



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL

•

**PRODUCCIÓN DE FURFURAL Y
BIOETANOL A PARTIR DE HUESO DE
ACEITUNA**

**PRESENTADA POR:
CARMEN PADILLA RASCÓN**

**DIRIGIDA POR:
DRA. ENCARNACIÓN RUIZ RAMOS
DR. EULOGIO CASTRO GALIANO**

JAÉN, FEBRERO DE 2022

ISBN

Agradecimientos

En estas primeras líneas me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han colaborado de una forma u otra a la elaboración de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar a mis directores de Tesis, la Dra. Encarnación Ruiz Ramos y el Dr. Eulogio Castro Galiano, por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar con vosotros y formar parte de vuestro grupo de investigación. Muchas gracias por acogerme tan bien, por atenderme siempre con amabilidad y una sonrisa, por vuestra cercanía, dedicación, interés y compromiso, así como la incansable ayuda, apoyo e implicación en la elaboración de esta Tesis Doctoral.

Me gustaría realizar una especial mención al Dr. Cristóbal Cara Corpas, por acompañarme en mis inicios, gracias por todo lo que me has enseñado, ayudado y apoyado, siempre te estaré agradecida por haber estado ahí en mis comienzos.

A los Drs. Inmaculada Romero, Antonia de Torres, Manuel Moya y Francisco Espínola, a nuestra técnica Mariola de La Casa y al resto de doctores del grupo de investigación TEP-233 del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, por vuestra disponibilidad y amabilidad en todo momento.

A Irene, mi compañera desde mis inicios en esta Tesis Doctoral, por tantos momentos compartidos y tantas cosas que nunca olvidaremos, porque esto no se queda aquí y nos queda mucho por recorrer.

A mis compañeros de laboratorio, con los que he compartido tantos buenos momentos y me han acompañado a lo largo de estos años, gracias por vuestro apoyo y ayuda, Juan Miguel, Juan Carlos, M^a del Mar, Alfonso, Sonia y Antonio Muñoz. También a todos con los que han pasado por nuestros laboratorios durante estos años, Manuel, Valeria, Dani, Rubén, Carlos, Antonio Lama, José Manuel, Karol, Claudia, Laura, María, Yadira, Diego y Ángel.

A los Drs. Florbela Carvalheiro, Luís C. Duarte y Luisa B. Roseiro del Laboratorio Nacional de Energía y Geología (LNEG) de Lisboa, por recibirme en vuestro grupo y estar siempre ahí a pesar de las adversidades, por hacerme sentir como en casa, por acogerme como parte de vuestra familia, por vuestro cariño, por cuidarme y apoyarme en todo momento, muchas gracias y espero que volvamos a vernos.

A José, por acompañarme durante esta etapa, por tu ayuda, cariño y ánimos en todo momento. Gracias por saber sacarme siempre una sonrisa.

A mis padres, Pepi y Juan Miguel, y a mi hermana Mariasun, por estar siempre ahí para todo lo que he necesitado, apoyándome y animándome con paciencia y cariño, sin vosotros esta Tesis Doctoral no habría sido posible.

A mis abuelos Asunción y Pepe, por vuestro apoyo incondicional desde siempre y para siempre.

A todas las personas que de una forma directa o indirecta han contribuido en esta bonita etapa de mi vida.

Por último, agradecer la colaboración de diferentes instituciones que han permitido la realización de esta Tesis Doctoral:

- *Universidad de Jaén por la concesión de una “ayuda predoctoral para la Formación de Personal Investigador”, con cargo a la Acción 4 del Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén y una ayuda para estancias breves del Personal Investigador en Formación encaminada a la obtención del título de Doctor con mención internacional (Acción 6), con cargo al Plan de Apoyo a la investigación.*
- *Al grupo de investigación “Ingeniería Química y Ambiental” (TEP-233), por la financiación de los distintos congresos y jornadas.*

ÍNDICE

Índice.....	1
Resumen.....	3
Abstract	7
1. Introducción	11
1.1. Contexto energético y medioambiental	13
1.2. Biorrefinerías.....	17
1.2.1. Biomasa lignocelulósica	18
1.2.2. Biomasa del olivar	21
1.2.3. El hueso de aceituna	26
1.3. Fraccionamiento.....	28
1.3.1. Pretratamiento	28
1.3.2. Hidrólisis enzimática.....	34
1.4. Producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica	36
1.4.1. Obtención y aplicaciones del bioetanol	36
1.4.2. Compuestos inhibidores y detoxificación	38
1.4.3. Fermentación	41
1.4.4. Configuración de proceso para la obtención de bioetanol	43
1.5. Producción de furfural a partir de biomasa lignocelulósica.....	46
1.5.1. El furfural: relevancia y principales aplicaciones	46
1.5.2. Cinética de reacción	48
1.5.3. Proceso industrial de obtención de furfural	51
1.5.4. Configuración de proceso para la obtención de furfural	53
1.6. Valorización de lignina	57
2. Hipótesis y objetivos	59
3. Resumen de resultados y discusión conjunta	63
3.1. Materia prima.....	70
3.2. Pretratamiento e hidrólisis enzimática: rendimiento en azúcares	72
3.3. Producción de etanol	78
3.4. Producción de furfural	81
3.5. Recuperación de la fracción de lignina	84
3.6. Consideración final.....	87
4. Conclusiones.....	89
Conclusions.....	93

Referencias.....	95
Anexos.....	111
Artículo 1.....	113
Artículo 2.....	115
Artículo 3.....	117
Artículo 4.....	119
Artículo 5.....	121
Artículo 6.....	123
Contribuciones a congresos.....	125

Resumen

La presente Tesis Doctoral titulada “Producción de furfural y bioetanol a partir de hueso de aceituna”, pretende contribuir al desarrollo de una biorrefinería basada en esta materia prima, mediante el estudio de procesos de conversión a escala de laboratorio, principalmente para la obtención de furfural y etanol, dos compuestos químicos con gran potencial de aplicación. Este trabajo se enmarca en las líneas de investigación del Grupo “Ingeniería Química y Ambiental” TEP-233 de la Universidad de Jaén sobre el aprovechamiento de biomásas derivadas del cultivo del olivar y del proceso de fabricación del aceite de oliva.

