medio alcalino para deslignificar y conseguir un sólido rico en celulosa más accesible a la acción de las enzimas. Para cada una de las de las dos etapas se siguió un diseño de experimentos tipo central compuesto. En la etapa ácida el aumento en la concentración de ácido produjo una mayor recuperación de azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado hasta llegar a un máximo donde ésta empezó a decrecer. En cuanto al tiempo de pretratamiento, tuvo un efecto positivo a concentraciones de ácido bajas y un

efecto negativo a concentración de ácido altas. Este comportamiento puede explicarse debido a la interacción de signo negativo que se detectó entre estas dos variables. Las condiciones óptimas que maximizan la recuperación de azúcares hemicelulósicos en el prehidrolizado se determinaron con una concentración de ácido del 2,4% y un tiempo de 84 minutos. En estas condiciones se consiguió recuperar el 71% de los azúcares hemicelulósicos presentes en la POE. El sólido pretratado resultante del pretratamiento en estas condiciones óptimas se usó como materia prima de la siguiente etapa.

El objetivo de la segunda etapa fue maximizar el contenido en celulosa del sólido resultante y la glucosa recuperada por hidrólisis enzimática. En este caso el factor más influyente fue la concentración de peróxido de hidrógeno ( $C_p$ ), con un claro efecto positivo en ambas respuestas. Por ello, se amplió el rango experimental de este factor hasta una concentración de peróxido de hidrógeno del 7%, realizando tres experimentos adicionales. En cambio, el tiempo de pretratamiento sólo fue ligeramente significativo en el contenido en celulosa del sólido sin efecto alguno en la recuperación de glucosa por HE. Considerando los 16 experimentos totales, el modelo predijo como condiciones óptimas 7% peróxido de hidrógeno y 90 min, con las que se consiguió una deslignificación del 79% y una recuperación de glucosa por HE del 81%.

En el artículo 5 el pretratamiento estudiado fue el biológico, en este caso con la biomasa de poda de olivo sin extraer. Se evaluaron 7 hongos de podredumbre blanca (*Irpex lacteus*; *Bjerkandera*; *Lentinus tigrinus*; *Pleurotus eryngii*; *Polyporus ciliatus*; *Stereum hirsutum*; *Ganoderma lucidum*) y tres tiempos de pretratamiento (15, 30 y 45 días). Para evaluar el pretratamiento, se determinó la composición del material pretratado, la producción de enzimas ligninolíticas y el rendimiento de la hidrólisis enzimática de los sólidos biotratados. Al aumentar el tiempo de pretratamiento, la pérdida de carbohidratos se incrementó considerablemente, por ejemplo, de 6,7% a los 15 días a 21,9% a los 45 días con el hongo *I. lacteus*. Sin embargo, la eliminación de lignina no fue tan importante, tan solo un 7,1% tras 45 días de tratamiento con este mismo hongo. Los mejores resultados se obtuvieron con el hongo *I. lacteus* con un tiempo de pretratamiento de 45 días, donde se dobló la concentración de glucosa en la HE respecto al control. No obstante, no se encontró una correlación entre la pérdida de lignina, la producción de enzimas y la mejora en el rendimiento de HE. Por otra parte, también se estudió la combinación de un pretratamiento biológico con una etapa de pretratamiento con ácido diluido. Tomando como referencia el rendimiento de HE de los sólidos pretratados solo con una etapa ácida, la combinación del tratamiento biológico seguido de una etapa ácida mejoró el rendimiento en un 34%. Se observó que el orden de los pretratamientos es un factor clave, ya que el pretratamiento ácido seguido del biológico empeoró el rendimiento de HE.

En la Tabla 4.3 se recogen, a efectos comparativos, los rendimientos globales en azúcares obtenidos con las mejores condiciones de los distintos pretratamientos ensayados con la poda de olivo (artículos 1, 2, 4 y 5). En la determinación de dichos rendimientos se han tenido en cuenta los azúcares solubilizados en la etapa de extracción, en el prehidrolizado y en el hidrolizado enzimático. El rendimiento global en azúcares más bajo se obtuvo con la combinación del pretratamiento biológico seguido de una etapa ácida donde sólo se recuperó la mitad de los azúcares presentes en la materia prima original. En cambio, el mejor rendimiento global, 42,7 g de azúcares/100 g PO (que representa un 77% de los azúcares iniciales presentes en la poda de olivo), se obtuvo con el pretratamiento químico en dos etapas, la primera con ácido y la segunda con peróxido de hidrógeno en medio alcalino (artículo 4). Con esta configuración de pretratamiento, la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la etapa ácida fue muy similar a la alcanzada con el pretratamiento con ácido sulfúrico en una sola etapa a temperaturas más elevadas y tiempos más cortos (artículo 2). Comparando con el resto de pretratamientos ensayados, el pretratamiento secuencial, ácido/oxidativo-alcalino, alcanzó el mayor rendimiento global en azúcares debido a una mayor recuperación de azúcares por HE (17,7 g/100 g PO), ya que la segunda etapa alcalina consiguió una importante deslignificación del sólido haciendo más digerible la celulosa.

**Tabla 4.3.** Rendimientos globales de azúcares en las condiciones óptimas de los distintos pretratamientos aplicados a la poda de olivo

Artículo	Pretratamiento y condiciones	Azúcares recuperados en el prehidrolizado	Azúcares recuperados por HE	Rendimiento global de azúcares*	
		g/100 g PO	g/100 g PO	g/100 g PO	(%)
1	Con ácido fosfórico diluido C <sub>A</sub> : 0,5% (p/v); T: 170°C	14,2	15,0	35,8	70,6
2	Con ácido sulfúrico diluido Óptimo: C <sub>A</sub> : 0,9% (p/v); T: 164°C; 15% S/L	19,2	14,7	40,2	72,2
	Óptimo 2: C <sub>A</sub> : 1,7% (p/v); T: 160°C; 35% S/L	18,1	14,4	38,8	69,7
4	Secuencial ácido/oxidativo 1º etapa: C <sub>A</sub> : 2,4% (p/v); t: 84 min 2ª etapa: C <sub>P</sub> : 7% (p/v); t: 90 min	18,7	17,7	42,7	76,7
5	Secuencial biológico/ácido	13,7	10,3	24,0	50,2

C<sub>A</sub>: concentración de ácido; C<sub>P</sub>: concentración de peróxido de hidrógeno; S/L: relación sólido líquido; T: temperatura y t: tiempo.

\*Suma de todos los azúcares (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) recuperados en el prehidrolizado y en la hidrólisis enzimática. Se han tenido en cuenta también los azúcares solubilizados en la etapa previa de extracción acuosa (6,6 g/100 g PO en el artículo 1; 6,3 g/100 g PO en artículos 2 y 4).

Por otra parte, en el artículo 3, se recoge el estudio de una nueva estrategia de sacarificación y fermentación ensayada con la poda de olivo que incluyó la hidrólisis enzimática de los *slurries* (fracciones sólidas y líquidas resultantes del pretratamiento sin separar) obtenidos en condiciones óptimas del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido (artículo 2). Con esta configuración se obtuvo un rendimiento global de azúcares de 40,9 g/100 g PO para el óptimo 1 y 35,3 g/100 g PO para el óptimo 2. Si se compara con los resultados obtenidos con las fracciones sólidas y líquidas por separado (Tabla 4.3, artículo 2), se aprecia que los rendimientos fueron muy similares en el caso del óptimo 1 (sólo 0,7 g/100 g superior para la configuración de *slurry*), mientras que descendieron en 3,5 g/100 g de azúcares para el óptimo 2. Este descenso en el rendimiento de HE puede atribuirse a una peor transferencia de materia debida a la mayor carga de sólidos de la configuración de *slurry* del óptimo 2 (20%) frente a la carga de sólidos del *slurry* del óptimo 1 (8,5%) y a la empleada en los ensayos de HE de las fracciones sólidas por separado (5%). De estos resultados puede deducirse que los compuestos generados durante el pretratamiento ácido no inhibieron la actividad enzimática de las celulasas.

### **4.3. RENDIMIENTO EN ETANOL: FERMENTACIÓN DE AZÚCARES CELULÓSICOS Y HEMICELULÓSICOS**

Tras la etapa de pretratamiento, los azúcares solubilizados en el prehidrolizado y la glucosa hidrolizada enzimáticamente de la celulosa presente en los sólidos se fermentaron a etanol mediante diferentes microorganismos. Para los prehidrolizados se utilizó un microorganismo capaz de fermentar pentosas y hexosas, la bacteria *Escherichia coli*. En el caso de los hidrolizados enzimáticos se empleó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con una estrategia de sacarificación y fermentación simultáneas, o bien la misma *E. coli* usada en la fermentación del prehidrolizado en una estrategia de hidrólisis y fermentación secuencial. En el artículo 3 se recoge la fermentación conjunta de los azúcares celulósicos y hemicelulósicos mediante una configuración consistente en realizar la hidrólisis enzimática de las fracciones sólidas y líquidas resultantes del pretratamiento (el denominado *slurry*) de forma conjunta y posterior filtración y fermentación del hidrolizado enzimático obtenido.