Las principales etapas del proceso de obtención del aceite de oliva son la molienda de la aceituna, el batido de la pasta y la separación por centrifugación del aceite del resto de la mezcla, un subproducto semisólido denominado orujo, que se lleva a industrias extractoras de aceite de orujo (orujeiras) para recuperar el aceite residual que contiene. En los últimos años, la separación del hueso de las aceitunas molidas o del orujo se ha convertido en una práctica frecuente, debido a su uso como combustible en pequeñas calderas industriales y domésticas. La alta disponibilidad de hueso molido, localizado en almazaras y extractoras, supone una ventaja de tipo logístico para su valorización.

La utilización del hueso de aceituna como fuente de biocarburantes y de otros bioproductos, junto con otras biomásas procedentes del olivar y de sus industrias asociadas, puede tener un impacto muy positivo desde el punto de vista medioambiental y socioeconómico en las regiones productoras. La implantación de este tipo de biorrefinerías podría contribuir significativamente al mantenimiento de la actividad en zonas rurales, generando empleo y revalorizando la industria del aceite de oliva. La utilización de nuevas materias primas de origen renovable, que podrían sustituir a las de origen fósil, supone una importante contribución a la lucha contra el calentamiento global y al desarrollo de la bioeconomía.

En esta Tesis Doctoral se han estudiado diferentes estrategias para el aprovechamiento de las tres fracciones mayoritarias que componen el hueso de aceituna (hemicelulosa, celulosa y lignina) que implican la aplicación de diferentes tratamientos químicos, físico-químicos y procesos de conversión biológicos.

Como primera etapa de proceso, se ha planteado el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido para la solubilización de la fracción hemicelulósica, estudiando la influencia de

distintas variables de operación en reactores tipo autoclave y a presión (temperatura, concentración de ácido y relación sólido/líquido) mediante el desarrollo de diferentes diseños experimentales y el análisis de los resultados aplicando la metodología de superficie de respuesta. En las condiciones optimizadas, se consigue recuperar la mayor parte de la hemicelulosa en la fracción líquida (hidrolizado), alcanzándose elevadas concentraciones de xilosa, el azúcar mayoritario. Estos hidrolizados ricos de xilosa se han dedicado principalmente a la producción de furfural. En la fracción sólida se recupera la mayor parte de la celulosa y la lignina, aunque la celulosa no es susceptible de sacarificación mediante enzimas, por lo que resulta necesaria la aplicación de una segunda etapa de pretratamiento para el aprovechamiento de esta fracción, que se ha orientado a la producción de etanol.

Como segunda etapa de proceso, se han ensayados distintos pretratamientos físico-químicos como la explosión por vapor y tratamientos de deslignificación mediante oxidación alcalina con peróxido de hidrógeno y mediante organosolvente (etanol/agua). Se ha estudiado la influencia de distintas condiciones experimentales en los rendimientos de hidrólisis enzimática, que resultan notablemente mejorados, en condiciones optimizadas, con respecto a la primera etapa de pretratamiento. En el caso de los tratamientos deslignificantes, el sólido queda especialmente enriquecido en celulosa, por la solubilización de buena parte de la lignina en la fracción líquida, susceptible también de ser aprovechada.

El estudio de la producción de furfural se inició con un análisis de la influencia de las principales variables de proceso con disoluciones de xilosa sintética, mediante catálisis homogénea en un reactor de microondas. Se varió la temperatura y el tiempo de operación, empleando como catalizadores el ácido sulfúrico y cloruro férrico. Con base en los resultados obtenidos, se ha abordado la producción de furfural a partir de hidrolizados de hueso de aceituna obtenidos en distintas condiciones, ensayando el empleo de distintas sales metálicas como catalizador. La presencia del ácido sulfúrico utilizado en el pretratamiento, así como de otros ácidos presentes en los hidrolizados, tiene un efecto positivo en los rendimientos en furfural. Con las condiciones optimizadas en las distintas estrategias de proceso ensayadas, se han alcanzado concentraciones de furfural de entre 18 y 26,5 g/L, con rendimientos de entre el 63 y 46 %, dependientes de la concentración inicial de xilosa presente en los hidrolizados.

La producción etanol se ha abordado fundamentalmente a partir de la glucosa procedente de la fracción celulósica del hueso de aceituna. En una de las estrategias de proceso ensayadas (pretratamiento ácido seguido de explosión por vapor), se ha estudiado también la posibilidad de obtener etanol conjuntamente de los azúcares

hemicelulósicos y celulósicos, mediante distintas configuraciones de proceso, empleando microorganismos capaces de fermentar tanto hexosas como pentosas. Aunque se ha conseguido obtener etanol de ambos tipos de azúcares, con un rendimiento de 16 g etanol /100g hueso, la fermentación de azúcares hemicelulósicos requiere de varias etapas de detoxificación y parte de la xilosa queda sin consumir. La aplicación de un proceso de presacarificación y fermentación simultáneas resulta eficiente para la producción de etanol a partir de la celulosa, llegándose a alcanzar 47 g/L de etanol, con un 61 % de rendimiento, a partir de la fracción sólida rica en celulosa obtenida de una segunda etapa de pretratamiento de deslignificación por organosolvente. Esta concentración supera ampliamente a la mínima requerida (4%) para hacer viable la separación de etanol por destilación industrialmente.

Finalmente, se han iniciado estudios del potencial de aprovechamiento de la lignina solubilizada en los pretratamientos de deslignificación aplicados. Por una parte, se ha detectado la presencia de compuestos fenólicos de interés derivados de la lignina y, por otra, se ha recuperado por precipitación parte de la lignina solubilizada. Los resultados obtenidos son prometedores, indicando que la valorización de la fracción de lignina puede contribuir, junto con la producción de furfural de la fracción hemicelulósica y etanol de la fracción celulósica, a la viabilidad de una biorefinería basada en el hueso de aceituna como materia prima.

Abstract

This Doctoral Thesis entitled "Production of furfural and bioethanol from olive stones", aims to contribute to the development of a biorefinery based on this raw material, by studying conversion processes on a laboratory scale, mainly to obtain furfural and ethanol, two chemical compounds with great potential for application. This work is part of the research lines of the "Chemical and Environmental Engineering" Group TEP-233 of the University of Jaén on the use of biomasses derived from olive cultivation and the olive oil production process.

The main stages in the process of obtaining olive oil are the crushing of the olives, the malaxation of the paste and the separation by centrifugation of the oil from the rest of the mixture, a semi-solid by-product called pomace, which is taken to pomace oil extracting industries to recover the residual oil it contains. In recent years, the separation of the olive stones from the crushed olives or pomace has become a frequent practice, due to its use as fuel in small industrial and domestic boilers. The high availability of crushed olive stones, located in olive mills and extractors, is a logistical advantage for its recovery.

The use of olive stones as a source of biofuels and other bioproducts, together with other biomasses from olive groves and associated industries, can have a very positive environmental and socio-economic impact in the producing regions. The implementation of this type of biorefineries could make a significant contribution to maintaining activity in rural areas, generating employment and revaluing the olive oil industry. The use of new raw materials of renewable origin, which could replace those of fossil origin, represents an important contribution to the fight against global warming and the development of the bioeconomy.

In this Doctoral Thesis, different strategies have been studied for the use of the three major fractions that make up the olive stones (hemicellulose, cellulose and lignin) that involve the application of different chemical, physico-chemical and biological conversion processes.

As a first process stage, pre-treatment with dilute sulphuric acid has been proposed for the solubilisation of the hemicellulose fraction, studying the influence of different operating variables in autoclave and pressure reactors (temperature, acid concentration and solid/liquid ratio) through the development of different experimental designs and the

analysis of the results by applying the response surface methodology. Under the optimised conditions, most of the hemicellulose is recovered in the liquid fraction (hydrolysate), reaching high concentrations of xylose, the major sugar. These xylose-rich hydrolysates have been mainly used for the production of furfural. In the solid fraction, most of the cellulose and lignin are recovered, although cellulose is not amenable to saccharification by enzymes, so a second pre-treatment stage is necessary for the utilisation of this fraction, which has been oriented towards ethanol production.

As a second process stage, different physicochemical pre-treatments have been tested, such as steam explosion and delignification treatments by alkaline oxidation with hydrogen peroxide and by organosolv (ethanol/water). The influence of different experimental conditions on the enzymatic hydrolysis yields has been studied, which are significantly improved, under optimised conditions, with respect to the first pre-treatment stage. In the case of delignification treatments, the solid is particularly enriched in cellulose, due to the solubilisation of a large part of the lignin in the liquid fraction, which can also be used.

The study of furfural production started with an analysis of the influence of the main process variables with synthetic xylose solutions, by means of homogeneous catalysis in a microwave reactor. The temperature and operation time were varied, using sulphuric acid and ferric chloride as catalysts. Based on the results obtained, the production of furfural from olive stones hydrolysates obtained under different conditions has been addressed, testing the use of different metal salts as catalyst. The presence of the sulphuric acid used in the pre-treatment, as well as other acids present in the hydrolysates, has a positive effect on the furfural yields. With the optimised conditions in the different process strategies tested, furfural concentrations between 18 and 26.5 g/L have been achieved, with yields between 63 and 46 %, depending on the initial concentration of xylose present in the hydrolysates.

Ethanol production has been approached mainly from glucose from the cellulosic fraction of the olive stones. In one of the process strategies tested (acid pretreatment followed by steam explosion), the possibility of obtaining ethanol from both hemicellulosic and cellulosic sugars has also been studied, by means of different process configurations, using microorganisms capable of fermenting both hexoses and pentoses. Although ethanol has been obtained from both types of sugars, with a yield of 16 g ethanol/100 g olive stones, the fermentation of hemicellulosic sugars requires several detoxification stages and part of the xylose remains unconsumed. The application of a simultaneous pre-saccharification and fermentation process is efficient for the production of ethanol from cellulose, reaching 47 g/L ethanol, with a 61 % yield, from the cellulose-rich solid

fraction obtained from a second pretreatment stage of organosolvent delignification. This concentration is well above the minimum concentration required (4%) to make ethanol separation by industrial distillation feasible.

Finally, studies have been initiated on the potential for utilisation of solubilised lignin in the applied delignification pretreatments. On the one hand, the presence of phenolic compounds of interest derived from lignin has been detected and, on the other hand, part of the solubilised lignin has been recovered by precipitation. The results obtained are promising, indicating that the valorisation of the lignin fraction can contribute, together with the production of furfural from the hemicellulosic fraction and ethanol from the cellulosic fraction, to the viability of a biorefinery based on olive stone as a raw material.