#### **4.3.1. Utilización de la fracción sólida del pretratamiento para la producción de etanol**

Se utilizaron dos configuraciones diferentes para la conversión a etanol de la celulosa presente en la fracción sólida resultante del pretratamiento. Por una parte, los sólidos pretratados con ácido fosfórico se sometieron a una hidrólisis y fermentación secuencial (HFS), empleando como microorganismo en la fermentación *Escherichia coli* MS04. En este caso, la HE se realizó con una carga de sólido del 5% y una vez acabada (después de 72 h) se fermentó el hidrolizado enzimático, produciéndose en menos de 24 h el consumo de todos los azúcares (glucosa y xilosa), alcanzando una concentración final

de etanol de 4,7 g/L (artículo 1). Por otro lado, para los sólidos resultantes del pretratamiento con ácido sulfúrico en condiciones óptimas se realizó una SFS con una carga de sólidos del 15% y el microorganismo empleado fue *S. cerevisiae*. Después de 72 h de proceso, se alcanzaron concentraciones máximas de etanol de celulosa de 14,5 g/L para las condiciones de pretratamiento correspondientes al óptimo 1 (164°C, 0,9% ácido sulfúrico, 15% sólidos) y 12,6 g/L para el óptimo 2 (160°C, 1,7% ácido sulfúrico, 15% sólidos) (artículo 3). Esa misma configuración SSF se aplicó para los sólidos resultantes del pretratamiento secuencial ácido/oxidativo-alkalino aunque en este caso se probaron dos cargas de sólido diferentes, 10% y 20%. Al rendir un sólido rico en glucosa debido a la etapa de deslignificación, se obtuvieron las concentraciones más altas de etanol, 26,4 g/L cuando se empleó una carga de sólidos del 10% y 45,8 g/L con una carga del 20%. En ninguna de las muestras tomadas durante los ensayos de SFS se detectó la presencia de glucosa en el medio. Esto indica una conversión eficiente, de forma que a medida que la celulosa iba siendo hidrolizada a glucosa por las enzimas, ésta fue consumida inmediatamente por la levadura (artículo 4).

#### **4.3.2. Utilización de la fracción hemicelulósica para la producción de etanol**

Los azúcares hemicelulósicos solubilizados durante los pretratamientos con ácido diluido se fermentaron con dos cepas distintas de *Escherichia coli* modificada genéticamente, la cepa *E. coli* MS04 (artículo 1) y la cepa *E. coli* MM160 (artículos 2, 3 y 4). Además de los prehidrolizados o licores hemicelulósicos resultantes del pretratamiento, en este apartado se incluyen los hidrolizados enzimáticos, resultantes de la HE del slurry, que contienen azúcares hemicelulósicos y también celulósicos.

##### **4.3.2.1 Acondicionamiento de prehidrolizados e hidrolizados enzimáticos**

En todas las condiciones experimentales ensayadas, fue necesaria una etapa de acondicionamiento de los licores e hidrolizados antes de la fermentación a fin de reducir las concentraciones de compuestos inhibidores, especialmente en los casos en los que se empleó mayor carga de sólidos en el pretratamiento. En la Tabla 4.4 se muestra el porcentaje de eliminación de compuestos tóxicos conseguido en los prehidrolizados de ácido fosfórico (artículo 1), ácido sulfúrico (artículo 3) y de la etapa ácida del pretratamiento secuencial ácido/peróxido (artículo 4) al aplicar un procedimiento de detoxificación consistente en la adición de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  conocido como *overliming*. También se incluye la detoxificación de los hidrolizados enzimáticos recogidos en el artículo 2. Se puede observar que los mayores porcentajes de eliminación se consiguen con el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF) mientras que apenas se detecta eliminación de ácido

acético. Este tratamiento también consiguió reducciones significativas de ácido fórmico y compuestos fenólicos. En la última columna de la Tabla 4.4 se muestran las pérdidas de azúcares producidas durante este tratamiento de detoxificación y como se aprecia, en general, no son pérdidas significativas, oscilando entre 3,3 y 8,7%.

**Tabla 4.4.** Eliminación de compuestos inhibidores y pérdidas de azúcares en los prehidrolizados e hidrolizados enzimáticos durante la detoxificación por *overliming*

Artículo		Ácido Fórmico (%)	Ácido Acético (%)	HMF (%)	Furfural (%)	Compuestos fenólicos (%)	Pérdida azúcares (%)
<b>Prehidrolizado</b>							
1	ácido fosfórico	36,4	0	50	64,3	37,1	4,4
3	ácido sulfúrico (óptimo 1)	27,3	5,8	66,7	66,7	50	3,3
3	ácido sulfúrico (óptimo 2)	46,9	1,8	100	85,7	45,3	8,7
4	1ª etapa pretrat. secuencial	41,8	0	84,2	75,6	54,2	6,9
<b>*Hidrolizado enzimático</b>							
3	<i>slurry</i> óptimo 1	0	0	100	50	34,6	8,2
3	<i>slurry</i> óptimo 2	0	0	100	81,3	30	4,8

\*hidrolizados resultantes de la hidrólisis enzimática de los *slurries* del pretratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en condiciones óptimas.

HMF: hidroximetilfurfural

En los licores del pretratamiento con ácido sulfúrico, además del método de *overliming*, se ensayaron otras técnicas de detoxificación como la adsorción con carbón activo y el intercambio iónico con una resina comercial. Sin embargo, los prehidrolizados de poda de olivo detoxificados con estos dos métodos no resultaron fermentables para la cepa de *E. coli* empleada (artículo 3).

#### 4.3.2.2 Fermentación de licores hemicelulósicos e hidrolizados enzimáticos

Una vez detoxificados, los prehidrolizados se fermentaron con alguna de las dos cepas etanológicas de *E. coli* empleadas en esta tesis doctoral para producir etanol. En la Tabla 4.5 se recoge un resumen de los principales resultados obtenidos para las distintas fermentaciones llevadas a cabo.

**Tabla 4.5.** Principales resultados de la fermentación de licores hemicelulósicos e hidrolizados enzimáticos de poda de olivo con *E. coli*

Cepa <i>E. coli</i> (artículo)		C <sub>azúcar</sub> (g/L)	C <sub>etanol</sub> (g/L)	Azúcar sin consumir (%)	<sup>1</sup> R <sub>EtOH</sub> (g etanol/ g azúcar)	<sup>2</sup> R <sub>EtOH</sub> (%)	P (g/L/h)
Prehidrolizado							
MS04 (1)	Ac fosfórico	50,3	23,2	3,6	0,46	90	0,322
MM160 (3)	Ac sulfúrico (óptimo 1)	34,9	14,9	0	0,41	81	0,371
MM160 (3)	Ac sulfúrico (óptimo 2)	72,1	26,4	13,4	0,36	70	0,185
MM160 (4)	1ª etapa pretrat. secuencial	43,2	18,5	0	0,43	84	0,386
*Hidrolizado enzimático							
MM160 (3)	<i>slurry</i> óptimo 1	59,7	26,2	0	0,45	87	0,545
MM160 (3)	<i>slurry</i> óptimo 2	121,7	31,7	28,7	0,26	51	0,165

\*hidrolizados resultantes de la hidrólisis enzimática de los *slurries* del pretratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en condiciones óptimas.

<sup>1</sup>Rendimiento en etanol expresado con respecto a los azúcares inicialmente presentes en el medio.

<sup>2</sup>Rendimiento en etanol expresado como porcentaje respecto al máximo teórico (0,51g etanol/g azúcar).

P: productividad en etanol.

El valor más alto de rendimiento en etanol (90%) se obtuvo para la fermentación del prehidrolizado procedente del pretratamiento con ácido fosfórico (artículo 1), con una concentración inicial de azúcares de 50,3 g/L (con xilosa como azúcar principal, 25 g/L). En el transcurso de la fermentación, la glucosa y la arabinosa se consumieron en menos de 48 h, mientras que a las 72 h permanecían sin consumir 1,8 g/L de xilosa, alcanzándose una concentración máxima de etanol de 23,2 g/L.

En el artículo 3 se recoge la fermentación de los prehidrolizados resultantes del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido en las condiciones previamente optimizadas bajo dos criterios de optimización diferentes (artículo 2). Por una parte, se maximizó el rendimiento global en azúcares (óptimo 1, con 15% de carga de sólidos) resultando un prehidrolizado con una concentración inicial de azúcares de 34,9 g/L. Por otra parte, se maximizaron simultáneamente el rendimiento y la concentración de azúcares (óptimo 2, con 35% de carga de sólidos), alcanzándose 72,1 g/L. En ambos casos la xilosa fue el principal azúcar. En la fermentación del óptimo 1 todos los azúcares se habían consumido a las 40 h, alcanzando una concentración de etanol de 14,9 g/L con un rendimiento en etanol del 0,42 g/g de azúcar. En la fermentación del óptimo 2, tras 144 h de fermentación, quedaban sin consumir 9,3 g/L de azúcares hemicelulósicos, alcanzándose una concentración máxima de etanol de 26,4 g/L.

En el artículo 4, correspondiente a una configuración con dos etapas de pretratamiento (prehidrólisis ácida y deslignificación oxidativo alcalina), también se realizó la fermentación con *E. coli* MM160 del prehidrolizado resultante de la primera etapa de pretratamiento. La concentración de azúcares resultante (después de la

detoxificación) fue de 43,2 g/L, donde casi el 50% era xilosa. La fermentación concluyó a las 48 h, con un consumo completo de todos los azúcares, alcanzándose una concentración de etanol de 19 g/L y un rendimiento en etanol de 0,43 g/g de azúcar.

La carga de sólidos empleada en el pretratamiento tuvo una marcada influencia en la eficiencia de la fermentación de los prehidrolizados resultantes. Así, en el caso de pretratamientos donde la carga de sólidos empleada fue moderada, del 15% (pretratamiento con ácido sulfúrico en condiciones del óptimo 1, artículo 3) o 20% (etapa ácida del pretratamiento secuencial, artículo 4) se produjo un consumo completo de todos los azúcares hemicelulósicos en el transcurso de la fermentación. En cambio, en aquellos casos en los que la carga de sólidos fue muy alta, del 30% (pretratamiento con ácido fosfórico, artículo 1) o 35% (pretratamiento con ácido sulfúrico en condiciones del óptimo 2, artículo 3) se detectó un consumo incompleto de azúcares, disminuyendo el rendimiento en etanol.

En el artículo 3 se muestra una nueva configuración de proceso consistente en la hidrólisis enzimática del *slurry* (HE conjunta de las fracciones sólida y líquida resultantes del pretratamiento), seguida de la fermentación del hidrolizado enzimático obtenido. El objetivo fue disponer de una única disolución de azúcares con una mayor concentración inicial, y así poder obtener mayores concentraciones de etanol, con lo que podrían reducirse los costes de destilación del proceso. Después de la hidrólisis enzimática del *slurry*, seguida de filtración y un acondicionamiento mediante *overliming*, se obtuvieron licores con una concentración de azúcares de 59,7 g/L para el óptimo 1 y de 121,7 g/L para el óptimo 2. Con esta configuración, el principal azúcar presente en los hidrolizados enzimáticos fue la glucosa (en torno a 55% del total), a diferencia de los licores hemicelulósicos de los pretratamientos ácidos. En el caso de la fermentación del óptimo 2 se alcanzó una concentración de etanol mayor, 31,7 g/L, pero fueron necesarias 192 h de fermentación, con una fase *lag* de 96 h, y un consumo incompleto de los azúcares hemicelulósicos, por lo que el rendimiento en etanol y la productividad fueron bajos. En cambio, esta configuración para el *slurry* en las condiciones de pretratamiento del óptimo 1 dio lugar a buenos rendimientos en etanol (0,45 g/100 g), muy cercanos a los que se obtuvieron con ácido fosfórico (artículo 1), con el mayor valor de productividad, 0,545 g/L/h. Se alcanzó una concentración de etanol de 26,2 g/L, con un consumo completo de la glucosa a las 24 h y del resto de los azúcares a las 48 h.

### 4.3.3. Rendimiento global en etanol

En la Tabla 4.6 se recogen los rendimientos globales en etanol obtenidos a partir de la poda de olivo con las distintas configuraciones de proceso ensayadas en esta tesis doctoral. Los resultados se han expresado como gramos de etanol producidos a partir de 100 g de materia prima (PO). Se puede observar que el mayor rendimiento global se alcanzó con la configuración de dos etapas de pretratamiento (artículo 4), en la que se obtuvieron 15 g de etanol/100 g de PO, que representa un 60% del máximo teórico que podría obtenerse teniendo en cuenta el contenido en azúcares de la materia prima (Tabla 4.1). La Figura 4.2 muestra el balance de materia de las distintas etapas de este proceso (artículo 4). Figuras similares a esta, para las diferentes configuraciones de proceso ensayadas, aparecen recogidas en los distintos artículos que forman parte de esta tesis doctoral. Como puede observarse en la Figura 4.2, se obtuvieron 7,5 g de etanol/100 g PO en la fermentación con *E. coli* MM160 de los licores hemicelulósicos obtenidos en el pretratamiento de la poda con 2,4 % ácido sulfúrico a 130°C durante 84 minutos. Una cantidad similar de etanol se obtuvo por sacarificación y fermentación simultáneas con *S. cerevisiae* de los sólidos tras ser deslignificados con peróxido de hidrógeno en medio alcalino.

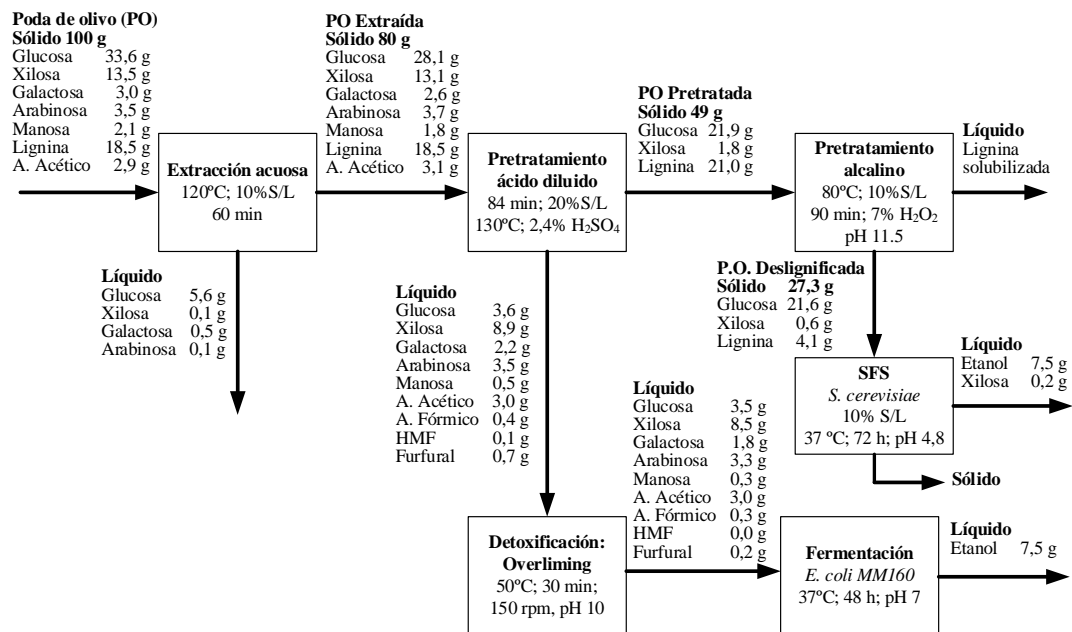
En cuanto a las configuraciones de proceso con una sola etapa de pretratamiento, el mejor resultado se obtuvo al pretratar la poda de olivo con ácido sulfúrico en las condiciones óptimas 1 (164°C; 0,9% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p/v, 15% sólidos) seguido de la hidrólisis enzimática del *slurry* y posterior fermentación del hidrolizado con *E. coli* MM160. En este caso, se alcanzó un rendimiento de 14,2 g de etanol/100 g de poda, correspondiente a un 57% respecto al máximo teórico de la materia prima (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6.** Rendimientos globales en etanol respecto a la materia prima

Artículo		Etanol producido a partir de los prehidrolizados (g/100 de PO)	Etanol producido a partir de la fracción sólida (g/100 de PO)	Rendimiento global en etanol (g/100 de PO)
	<b>Pretratamiento</b>			
1	Ac fosfórico	6,0	6,9	12,9
3	Ac sulfúrico (óptimo 1)	7,8	4,4	12,2
3	Ac sulfúrico (óptimo 2)	6,3	3,9	10,2
4	Secuencial	7,5	7,5	15,0

\*a partir de la fermentación del hidrolizado enzimático del *slurry*.

Para determinar cuál es la configuración más adecuada para la posible producción comercial de etanol a partir de biomasa de poda de olivar, sería necesaria la realización del análisis tecnoeconómico de las distintas configuraciones de proceso. Por otra parte, la recuperación de productos de valor añadido en las distintas corrientes laterales del proceso, como por ejemplo en la fracción de extractivos o en los líquidos resultantes de la etapa de deslignificación, así como la valorización del residuo sólido final, podrían contribuir al desarrollo de una biorrefinería basada en la poda del olivar, con la producción de etanol como vector energético principal.