1. Introducción



1.1. Contexto energético y medioambiental

En los últimos años, el crecimiento de la población mundial ha provocado una mayor demanda de alimentos, recursos y combustibles, lo que conlleva el agotamiento de los recursos naturales. La creciente demanda de productos que provienen de recursos fósiles está provocando múltiples impactos ambientales y sobre los recursos naturales. La gran dependencia de los recursos fósiles unido al crecimiento poblacional está contribuyendo al aumento de los gases de efecto invernadero (NO_x, SO_x y CO_x), lo que está provocando problemas medioambientales como el calentamiento global, que conlleva consecuencias como deshielos, inundaciones, desertificación, alteración de ecosistemas, etc. Esto sumado a la reducción de las reservas de materias primas fósiles y la consiguiente subida de su precio, han llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de materias primas renovables.

La energía eólica, solar, de la biomasa y otras energías limpias renovables han recibido una especial atención debido a las ventajas medioambientales que presentan. Más concretamente, la energía de biomasa es una fuente natural de energía renovable, se puede obtener de múltiples orígenes, posee abundantes reservas y bajos precios, teniendo un gran potencial para reemplazar la energía fósil tradicional y también como materia prima para la obtención de productos químicos (Ye et al., 2021).

La sustitución de los combustibles fósiles en el transporte por fuentes energéticas renovables es una de las líneas prioritarias en las políticas internacionales para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, ya que suponen el 20 % de las emisiones de CO₂ a la atmósfera a nivel mundial (Martínez-Patiño et al., 2018). El 11 de diciembre de 1997 en Kioto (Japón), se realizó el primer acuerdo internacional promovido por las Naciones Unidas sobre el cambio climático, éste entró en vigor el 16 de febrero de 2005 debido a su complejo proceso de ratificación. Según este acuerdo, la Unión Europea se comprometía a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, principales causantes del calentamiento global, en un 8 % del 2008 al 2012.

En 2011 entró en vigor la Directiva 2009/28/CE y del Consejo de 23 de abril de 2009 del Parlamento Europeo sobre Energías Renovables, la cual establece:

- Al menos el 20 % de la energía consumida debe de ser de origen renovable, de la cual al menos el 10 % debe pertenecer al sector transporte.
- Una reducción del 20 % de las emisiones de gases de efecto invernadero para el año 2020 respecto 1990.



El Real Decreto 1597/2011, de 4 de noviembre, por el que se regulan los criterios de sostenibilidad de los biocarburantes y biolíquidos, el Sistema Nacional de Verificación de la Sostenibilidad y el doble valor de algunos biocarburantes a efectos de su cómputo, define, en su artículo 2, a los biocombustibles como “combustible líquido o gaseoso utilizado para el transporte, producido a partir de la biomasa”. Los biocombustibles pueden obtenerse a partir de cultivos alimentarios (biocombustibles convencionales o de primera generación) o a partir de residuos industriales, forestales y agrícolas (biocombustibles avanzados o de segunda generación). Buena parte de los biocombustibles obtenidos son convencionales, generando una controversia social por su competitividad alimentaria. Para paliar esta problemática, en el 2014 se llegó a un acuerdo por el Consejo Europeo (7550/14. PRESSE 138, 2014) para modificar la legislación vigente en ese momento, se fijó que del 10 % mínimo de energías renovables destinadas al sector transporte, al menos el 0,5 % tiene que provenir de biocombustibles avanzados.

La Directiva 2009/28/CE y del Consejo de 23 de abril de 2009 fue derogada por la Directiva (UE) 2018/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de diciembre de 2018 relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. Fija objetivos más ambiciosos para la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero y el aumento del uso de energías renovables, concretamente establece que:

- Al menos el 32 % del consumo final bruto de energía proceda de fuentes renovables para el año 2030.
- Al menos el 14 % del consumo energético del transporte tiene que provenir de fuentes renovables y al menos el 3,5 % del mismo debe provenir de biocarburantes avanzados para el año 2030.

A nivel internacional se han firmado diferentes acuerdos sobre el cambio climático para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. El primero de ellos fue el ya mencionado Protocolo de Kioto, el cual expiró el 31 de diciembre de 2012. Posteriormente, se celebró la Cumbre de París el 12 de diciembre de 2015, presentándose un plan de actuación para limitar el efecto invernadero; en el acuerdo participaron 196 países. Se fijó el objetivo principal de “mantener el aumento de la temperatura media mundial muy por debajo de 2 °C con respecto a los niveles preindustriales y proseguir los esfuerzos para limitar ese aumento a 1,5 °C” (Naciones Unidas. FCCC/CP/2015/L.9, 2015, artículo 2.1). El acuerdo entró en vigor el 4 de noviembre de 2016, tras la ratificación de mínimo 55 países, lo que representa al menos

el 55 % de los gases de efecto invernadero mundiales. Se preveía que en 2030 con este acuerdo las emisiones de gases de efecto invernadero mundiales podrían reducirse notablemente en sectores que suponen más del 70 % de las emisiones.

El 11 de diciembre de 2019 la Unión Europea lanzó el Pacto Verde Europeo o “Green Deal”, su objetivo principal es que Europa sea el primer continente climáticamente neutro, reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero en un 55 % para 2030 (en comparación con 1990) y logrando la neutralidad de carbono en 2050. Establece un plan de acción para promover una economía limpia y circular que haga un uso eficiente de los recursos, reduciendo la contaminación y restaurando la biodiversidad.