**Figura 4.2.** Balance de materia del pretratamiento secuencial ácido/oxidativo-alcalino (artículo 4)

## 4.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN DE EXTRACTOS

Con el objetivo de valorizar la fracción de extractos de la biomasa de poda de olivo y así avanzar hacia el concepto de biorrefinería, con la obtención de diferentes productos a partir de la misma materia prima se estudió la recuperación de compuestos con capacidad antioxidante a partir de poda de olivo mediante una extracción asistida con ultrasonidos en una disolución etanol/agua (artículo 6). Se realizó un diseño de experimentos tipo Box-Behnken para evaluar la influencia de tres variables de operación: la concentración de etanol (20-80%), la amplitud o porcentaje de potencia máxima aplicada (30-70%) y el tiempo de extracción (5-15 min). El tamaño de partícula de la poda fue de 1 mm y la relación sólido/líquido 20 mL/g. Para evaluar la eficacia de la extracción se determinaron como respuestas la cantidad total de compuestos fenólicos, la cantidad total de flavonoides y la capacidad antioxidante de los extractos, analizada por tres metodologías diferentes y complementarias, cómo son los métodos DPPH, ABTS y FRAP. Las condiciones óptimas de la extracción asistida por ultrasonidos para la poda de olivo se determinaron por maximización simultánea de las cinco respuestas estudiadas. Se observó que tanto la amplitud como el tiempo de extracción afectaban positivamente a todas las respuestas en el rango experimental considerado, mientras que con el aumento de la concentración de etanol las respuestas analizadas aumentaban progresivamente hasta llegar a una concentración entorno al 50%, valor a partir del cual volvían a disminuir. Así, las condiciones óptimas de operación determinadas por el modelo fueron una concentración de etanol del 54,6% (v/v), una amplitud del 70% y un tiempo de extracción de 15 minutos. En estas condiciones, por cada gramo de poda de olivo, se obtuvieron 31 mg de polifenoles totales (expresados como ácido gálico equivalente) y 74,2 mg de flavonoides totales (expresados como rutina equivalente). Asimismo, se determinó una capacidad antioxidante en esos extractos de 31,6; 66,5; y 36,4 mg/g (expresados como mg de trolox equivalente) con los métodos DPPH, ABTS y FRAP,

respectivamente. Se trata de unos resultados prometedores de cara a una posible aplicación de la poda de olivo para obtención de antioxidantes naturales. No obstante, cabe indicar que en estos valores fueron inferiores a los determinados para la hoja de olivo que se separa en las almazaras, materia prima que también fue investigada e incluida en el artículo 6.

La técnica de extracción de ultrasonidos puede resultar de gran interés para la obtención de compuestos bioactivos a partir de poda de olivar, en el contexto de una biorrefinería. El sólido resultante de la extracción podría ser utilizado como materia prima para la obtención de bioetanol mediante pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación, en condiciones similares a las empleadas en esta tesis doctoral para la poda del olivar extraída en autoclave con agua. Por otra parte, hay que indicar que en el líquido resultante de la extracción acuosa de PO durante 60 min a 120°C en autoclave (condiciones empleadas en los artículos 1, 2, 3 y 4) se determinó una concentración de compuestos fenólicos totales de 31 mg/g PO, el mismo valor que el obtenido en el caso de la extracción asistida con ultrasonidos en condiciones óptimas, aunque en el caso de la extracción en autoclave la temperatura y el tiempo de operación fueron muy superiores.



# 5. CONCLUSIONES

---



Como resultado del trabajo de investigación que constituye esta tesis doctoral, se puede concluir que:

1. La poda de olivo resulta un material lignocelulósico con potencial para la obtención de etanol a partir de sus fracciones de celulosa y hemicelulosa.
2. La existencia de una etapa previa de extracción acuosa mejora el rendimiento de sacarificación enzimática de los sólidos pretratados y la fermentabilidad de los prehidrolizados.
3. Los pretratamientos con ácido sulfúrico y fosfórico se han mostrado eficaces, respecto de la despolimerización de la celulosa de la poda de olivo incrementando así su digestibilidad enzimática alcanzando, a la vez, buenas recuperaciones de azúcares hemicelulósicos.
4. El pretratamiento secuencial ácido/oxidativo-alcalino consigue un mayor grado de fraccionamiento de la poda de olivo y conduce al mayor rendimiento global en etanol, 15 g/100 g de poda de olivo.
5. El pretratamiento biológico de la poda de olivo consigue mejorar la digestibilidad de los sólidos pretratados respecto al control. Con el hongo de podredumbre blanca *Irpex lacteus* se obtiene los mejores rendimientos de sacarificación enzimática. La combinación de un pretratamiento biológico seguido de un pretratamiento con ácido diluido mejora el rendimiento de hidrólisis enzimática respecto a la aplicación de una única etapa ácida, alcanzando una recuperación global de azúcares del 51%.
6. La hidrólisis enzimática del *slurry* permite obtener disoluciones azucaradas más concentradas que incluyen los azúcares celulósicos y hemicelulósicos de la poda de olivo con rendimientos similares a los obtenidos en la hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados.
7. *Overliming* es el único método de acondicionamiento, de los estudiados, capaz de hacer fermentables con *E. coli* los prehidrolizados ácidos de la poda de

olivo. Este tratamiento consigue una reducción significativa del contenido en furanos y compuestos fenólicos, mientras que la concentración de ácido acético en los licores permanece prácticamente inalterada.

8. Las cepas etanológicas de *Escherichia coli* MS04 y MM160 son capaces de fermentar los azúcares celulósicos y hemicelulósicos presentes en los hidrolizados reales de poda de olivo después de una etapa de detoxificación, con un elevado rendimiento de conversión a etanol, entre 80 y 90% respecto del teórico, y con una concentración máxima de etanol de 32 g/L.
9. La poda de olivo constituye una materia prima de interés para la obtención de antioxidantes naturales. Mediante una extracción asistida con ultrasonidos en las condiciones optimizadas (54,6% etanol; 70% amplitud y 15 min) se obtienen 31 mg de compuestos fenólicos/g de poda (expresados en equivalentes de ácido gálico) y 74 mg de flavonoides/g de poda (expresados como equivalentes de rutina).
10. La propuesta de biorrefinería planteada para la poda de olivo conlleva la integración de la producción de etanol, a partir de sus fracciones de celulosa y hemicelulosa, y la obtención de antioxidantes naturales a partir de los extractos junto con la valorización de los sólidos residuales ricos en lignina.

# CONCLUSIONS

---



As a result of this research, the following conclusions can be drawn:

1. Olive tree biomass can be considered an attractive lignocellulosic material to be converted into ethanol from cellulose and hemicellulose.
2. A previous water extraction step improves the enzymatic digestibility of the olive tree biomass and the fermentability of the hemicellulosic liquors obtained after the pretreatment.
3. Phosphoric and sulfuric acid pretreatments have been tested as efficient methods to achieve the cellulose depolymerization by improving the enzymatic hydrolysis performance, keeping high recovery level of hemicellulosic sugars.
4. Sequential acid/oxidative-alkaline pretreatment allows the fractionation of olive tree biomass and achieves the maximum overall ethanol yield, 15 g/100 g biomass.
5. Biological pretreatment of olive tree biomass improves its enzymatic digestibility being *Irpex lacteus* the white-rot fungus that achieves the best enzymatic hydrolysis yields. Combined pretreatment biological/acid increases the enzymatic saccharification achieved with acid pretreatment and yields an overall sugar recovery of 51%.
6. The enzymatic hydrolysis of the slurry yields more concentrated sugar solutions, which include cellulosic and hemicellulosic sugars from olive tree biomass, with sugar recovery similar to that obtained in the enzymatic saccharification of the pretreated solid.
7. Overliming is the only tested detoxification method able to yield fermentable prehydrolysates for *E. coli*. This technique achieves a noticeable removal of furans and phenolic compounds, whilst the acetic acid concentration in the hemicellulosic liquors and enzymatic hydrolysates remains unaltered.
8. Ethanologenic strains of *Escherichia coli* MS04 and MM160 are capable of fermenting cellulosic and hemicellulosic sugars in the prehydrolysates and

enzymatic hydrolysates of olive tree biomass after a detoxification step. They achieve high ethanol yields, ranging from 80% to 90% of the theoretical ethanol yield, and a maximum ethanol concentration of 32 g/L.

9. Olive tree biomass represents an interesting feedstock to produce natural antioxidants. Using an ultrasound assisted extraction under optimal conditions (54.6% ethanol; 70% amplitude and 15 min), 31 mg phenols/g biomass (expressed as gallic acid equivalents) and 74 mg of flavonoids/g biomass (expressed as rutin equivalents) are obtained.
10. The proposal of a biorefinery based on olive tree biomass involves the integration of bioethanol production from cellulose and hemicellulose, the production of natural antioxidants from the extractives as well as the valorization of the residual lignin-rich solids.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---



- Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.-., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 340-349. doi: 10.1002/jctb.1676.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851-4861. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.
- Arora, R., Behera, S., Sharma, N.K., Kumar, S., 2015. A new search for thermotolerant yeasts, its characterization and optimization using response surface methodology for ethanol production. *Front. Microbiol.* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00889.
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cara, C., Sáez, F., Castro, E., Manzanares, P., Negro, M.J., Oliva, J.M., 2011. Effect of water extraction on sugars recovery from steam exploded olive tree pruning. *Bioresour. Technol.* 102, 6611-6616. doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.077.
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem.* 39, 1843-1848. doi: 10.1016/j.procbio.2003.09.011.
- Binod, P., Sindhu, R., Pandey, A., 2013. 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*, pp. 131-149.
- Bidlack, J.; Malone, M., Benson, R., 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science.* 72, p. 51-56.
- Brett, C. T., y Waldron, C. W. 1996. Chapter 2. The molecular component of the wall. En *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. Segunda edición. London: Chapman & Hall, 4-44.
- Cabrera, E., Muñoz, M.J., Martín, R., Caro, I., Curbelo, C., Díaz, A.B., 2014. Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. *Bioresour. Technol.* 167, 1-7. doi: 10.1016/j.biortech.2014.05.103.

- Calatrava, J., Franco, J.A., 2011. Using pruning residues as mulch: Analysis of its adoption and process of diffusion in Southern Spain olive orchards. *J. Environ. Manage.* 92, 620-629. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.09.023.
- Cara, C., Romero, I., Oliva, J.M., Sáez, F., Castro, E., 2007. Liquid hot water pretreatment of olive tree pruning residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 137-140, 379-394. doi: 10.1007/s12010-007-9066-y.
- Cara, C., Ruiz, E., Carvalheiro, F., Moura, P., Ballesteros, I., Castro, E., Gírio, F., 2012. Production, purification and characterisation of oligosaccharides from olive tree pruning autohydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 40, 225-231. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.03.017.
- Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J.M., Sáez, F., Castro, E., 2008. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.* 99, 1869-1876. doi: 10.1016/j.biortech.2007.03.037.
- Caridi, D., Trenerry, V.C., Rochfort, S., Duong, S., Laughher, D., Jones, R., 2007. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 105, 691-699. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.12.063.
- Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M., 2008. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 849-864.
- Castro, E., 2013. Other ethanologenic microorganisms. In: Anonymous *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production*, pp. 151-168.
- Castro, E., Nieves, I.U., Mullinnix, M.T., Sagues, W.J., Hoffman, R.W., Fernández-Sandoval, M.T., Tian, Z., Rockwood, D.L., Tamang, B., Ingram, L.O., 2014. Optimization of dilute-phosphoric-acid steam pretreatment of *Eucalyptus benthamii* for biofuel production. *Appl. Energy* 125, 76-83. doi: 10.1016/j.apenergy.2014.03.047.
- CE, Comisión Europea. 2014. A policy framework for climate and energy in the period from 2020 to 2030. COM(2014) 15 final.
- CE, Comisión Europea. 2015. Closing the loop - An EU action plan for the Circular Economy. COM(2015) 614 final.
- CE, Comisión Europea. 2016. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on the promotion of the use of energy from renewable sources (recast). COM(2016) 767 final/22016/0382 (COD)
- CE, Comisión Europea. 2017. Final Report. Building Up the Future. Sub Group on Advanced Biofuels. Sustainable Transport Forum. Edited by K. Maniatis, I. Landälv, L. Waldheim, E. van den Heuvel and S. Kalligeros. March 2017

- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.-., Abert-Vian, M., 2017. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 41, 357-377. doi: 10.1016/j.ifset.2017.04.016.
- Chemat, F., Zill-E-Huma, Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18, 813-835. doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.
- Cohen, M., Lepesant, G., Lamari, F., Bilodeau, C., Benyei, P., Angles, S., Bouillon, J., Bourrand, K., Landoulsi, R., Jaboeuf, D., Alonso-Roldán, M., Espadas-Tormo, I., Belandria, V., Silar, P., Dicko, M., 2017. Biomolecules from olive pruning waste in Sierra Mágina - Engaging the energy transition by multi-actor and multidisciplinary analyses. *J. Environ. Manage.* . doi: 10.1016/j.jenvman.2017.03.067.
- Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Domínguez, H., 2009. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chem.* 114, 806-812. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.017.
- Cumbre Global sobre Bioeconomía. Berlín, 2015. Bioeconomy Work for Sustainable Development.  
[http://gbs2015.com/fileadmin/gbs2015/Downloads/Communique\\_final\\_neu.pdf](http://gbs2015.com/fileadmin/gbs2015/Downloads/Communique_final_neu.pdf)  
(fecha de acceso 16 de abril de 2018)
- Cunha, M., Romaní, A., Carvalho, M., Domingues, L., 2018. Boosting bioethanol production from Eucalyptus wood by whey incorporation. *Bioresour. Technol.* 250, 256-264. doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.023.
- Demirbas, A., 2009. Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Convers. Manage.* 50, 2239-2249. doi: 10.1016/j.enconman.2009.05.010.
- Deswal, D., Gupta, R., Nandal, P., Kuhad, R.C., 2014. Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. *Carbohydr. Polym.* 99, 264-269. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.045.
- Devendra, L.P., Pandey, A., 2016. Hydrotropic pretreatment on rice straw for bioethanol production. *Renew. Energy* 98, 2-8. doi: 10.1016/j.renene.2016.02.032.
- Díaz, M.J., Cara, C., Ruiz, E., Pérez-Bonilla, M., Castro, E., 2011a. Hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Fuel* 90, 3225-3229. doi: 10.1016/j.fuel.2011.06.040.
- Díaz, M.J., Huijgen, W.J.J., Van Der Laan, R.R., Reith, J.H., Cara, C., Castro, E., 2011b. Organosolv pretreatment of olive tree biomass for fermentable sugars. *Holzforschung* 65, 177-183. doi: 10.1515/HF.2011.030.
- Díaz-Blanco, D.I., de La Cruz, J.R., López-Linares, J.C., Morales-Martínez, T.K., Ruiz, E., Rios-González, L.J., Romero, I., Castro, E., 2018. Optimization of dilute acid pretreatment of Agave lechuguilla and ethanol production by co-fermentation with

*Escherichia coli* MM160. *Ind. Crops Prod.* 114, 154-163. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.074.

Directiva 2003/30/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de mayo de 2003, relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 17.5.2003.

Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables y por la que se modifican y se derogan las Directivas 2001/77/CE y 2003/30/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 5.6.2009.

Directiva 2015/1513/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de septiembre de 2015, por la que se modifican la Directiva 98/70/CE, relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo, y la Directiva 2009/28/CE, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 15.9.2015.

Doherty, W.O.S.; Mousavioun, P., y Fellows, C.M., 2011 Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products* 33, (2), 250-276.

Duan, X., Zhang, C., Ju, X., Li, Q., Chen, S., Wang, J., Liu, Z., 2013. Effect of lignocellulosic composition and structure on the bioethanol production from different poplar lines. *Bioresour. Technol.* 140, 363-367. doi: 10.1016/j.biortech.2013.04.101.

Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M., 2014. Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production. *Fuel* 134, 448-454. doi: 10.1016/j.fuel.2014.05.084.

Dutra, E.D., Santos, F.A., Alencar, B.R.A., Reis, A.L.S., de Souza, R.F.R., Aquino, K.A.S., Morais, M.A., Jr., Menezes, R.S.C., 2018. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: status and perspectives. *Biomass Convers. Biorefinery* 8, 225-234. doi: 10.1007/s13399-017-0277-3.

Eurobserv'er. Biofuels barometer 2017 <https://www.eurobserv-er.org/biofuels-barometer-2017/> (fecha de acceso 16 de abril de 2018)

EUROSTAT. Statistical books. Energy, transport and environments indicators, 2016 edition.

Fang, L., Xie, C., Wang, H., Jin, D.-., Xu, J., Guo, Y., Ma, Y., 2014. Lignans from the roots of *Kadsura coccinea* and their inhibitory activities on LPS-induced NO production. *Phytochem. Lett.* 9, 158-162. doi: 10.1016/j.phytol.2014.06.005.

Fengel, D., Wegener, G., 1983. *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions* Walter de Gruyter

Fernández-Sandoval, M.T., Huerta-Beristain, G., Trujillo-Martinez, B., Bustos, P., González, V., Bolivar, F., Gosset, G., Martinez, A., 2012. Laboratory metabolic

- evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanogenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1291-1300. doi: 10.1007/s00253-012-4177-y.
- Frombaum, M., Le Clanche, S., Bonnefont-Rousselot, D., Borderie, D., 2012. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie* 94, 269-276. doi: 10.1016/j.biochi.2011.11.001.
- García-Aparicio, M.P., Oliva, J.M., Manzanares, P., Ballesteros, M., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., 2011. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 90, 1624-1630. doi: 10.1016/j.fuel.2010.10.052.
- García-Torreiro, M., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T.A., Lema, J.M., 2016. Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* 89, 486-492. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.05.036.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775-4800. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- Gould, J.M., 1985. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 225-231. doi: 10.1002/bit.260270303.
- Gullón, B., Gullón, P., Lú-Chau, T.A., Moreira, M.T., Lema, J.M., Eibes, G., 2017. Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Ind. Crops Prod.* 108, 649-659. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.07.014.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G., 2006. Bioethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24, 549-556. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.10.004.
- Henglein, A., Kormann, C., 1985. Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water. *Int. J. Radiat. Biol.* 48, 251-258. doi: 10.1080/09553008514551241.
- Hoyer, K., Galbe, M., Zacchi, G., 2010. Research effects of enzyme feeding strategy on ethanol yield in fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce at high dry matter. *Biotechnol. Biofuels* 3. doi: 10.1186/1754-6834-3-14.
- IDAE, Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía, 2018. <http://www.idae.es/tecnologias/energias-renovables/uso-termico/biocarburantes> (fecha de acceso: 18 de abril de 2018)
- Ilavarasi, K., Kiruthiga, P.V., Pandian, S.K., Devi, K.P., 2011. Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere* 84, 888-893. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.017.