El 9 de julio de 2021 se aprobó el Reglamento (UE) 2021/1119 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de junio de 2021 por el que se establece el marco para lograr la neutralidad climática y se modifican los Reglamentos (CE) nº 401/2009 y (UE) 2018/1999 («Legislación europea sobre el clima»). Surgió motivado por el Acuerdo de París, el Pacto Verde Europeo, el Informe especial de 2018 del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) y por la necesidad de abordar los crecientes riesgos para la salud relacionados con el clima; su principal objetivo es conseguir ser el primer continente climáticamente neutro para 2050. Convierte en ley el objetivo establecido por el Pacto Verde Europeo y pretende garantizar que todas las políticas de la Unión Europea contribuyan a este objetivo. Las principales medidas establecidas son:

- Mantiene la planificación de la reducción de emisiones establecida por el Pacto Verde Europeo.
- Reconoce la necesidad de mejorar el sumidero de carbono europeo.
- Instituir el Consejo Consultivo Científico Europeo sobre Cambio Climático, que proporcionará asesoramiento científico independiente.
- Realizar disposiciones más estrictas sobre la adaptación al cambio climático.
- Establece un compromiso con emisiones negativas después de 2050.
- Los Estados miembros adoptarán y aplicarán estrategias y planes de adaptación nacionales, que deberán ser actualizados periódicamente y serán evaluados cada 5 años por parte de la Unión Europea.

A nivel nacional y previo al Reglamento (UE) 2021/1119 se aprobó la Ley 7/2021, de 20 de mayo de 2021, de cambio climático y transición energética. Esta ley nacional surge por la necesidad de asumir las obligaciones firmadas en la Cumbre de París en 2015 sobre cambio climático, para la reducción de gases de efecto invernadero; además está



en concordancia con el Pacto Verde Europeo. Tiene como principal objetivo reducir de las emisiones de gases de efecto invernadero, promover el uso de las energías renovables y la eficiencia energética, para ello se han fijado dos etapas temporales en las que se deben cumplir unos objetivos:

2030:

- Reducir las emisiones de efecto invernadero al menos en un 23 %, respecto al año 1990.
- Que al menos el 42 % de la energía consumida tenga un origen renovable.
- Que al menos el 74 % de la energía eléctrica tenga un origen renovable.
- Disminuir al menos en un 39,5 % el consumo de energía primaria.

2050:

- Alcanzar la neutralidad climática.
- Que la totalidad de la energía eléctrica tenga un origen renovable.

La última medida que se ha llevado a cabo relacionada con el cambio climático ha sido la organización de la 26ª Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático de 2021 (COP26); ha sido la primera celebrada tras el acuerdo de París y tuvo lugar en Glasgow del 31 de octubre al 13 de noviembre de 2021. Según los expertos que asesoran a las Naciones Unidas y los diferentes organismos internacionales vinculados a la ONU, la principal problemática presente es que las medidas actualmente adoptadas por los países para la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero son insuficientes y no contribuyen limitar el aumento de la temperatura media mundial a 1,5 °C, estiman que puede haber un incremento de alrededor de 2,7 °C con las medidas actuales. El resultado de esta conferencia fue el Pacto Climático de Glasgow, negociado por consenso por los representantes de los 197 países asistentes. Los principales compromisos son:

- Revisar y fortalecer las medidas para la de reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero de su país, éstas serán revisadas anualmente y en una cumbre en 2023 para intentar mantener el objetivo del Acuerdo de París de no superar la temperatura global más de 1,5 °C.
- Limitar el uso del carbón, eliminando gradualmente su uso. Es el primer acuerdo climático que concibe explícitamente reducir su uso y más de 40 países se comprometieron con esta causa.
- Revertir la deforestación para el 2030, se comprometieron más de 100 países, incluido Brasil.

1.2. Biorrefinerías

Tradicionalmente, la biomasa vegetal se ha empleado como combustible sólido para la producción de calor y electricidad, posteriormente también se ha empleado para la producción de bioetanol para el sector del transporte. Actualmente, se ha corroborado que la biomasa lignocelulósica también puede emplearse para la obtención de productos químicos de valor añadido, enmarcando su valorización en el concepto de la biorrefinería.

Una biorrefinería se define como “industria integrada que, usando biomasa como materia prima y una variedad de tecnologías diferentes, produce energía y/o biocombustibles, a la par que productos químicos, materiales, alimentos y piensos” (BioPlat, 2017) (Figura 1).

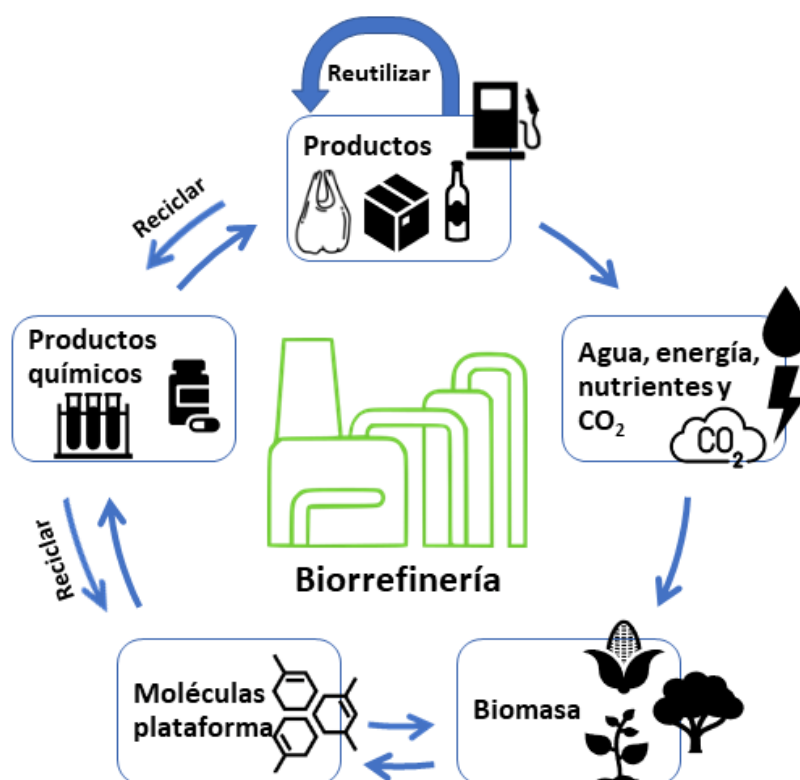


Figura 1. El concepto de biorrefinería. Basado en BioPlat (2017).