- IRENA, IEA Bioenergy and FAO. 2017. Bioenergy for sustainable development. <http://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2017/01/BIOENERGY-AND-SUSTAINABLE-DEVELOPMENT-final-20170215.pdf> (fecha de acceso: 10 de abril de 2018)
- Ishola, M.M., Isroi, Taherzadeh, M.J., 2014. Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). *Bioresour. Technol.* 165, 9-12. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.053.
- Jin, Q., Yang, L., Poe, N., Huang, H., 2018. Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept. *Trends Food Sci. Technol.* 74, 119-131. doi: 10.1016/j.tifs.2018.02.014.
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-., 2013. Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* 6. doi: 10.1186/1754-6834-6-16.
- Jung, Y.H., Kim, K.H., 2014. Acidic Pretreatment. In: Anonymous Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies, pp. 27-50.
- Kadimaliev, D.A., Revin, V.V., Atykyan, N.A., Samuilov, V.D., 2003. Effect of Wood Modification on Lignin Consumption and Synthesis of Lignolytic Enzymes by the Fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 488-492. doi: 10.1023/A:1025448703138.
- Kallioinen, A., Hakola, M., Riekkola, T., Repo, T., Leskelä, M., Von Weymarn, N., Siika-aho, M., 2013. A novel alkaline oxidation pretreatment for spruce, birch and sugar cane bagasse. *Bioresour. Technol.* 140, 414-420. doi: 10.1016/j.biortech.2013.04.098.
- Kar, Y., Deveci, H., 2006. Importance of P-series fuels for flexible-fuel vehicles (FFVs) and alternative fuels. *Energy Sources Recovery Util. Environ. Eff.* 28, 909-921. doi: 10.1080/00908310600718841.
- Khemakhem, I., Ahmad-Qasem, M.H., Catalán, E.B., Micol, V., García-Pérez, J.V., Ayadi, M.A., Bouaziz, M., 2017. Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. *Ultrason. Sonochem.* 34, 466-473. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.010.
- Kim, D., 2018. Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A mini review. *Molecules* 23. doi: 10.3390/molecules23020309.
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 10-26. doi: 10.1007/s00253-004-1642-2.
- Kulawik, P., Özogul, F., Glew, R., Özogul, Y., 2013. Significance of antioxidants for seafood safety and human health. *J. Agric. Food Chem.* 61, 475-491. doi: 10.1021/jf304266s.

- La Cal Herrera, J.A., Jurado, F., Ogayar, B., 2012. A new model of energy valorization for olive grove by-products based on the gasification technology integrated in an olive-oil mill. *Int. J. Green Energy* 9, 661-672. doi: 10.1080/15435075.2011.625588.
- Lama-Muñoz, A., Romero-García, J.M., Cara, C., Moya, M., Castro, E., 2014. Low energy-demanding recovery of antioxidants and sugars from olive stones as preliminary steps in the biorefinery context. *Ind. Crops Prod.* 60, 30-38. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.05.051.
- Landete, J.M., 2011. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res. Int.* 44, 1150-1160. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.027.
- Li, Y., Cui, J., Zhang, G., Liu, Z., Guan, H., Hwang, H., Aker, W.G., Wang, P., 2016. Optimization study on the hydrogen peroxide pretreatment and production of bioethanol from seaweed *Ulva prolifera* biomass. *Bioresour. Technol.* 214, 144-149. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.090.
- Lima, M.D.S., Silani, I.D.S.V., Toaldo, I.M., Corrêa, L.C., Biasoto, A.C.T., Pereira, G.E., Bordignon-Luiz, M.T., Ninow, J.L., 2014. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chem.* 161, 94-103. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.109.
- Liu, C-F., y Sun, R-C. 2010. Chapter 5. Cellulose. En *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*. Editado por R-C. Sun. Amsterdam: Elsevier Science & Technology Books, 131-167.
- Liu, H., Pang, B., Zhao, Y., Lu, J., Han, Y., Wang, H., 2018. Comparative study of two different alkali-mechanical pretreatments of corn stover for bioethanol production. *Fuel* 221, 21-27. doi: 10.1016/j.fuel.2018.02.088.
- López-Linares, J.C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., 2016. Bioconversion of rapeseed straw: enzymatic hydrolysis of whole slurry and cofermentation by an ethanologenic *Escherichia coli*. *Energy Fuels* 30, 9532-9539. doi: 10.1021/acs.energyfuels.6b02308.
- López-Linares, J.C., Romero, I., Moya, M., Cara, C., Ruiz, E., Castro, E., 2013. Pretreatment of olive tree biomass with FeCl<sub>3</sub> prior enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 128, 180-187. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.076.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Erratum: Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology (*Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2002) 66:3 (506-577)). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 739. doi: 10.1128/MMBR.66.4.739.2002.
- Maina, S., Kachrimanidou, V., Koutinas, A., 2017. A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 8, 18-23. doi: 10.1016/j.cogsc.2017.07.007.

- Manzanares, P., Ruiz, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., Gallego, F.J., López-Linares, J.C., Castro, E., 2017. Residual biomass potential in olive tree cultivation and olive oil industry in Spain: Valorization proposal in a biorefinery context. *Span. J. Agric. Res.* 15. doi: 10.5424/sjar/2017153-10868.
- Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O., 2000. Effects of Ca(OH)<sub>2</sub> treatments ('overliming') on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 526-536.
- Martínez-Patiño, J.C., Romero, I., Ruiz, E., Cara, C., Romero-García, J.M., Castro, E., 2017. Design and optimization of sulfuric acid pretreatment of extracted olive tree biomass using response surface methodology. *BioResour.* 12, 1779-1797. doi: 10.15376/biores.12.1.1779-1797.
- Martínez-Patiño, J.C., Romero-García, J.M., Ruiz, E., Oliva, J.M., Álvarez, C., Romero, I., Negro, M.J., Castro, E., 2015. High solids loading pretreatment of olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by *Escherichia coli*. *Energy Fuels* 29, 1735-1742. doi: 10.1021/ef502541r.
- Martín-Sampedro, R., López-Linares, J.C., Fillat, U., Gea-Izquierdo, G., Ibarra, D., Castro, E., Eugenio, M.E., 2017. Endophytic fungi as pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of olive tree pruning. *BioMed Research International* , 1-10. doi: 10.1155/2017/9727581.
- Martín-Sampedro, R., Fillat, U., Ibarra, D., Eugenio, M.E., 2015. Use of new endophytic fungi as pretreatment to enhance enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus*. *Bioresour. Technol.* 196, 383-390. doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.088.
- Mateo, S., Roberto, I.C., Sánchez, S., Moya, A.J., 2013. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. *Ind. Crops Prod.* 49, 196-203. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.04.046.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., Pacheco, N., 2017. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy* 7. doi: 10.3390/agronomy7030047.
- Mohagheghi, A., Ruth, M., Schell, D.J., 2006. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochem.* 41, 1806-1811. doi: 10.1016/j.procbio.2006.03.028.
- Mohd Azhar, S.H., Abdulla, R., Jambo, S.A., Marbawi, H., Gansau, J.A., Mohd Faik, A.A., Rodrigues, K.F., 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem. Biophys. Rep.* 10, 52-61. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.03.003.
- Monrroy, M., Ibañez, J., Melin, V., Baeza, J., Mendonça, R.T., Contreras, D., Freer, J., 2010. Bioorganosolv pretreatments of *P. radiata* by a brown rot fungus (*Gloephyllum trabeum*) and ethanolysis. *Enzyme Microb. Technol.* 47, 11-16. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.01.009.

- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R., 2005. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96, 1986-1993. doi: 10.1016/j.biortech.2005.01.013.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2001. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.* 23, 1681-1684. doi: 10.1023/A:1012492028646.
- Nair, R.B., Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J., 2016. Bioethanol Production From Agricultural and Municipal Wastes. In: Anonymous Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Waste Management, pp. 157-190.
- Negro, M.J., Alvarez, C., Ballesteros, I., Romero, I., Ballesteros, M., Castro, E., Manzanares, P., Moya, M., Oliva, J.M., 2014. Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst. *Bioresour. Technol.* 153, 101-107. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.079.
- Negro, M.J., Manzanares, P., Ruiz, E., Castro, E., Ballesteros, M., 2017. The biorefinery concept for the industrial valorization of residues from olive oil industry. In: Anonymous Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management, pp. 57-78.
- Neto, A.C., Guimarães, M.J.O.C., Freire, E., 2018. Business models for commercial scale second-generation bioethanol production. *J. Clean. Prod.* 184, 168-178. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.02.220.
- Nieves, I.U., Geddes, C.C., Miller, E.N., Mullinnix, M.T., Hoffman, R.W., Fu, Z., Tong, Z., Ingram, L.O., 2011a. Effect of reduced sulfur compounds on the fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by ethanologenic *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* 102, 5145-5152. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.008.
- Nieves, I.U., Geddes, C.C., Miller, E.N., Mullinnix, M.T., Hoffman, R.W., Fu, Z., Tong, Z., Ingram, L.O., 2011b. Effect of reduced sulfur compounds on the fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by ethanologenic *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* 102, 5145-5152. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.008.
- NU, Naciones Unidas. 2015. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. Resolution adopted by the General Assembly on 25 September 2015.
- Oh, Y.-., Hwang, K.-., Kim, C., Kim, J.R., Lee, J.-., 2018. Recent developments and key barriers to advanced biofuels: A short review. *Bioresour. Technol.* 257, 320-333. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.089.
- Öhgren, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J., Zacchi, G., 2007. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochem.* 42, 834-839. doi: 10.1016/j.procbio.2007.02.003.

- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G., 2008. A short review on SSF - An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biofuels* 1. doi: 10.1186/1754-6834-1-7.
- 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. BOE núm. 248 de 14 de octubre de 2008.
- Orencio-Trejo, M., Utrilla, J., Fernández-Sandoval, M.T., Huerta-Beristain, G., Gosset, G., Martinez, A., 2010. Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 121, 71-107. doi: 10.1007/10\_2009\_61.
- Oroian, M., Escriche, I., 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.* 74, 10-36. doi: 10.1016/j.foodres.2015.04.018.
- Parisutham, V., Kim, T.H., Lee, S.K., 2014. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresour. Technol.* 161, 431-440. doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.114.
- Pedraza, L., Flores, A., Toribio, H., Quintero, R., Le Borgne, S., Moss-Acosta, C., Martinez, A., 2016. Sequential Thermochemical Hydrolysis of Corncobs and Enzymatic Saccharification of the Whole Slurry Followed by Fermentation of Solubilized Sugars to Ethanol with the Ethanologenic Strain *Escherichia coli* MS04. *Bioenergy Res.* 9, 1046-1052. doi: 10.1007/s12155-016-9756-9.
- Pereira Jr., N., Couto, M. A. P. G., Anna, L. M. M. S. 2008. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. *Brazilian National Library. Series on Biotechnology* 2, 12-16
- Persson, P., Andersson, J., Gorton, L., Larsson, S., Nilvebrant, N.-., Jönsson, L.J., 2002. Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5318-5325. doi: 10.1021/jf025565o.
- Philippidis, G.P., Smith, T.K., Wyman, C.E., 1993. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 846-853. doi: 10.1002/bit.260410903.
- Phitsuwan, P., Sakka, K., Ratanakhanokchai, K., 2013. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass Bioenergy* 58, 390-405. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.08.027.
- Quintero, J.A., Rincón, L.E., Cardona, C.A., 2011. Production of bioethanol from agroindustrial residues as feedstocks. In: *Anonymous Biofuels*, pp. 251-285.
- Rahmanian, N., Jafari, S.M., Wani, T.A., 2015. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends Food Sci. Technol.* 42, 150-172. doi: 10.1016/j.tifs.2014.12.009.

- Rodrigo, R., Gil, D., Miranda-Merchak, A., Kalantzidis, G., 2012. Antihypertensive Role of Polyphenols, *Adv. Clin. Chem.* 58, 225-254. doi: 10.1016/B978-0-12-394383-5.00014-X.
- Rodríguez-Lizana, A., Pereira, M.J., Ribeiro, M.C., Soares, A., Márquez-García, F., Ramos, A., Gil-Ribes, J., 2017. Assessing Local Uncertainty of Soil Protection in an Olive Grove Area with Pruning Residues Cover: A Geostatistical Cosimulation Approach. *Land Degrad. Dev.* 28, 2086-2097. doi: 10.1002/ldr.2734.
- Romero-García, J.M., Niño, L., Martínez-Patiño, C., Álvarez, C., Castro, E., Negro, M.J., 2014. Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. *Bioresour. Technol.* 159, 421-432. doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.062.
- Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R.P., Saraiva, J.A., Boussetta, N., Grimi, N., Barba, F.J., 2015. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 45, 296-310. doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.003.
- Rowell, R. M., Pettersen, R., Tshabalala, M. A., 2013. Cell Wall Chemistry. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*
- Ruiz, E., Gullón, B., Moura, P., Carvalheiro, F., Eibes, G., Cara, C., Castro, E., 2017a. Bifidobacterial growth stimulation by oligosaccharides generated from olive tree pruning biomass. *Carbohydr. Polym.* 169, 149-156. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.014.
- Ruiz, E., Romero-García, J.M., Romero, I., Manzanares, P., Negro, M.J., Castro, E., 2017b. Olive-derived biomass as a source of energy and chemicals. *Biofuel Bioprod. Biorefining* 11, 1077-1094. doi: 10.1002/bbb.1812.
- Safari, A., Karimi, K., Shafiei, M., 2017. Dilute alkali pretreatment of softwood pine: A biorefinery approach. *Bioresour. Technol.* 234, 67-76. doi: 10.1016/j.biortech.2017.03.030.
- Sagrera, G., Bertucci, A., Vazquez, A., Seoane, G., 2011. Synthesis and antifungal activities of natural and synthetic biflavonoids. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 3060-3073. doi: 10.1016/j.bmc.2011.04.010.
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 279-291. doi: 10.1007/s10295-003-0049-x.
- Saha, B.C., Nichols, N.N., Cotta, M.A., 2011. Ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5 at high solid loading. *Bioresour. Technol.* 102, 10892-10897. doi: 10.1016/j.biortech.2011.09.041.
- Saha, B.C., Yoshida, T., Cotta, M.A., Sonomoto, K., 2013. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. *Ind. Crops Prod.* 44, 367-372. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.11.025.

- Salido, S., Pérez-Bonilla, M., Adams, R.P., Altarejos, J., 2015. Phenolic Components and Antioxidant Activity of Wood Extracts from 10 Main Spanish Olive Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6493-6500. doi: 10.1021/acs.jafc.5b02979.
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, ÁT., Martínez, M.J., 2011. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102, 7500-7506. doi: 10.1016/j.biortech.2011.05.027.
- Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G., 2008. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* 32, 422-430. doi: 10.1016/j.biombioe.2007.10.014.
- Scheiterle, L., Ulmer, A., Birner, R., Pyka, A., 2018. From commodity-based value chains to biomass-based value webs: The case of sugarcane in Brazil's bioeconomy. *J. Clean. Prod.* 172, 3851-3863. doi: 10.1016/j.jclepro.2017.05.150.
- Shirkavand, E., Baroutian, S., Gapes, D.J., Young, B.R., 2016. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment - A review. *Renewable Sustainable Energy Rev* 54, 217-234. doi: 10.1016/j.rser.2015.10.003.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresour. Technol.* 199, 76-82. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.030.
- Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D., Templeton, D.W., 2010. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9043-9053. doi: 10.1021/jf1008023.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621-1651. doi: 10.3390/ijms9091621.
- Taniguchi, M., Takahashi, D., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Kouya, T., Tanaka, T., 2010. Effect of steam explosion pretreatment on treatment with *Pleurotus ostreatus* for the enzymatic hydrolysis of rice straw. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 449-452. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.04.014.
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends Anal. Chem.* 71, 100-109. doi: 10.1016/j.trac.2015.04.013.
- Toledano, A., Serrano, L., Labidi, J., 2011. Enhancement of lignin production from olive tree pruning integrated in a green biorefinery. *Ind Eng Chem Res* 50, 6573-6579. doi: 10.1021/ie102142f.
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T.J., 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason. Sonochem.* 8, 137-142. doi: 10.1016/S1350-4177(00)00033-X.

- Van Zyl, C., Prior, B. A., & Du Preez, J. C. (1988). Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 17(1-3), 357-369.
- Wan, C., Li, Y., 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Adv.* 30, 1447-1457. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.003.
- Wang, B., Wang, X., Feng, H., 2010. Deconstructing recalcitrant Miscanthus with alkaline peroxide and electrolyzed water. *Bioresour. Technol.* 101, 752-760. doi: 10.1016/j.biortech.2009.08.063.
- Wang, K., Sun, R.-., 2010. Biorefinery straw for bioethanol. In: Anonymous Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels, pp. 267-287.
- Wang, W., Yuan, T.Q., Cui, B.K., 2013. Fungal treatment followed by FeCl<sub>3</sub> treatment to enhance enzymatic hydrolysis of poplar wood for high sugar yields. *Biotechnol. Lett.* 35, 2061-2067. doi: 10.1007/s10529-013-1306-3.
- Xu, D.-., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., Li, H.-., 2017. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chem.* 217, 552-559. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.013.
- Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O., 1998. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 132-138. doi: 10.1038/sj.jim.2900496.
- Yomano, L.P., York, S.W., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 2009. Deletion of methylglyoxal synthase gene (*mgsA*) increased sugar co-metabolism in ethanol-producing *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 31, 1389-1398. doi: 10.1007/s10529-009-0011-8.
- Yu, X., He, G., Du, G., 2012. Neuroprotective effect of baicalein in patients with Parkinson's disease. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 37, 421-425. doi: 10.4268/cjcmm20120403.
- Yuan, T., Xu, F., Sun, R., 2013. Role of lignin in a biorefinery: Separation characterization and valorization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 88 (3), 346-352
- Yuan, Z., Wen, Y., Li, G., 2018. Production of bioethanol and value added compounds from wheat straw through combined alkaline/alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresour. Technol.* 259, 228-236. doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.044.
- Zabaniotou, A., 2018. Redesigning a bioenergy sector in EU in the transition to circular waste-based Bioeconomy-A multidisciplinary review. *J. Clean. Prod.* 177, 197-206. doi: 10.1016/j.jclepro.2017.12.172.

- Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G., 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable Sustainable Energy Rev* 66, 751-774. doi: 10.1016/j.rser.2016.08.038.
- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G., 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable Sustainable Energy Rev* 71, 475-501. doi: 10.1016/j.rser.2016.12.076.
- Zekovic, Z., Pintac, D., Majkic, T., Vidovic, S., Mimica-Dukic, N., Teslic, N., Versari, A., Pavlic, B., 2017. Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery—Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Ind. Crops Prod.* 99, 49-59. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.01.028.
- Zhang, H., Fan, M., Li, X., Zhang, A., Xie, J., 2018. Enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by ferric chloride catalyzed organosolv pretreatment and Tween 80. *Bioresour. Technol.* 258, 295-301. doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.004.
- Zhong, W., Yu, H., Song, L., Zhang, X., 2011. Combined pretreatment with white-rot fungus and alkali at near room-temperature for improving saccharification of corn stalks. *BioResour.* 6, 3440-3451.

# 7. ANEXO

---



# ARTÍCULO 1

---

**Título: High solid loading pretreatment of olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by *Escherichia coli***

Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Juan Miguel Romero-García, Encarnación Ruiz, José Miguel Oliva, Cristina Álvarez, Inmaculada Romero, María José Negro, Eulogio Castro

Publicación: Energy & Fuels, 29, 1735-1742 (2015)

DOI: 10.1021/ef502541r

## **Abstract**

This paper deals with a new approach for using olive tree pruning biomass as raw material for ethanol and other chemical production. This process includes a water extraction step, followed by a high solids loading dilute phosphoric acid pretreatment and an ethanogenic *Escherichia coli* fermentation for the conversion of all of the sugars released. Results show that the operational conditions leading to the maximal hemicellulosic sugar recovery in the liquid fraction (near 70%) are 170 °C and 0.5% (w/v) phosphoric acid concentration. The fermentation of the mixed sugars found in the detoxified prehydrolysates by ethanogenic *E. coli* MS04 led to an ethanol concentration of 23 g/L and an ethanol yield of 0.46 g of ethanol/g of sugars consumed. When the ethanol production from the pretreated solids after enzymatic hydrolysis is also taken into account, 13.2 g of ethanol/100 g of original material was obtained. The production of other interesting compounds is also considered.

# ARTÍCULO 2

---

**Título: Design and optimization of sulfuric acid pretreatment of extracted olive tree biomass using response surface methodology**

**Autores:** José Carlos Martínez-Patiño, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Cristóbal Cara, Juan Miguel Romero-García, Eulogio Castro

**Publicación:** BioResources 12(1), 1779-1797 (2017)

**DOI:** 10.15376/biores.12.1.1779-1797

## **Abstract**

Olive tree biomass (OTB) represents an interesting feedstock for bioethanol production. In this study, olive tree pruning was water extracted and pretreated by dilute sulfuric acid to achieve high sugar recoveries from cellulosic and hemicellulosic fractions. Temperature (160 to 200 °C), acid concentration (0 to 8 g acid/100 g extracted raw material), and solids loading (15% to 35% w/v) were selected as operation variables and modified according to a Box-Behnken experimental design. The optimal conditions for the acid pretreatment were 160 °C, 4.9 g sulfuric acid/100 g biomass, and 35% solids loading (w/v), according to multiple criteria that considered the maximization of both the hemicellulosic sugars concentration in prehydrolysate and the overall sugar yield. These optimized conditions yielded a sugar concentration of 79.8 g/L, corresponding to an overall yield of 39.8 g total sugars/100 g extracted OTB. The fermentability of hemicellulosic sugars prehydrolysates from the acid pretreatment was evaluated by *Escherichia coli* after a detoxification stage by overliming. The prehydrolysates with lower concentrations of toxic compounds were fermented and achieved ethanol yields higher than 80% of the theoretical ethanol yield.

# ARTÍCULO 3

---

**Título: Advanced bioethanol production from olive tree biomass using different bioconversion schemes**

**Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Encarnación Ruiz, Cristóbal Cara, Inmaculada Romero, Eulogio Castro**

**Publicación: Biochemical Engineering Journal, 137, 172-181 (2018)**

**DOI: 10.1016/j.bej.2018.06.002**

## **Abstract**

In this work, olive tree biomass (OTB) was pretreated with sulfuric acid at previously optimized conditions according to two different criteria optimization. Then, two schemes of saccharification and fermentation were tested to evaluate the potential of bioethanol production from olive tree biomass pretreated under both optimal conditions. The best results of ethanol production were achieved from OTB pretreated at 15% solids, 164°C and 0.89% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. However, when OTB was pretreated at 35% solids, 160°C, and 1.72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, more concentrated sugar solutions were obtained but the ethanogenic microorganism was not capable of assimilating all sugars in the medium. Therefore, the highest ethanol yield, 0.45 g ethanol/g sugar (88% of the theoretical ethanol yield), corresponding to 14.4 g ethanol/100 g raw OTB was achieved when OTB was pretreated at 15% solids using a new bioconversion scheme for this feedstock. It consisted of the enzymatic hydrolysis of the whole slurry from the pretreatment followed by the co-fermentation of cellulosic and hemicellulosic sugars by a recombinant ethanogenic *Escherichia coli* MM160.

# ARTÍCULO 4

---

**Título: Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production**

**Autores:** José Carlos Martínez-Patiño, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Cristóbal Cara, Juan Carlos López-Linares, Eulogio Castro

**Publicación:** Bioresource Technology 239, 326-335 (2017)

**DOI:** 10.1016/j.biortech.2017.04.102

## **Abstract**

Olive tree biomass (OTB) can be used for producing second generation bioethanol. In this work, extracted OTB was subjected to fractionation using a sequential acid/alkaline oxidative pretreatment. In the first acid stage, the effects of sulfuric acid concentration and reaction times at 130 °C were investigated. Up to 71% solubilization of hemicellulosic sugars was achieved under optimized conditions (2.4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 84 min). In the second stage, the influence of hydrogen peroxide concentration and process time were evaluated at 80 °C. Approximately 80% delignification was achieved under the best operational conditions (7% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 90 min) within the experimental range studied. This pretreatment produced a substrate with 72% cellulose that was highly accessible to enzymatic attack, yielding 82 g glucose/100 g glucose in delignified OTB. Ethanol production from both hemicellulosic sugars solubilized in the acid pretreatment and glucose from enzymatic hydrolysis of delignified OTB yielded 15 g ethanol/100 g OTB

# ARTÍCULO 5

---

**Título: Application of a combined fungal and dilute acid pretreatment on olive tree biomass**

**Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Thelmo A. Lu-Chau, Beatriz Gullón, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Eulogio Castro, Juan M. Lema**

**Publicación: Industrial Crops and Products, 121, 10-17 (2018)**

**DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.04.078**

## Abstract

A biological pretreatment of olive tree biomass (OTB) was carried out. First, seven white-rot fungi (WRF) were screened on solid-state fermentations by analyzing the substrate composition, ligninolytic enzymes production and enzymatic hydrolysis yields at three different pretreatment times (15, 30 and 45 days). Glucose released by enzymatic hydrolysis of OTB pretreated with *Irpex lacteus* for 45 days doubled that obtained with the control (non-inoculated). In addition, to enhance this yield, the combination of fungal pretreatment with a chemical pretreatment was studied. It was also found that the order of the pretreatment combination has a relevant effect on the glucose yield. Thereby, the best option determined, fungal pretreatment with *I. lacteus* after 28 days of culture followed by diluted acid pretreatment (2% w/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 130 °C and 90 min), enhanced 34% the enzymatic hydrolysis yield compared with the acid pretreatment alone. Applying the best pretreatment combination, the overall sugar yield of the whole process (sequential pretreatment plus enzymatic hydrolysis) was 51% of the theoretical yield.

# ARTÍCULO 6

---

**Título: Optimization of ultrasound- assisted extraction of biomass from olive trees using response surface methodology**

Autores: José Carlos Martínez-Patiño, Beatriz Gullón, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Mladen Brnčić, Jana Šic Žlabur, Eulogio Castro

Publicación: Ultrasonics Sonochemistry

DOI: [10.1016/j.ultsonch.2018.05.031](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.031)

## **Abstract**

Olive tree pruning biomass (OTP) and olive mill leaves (OML) are the main residual lignocellulosic biomasses that are generated from olive trees. They have been proposed as a source of value-added compounds and biofuels within the biorefinery concept. In this work, the optimization of an ultrasound-assisted extraction (UAE) process was performed to extract antioxidant compounds present in OTP and OML. The effect of the three parameters, ethanol/water ratio (20, 50, 80% of ethanol concentration), amplitude percentage (30, 50, 70%) and ultra-sonication time (5, 10, 15 min), on the responses of total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activities (DPPH, ABTS and FRAP) were evaluated following a Box–Behnken experimental design. The optimal conditions obtained from the model, taking into account simultaneously the five responses, were quite similar for OTP and OML, with 70% amplitude and 15 min for both biomasses and a slight difference in the optimum concentration of ethanol. (54.5% versus 51.3% for OTP and OML, respectively). When comparing the antioxidant activities obtained with OTP and OML, higher values were obtained for OML (around 40% more than for OTP). The antioxidant activities reached experimentally under the optimized conditions were 31.6 mg of TE/g of OTP and 42.5 mg of TE/g of OML with the DPPH method, 66.5 mg of TE/g of OTP and 95.9 mg of TE/g of OML with the ABTS method, and 36.4 mg of TE/g of OTP and 49.7 mg of TE/g of OML with the FRAP method. Both OTP and OML could be a potential source of natural antioxidants