A partir de la definición de biorrefinería se puede entender que su sistema se basa en una sinergia para el aprovechamiento sostenible de la biomasa lignocelulósica para la obtención de múltiples compuestos de valor añadido, de esta manera se optimizan los recursos y se integran las producciones energéticas y de bioproductos. El principal



objetivo es mejorar la economía mediante la producción de los máximos subproductos y reducir los residuos.

Generalmente los procesos que se llevan a cabo en una biorrefinería se dividen en primarios, que incluyen el acondicionamiento de la biomasa y la separación o extracción de sus componentes mediante la molienda y el fraccionamiento químico, fisicoquímico o biológico, obteniendo productos plataforma. Y secundarios, que consisten en la conversión y el procesado de los productos plataforma obteniendo energía y bioproductos (BioPlat et al., 2017; Octave and Thomas, 2009).

Los distintos tipos de biorrefinerías se pueden clasificar en función de múltiples criterios, entre los que están el tipo de biomasa utilizada, los productos generados, el tipo de tecnología y el grado o nivel de integración. Según en el tipo de biomasa utilizada los tipos de biorrefinerías son (Kamm et al., 2016):

- **Biorrefinería lignocelulósica:** emplea biomasa lignocelulósica, suele provenir de residuos agrícolas, forestales e industriales, maderas y cultivos energéticos. Este tipo de biomasa es la más abundante, representa alrededor del 70 % de la biomasa total del planeta (Octave and Thomas, 2009).
- **Biorrefinería verde:** utiliza cultivos herbáceos de hoja verde con elevada humedad, como pueden ser la hierba, el trébol, la alfalfa y el maíz inmaduro.
- **Biorrefinería de aprovechamiento integral de cultivos:** emplea todo el material obtenido en los cultivos agrícolas, siendo los más utilizados el maíz y el trigo.
- **Biorrefinería marina:** aprovecha la biomasa marina proveniente de las algas.

1.2.1. Biomasa lignocelulósica

La contribución de diferentes fuentes energéticas renovables a la generación de energía ha ido amentando mundialmente de manera constante en las últimas décadas. En 2019 la capacidad de producción de energía renovable aumentó un 7,4 % respecto a 2018, con una producción mundial de 2537 GW, Europa contribuyó con la generación del 23 % de esta energía renovable, generando 573 GW (IRENA, 2022).

Ante la situación energética y medioambiental en la que nos encontramos, la biomasa presenta gran interés para su valorización para la obtención de biocombustibles y productos químicos. La biomasa es considerada una fuente de energía renovable, en el artículo 2 de la Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa al

fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables; la biomasa se define como “la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos de origen biológico procedentes de actividades agrarias (incluidas las sustancias de origen vegetal y de origen animal), de la silvicultura y de las industrias conexas, incluidas la pesca y la acuicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y municipales”.

El aprovechamiento de la biomasa residual ofrece grandes ventajas, tiene una gran disponibilidad, presenta un bajo coste y no compite directamente con la producción de alimentos y piensos, contribuyendo al aprovechamiento de residuos potencialmente problemáticos. Medioambiental y socialmente contribuye a la disminución de los gases de efecto invernadero y a fomentar el desarrollo rural, a través de un modelo socioeconómico basado en el desarrollo sostenible.

La mayor parte de la biomasa vegetal presenta una estructura lignocelulósica. Se estima que su producción supera las 2×10^{11} toneladas anuales en el mundo (Mahmood et al., 2019). El término “lignocelulósica” hace referencia a la pared celular de las plantas que está formada principalmente por lignocelulosa, lo que hace que sea compacta, estable y resistente, formando una estructura recalcitrante (Lorenci Woiciechowski et al., 2020). La biomasa lignocelulósica es un material compuesto por tres biopolímeros mayoritarios, celulosa, hemicelulosa y lignina, que están fuertemente entrelazados y constituyen el alrededor del 90 % de la materia seca (Brandt et al., 2013). Como se muestra en la Figura 2, su estructura se dispone en microfibrillas de celulosa combinadas con cadenas amorfas de hemicelulosas en una matriz de lignina (Lorenci Woiciechowski et al., 2020; Ortiz, 2011). La composición varía en función de la naturaleza de la biomasa lignocelulósica.

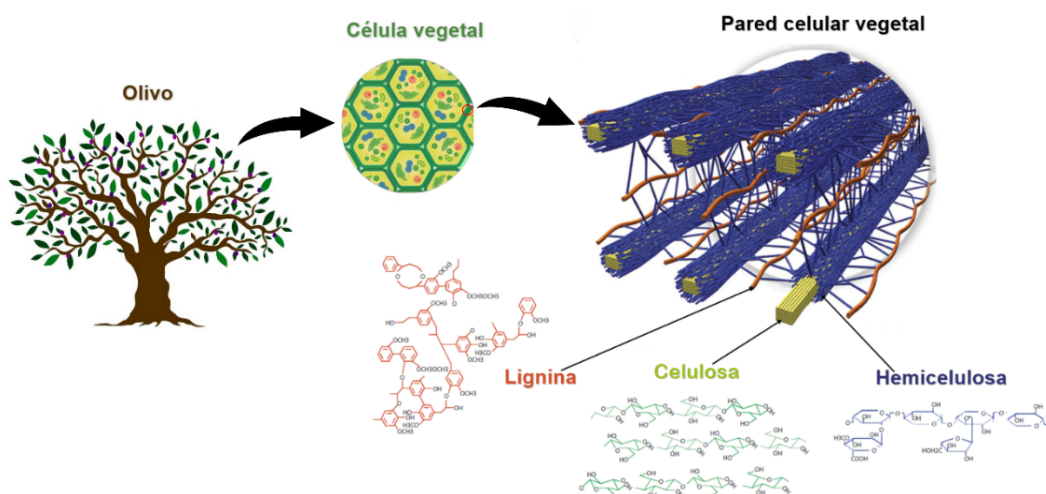


Figura 2. Estructura de la biomasa lignocelulósica. Basado en Brandt et al. (2013).



Los materiales lignocelulósicos están formados por dos tipos de componentes mayoritarios (Figura 3):

- **Compuestos estructurales:**

- Celulosa: es un polisacárido de alto peso molecular compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -(1,4), formando moléculas lineales. Las moléculas lineales de celulosa se disponen en capas superpuestas con una flexibilidad baja, formando fibrillas con un interior hidrofóbico y exterior hidrófilo, esta configuración unida al alto peso molecular hacen que la celulosa no sea soluble en agua aunque la glucosa sí lo sea (Brandt et al., 2013).
- Hemicelulosa: es un polisacárido compuesto por hexosas (glucosa, galactosa, manosa) y pentosas (xilosa y arabinosa). Está dispuesta en una estructura amorfa y ramificada, que interacciona con la celulósica y proporciona flexibilidad y estabilidad al material lignocelulósico. Su peso molecular es inferior a la celulosa y poseen cadenas laterales cortas de diferentes polímeros de azúcares, lo que la convierte en la fracción más fácilmente hidrolizable y degradable con el empleo de pretratamientos.
- Lignina: es un polímero no polisacárido tridimensional de unidades fenilpropano que envuelve y sostiene a las cadenas de celulosa y hemicelulosa, dando rigidez y dureza a la estructura. Es una sustancia fenólica compleja y difícil de caracterizar.

- **Compuestos no estructurales:** son una fracción minoritaria en la composición de los materiales lignocelulósicos.

- Extractivos: componentes de bajo peso molecular que se pueden recuperar fácilmente por ser hidrosolubles o solubles en solventes orgánicos.
- Cenizas: compuestos inorgánicos que permanecen tras la incineración del material.

Esta Tesis Doctoral está centrada en la valorización de la biomasa lignocelulósica, más concretamente del hueso de aceituna.

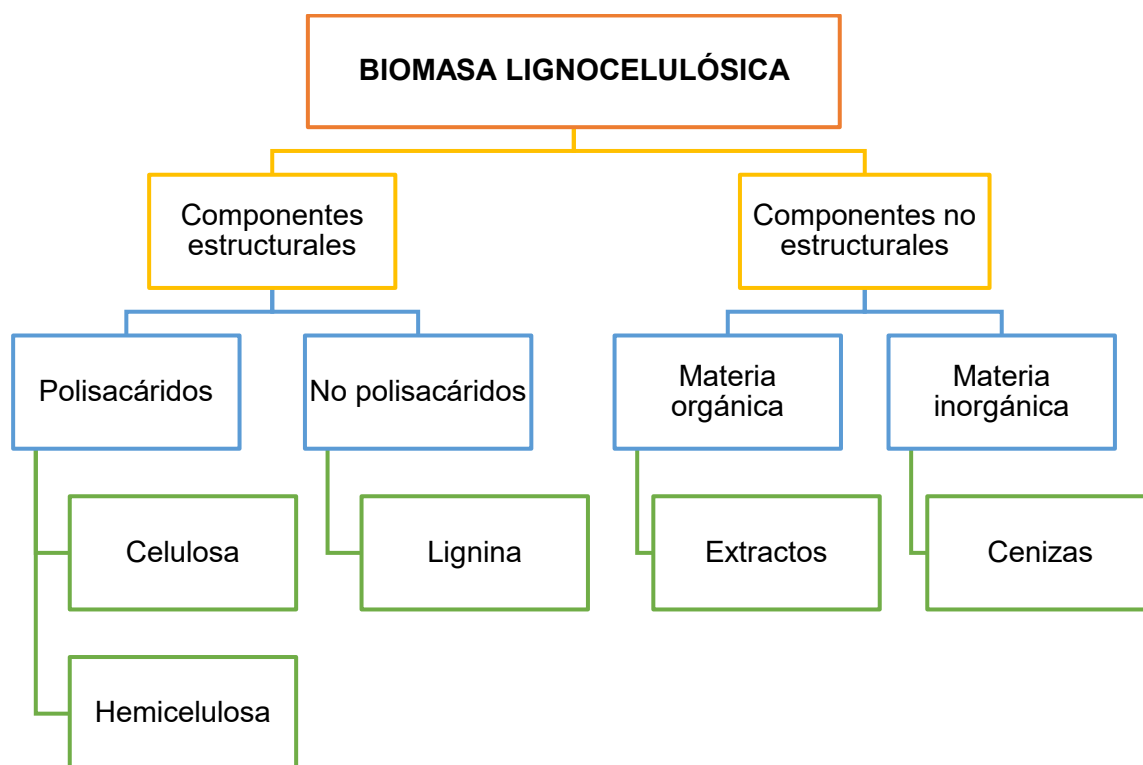


Figura 3. Principales componentes de la biomasa lignocelulósica.

La estructura que conforma la biomasa lignocelulósica es un aspecto fundamental para su posterior valorización, ya que condicionará los diferentes pretratamientos y tratamientos necesarios para el aprovechamiento de sus compuestos.

La recalcitrancia es la resistencia natural de las células vegetales contra la degradación microbiana, los ataques de animales y las condiciones ambientales. Además de los componentes estructurales que componen la biomasa lignocelulósica hay otros factores como la presencia de grupos acetilo y proteínas y la porosidad de la biomasa que influyen en conferir el carácter recalcitrante.

1.2.2. Biomasa del olivar

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol de hoja perenne que se cultiva fundamentalmente en los países mediterráneos. El fruto del olivo es la aceituna, posee entre un 12-30 % de aceite, según su madurez y variedad. Fundamentalmente se emplea para la producción de aceite de oliva (más del 90 %) y en menor medida como aceituna de mesa. El aceite de oliva se utiliza desde hace siglos con fin alimenticio, medicinal, para su combustión como alumbrado y para la producción de jabones y cosmética. Estudios recientes han demostrado los beneficios que aporta el consumo de aceite de oliva para la salud, es considerado un alimento prometedor para prevenir el riesgo de



enfermedades cardiovasculares y oncológicas, debido a los altos niveles de compuestos bioactivos que lo componen (Gavahian et al., 2019).

El olivar está extendido por más de 40 países, su cultivo ha aumentado mundialmente desde los 10 millones de hectáreas hasta los 12,7 millones de hectáreas cultivadas en 10 años (2011-2020). El olivar está extensamente distribuido en Europa, concentrando el 60,5 % de la producción mundial de aceituna (13.427.403,4 toneladas de aceituna) (Figura 4a), siendo España el país con mayor producción de aceituna a nivel mundial, con una media de 7,5 millones de toneladas anuales de aceituna (durante el periodo 2016-2020) (Figura 4b) y una extensión de 2,7 millones de hectáreas cultivadas, en 2019 (FAOSTAT, 2021; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación et al., 2019).

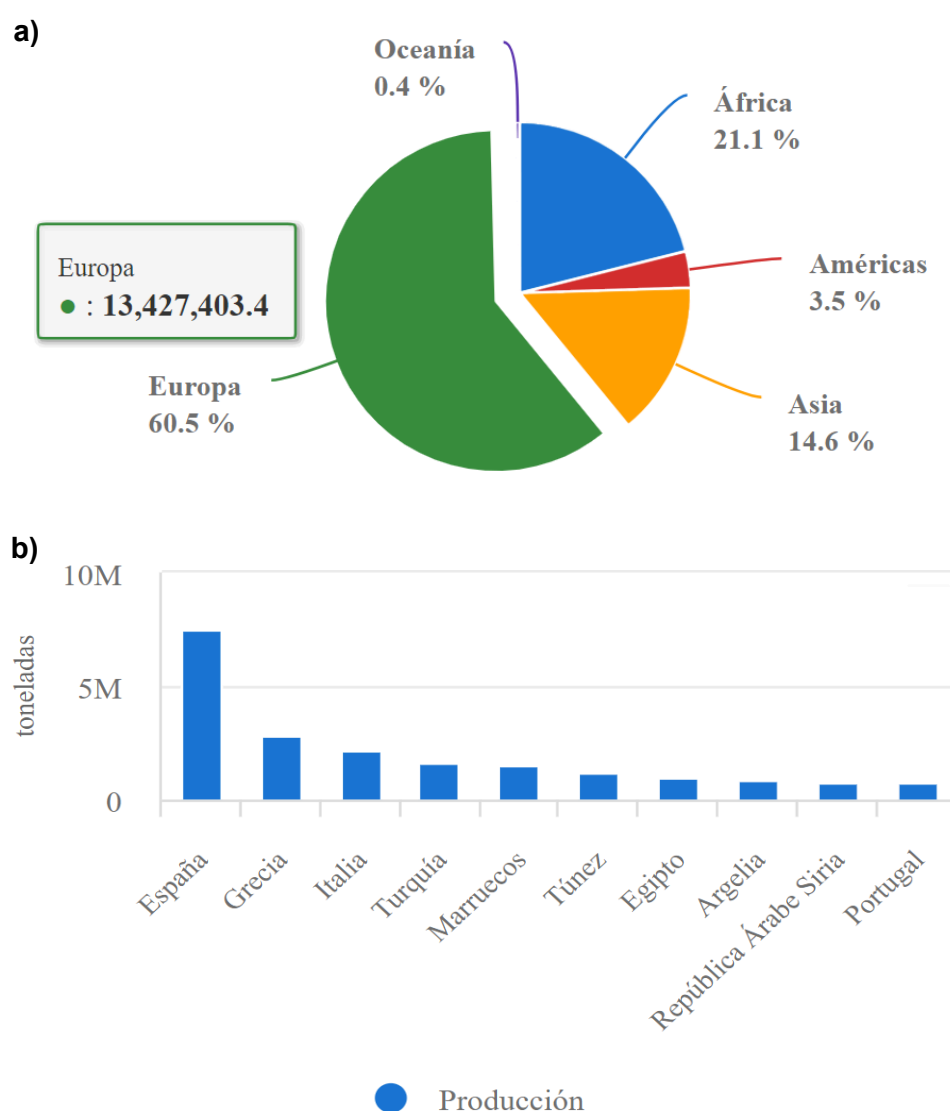


Figura 4. Producción de aceituna mundial media durante el período 2016-2020. a) Producción de aceituna por continentes, b) Producción de aceituna por países (FAOSTAT, 2021).

En España, Andalucía es la comunidad autónoma donde más extendido está el olivar, ocupando más de 1,65 millones de hectáreas, lo que supone más del 60 % del cultivo del olivar en el país (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación et al., 2019). La provincia de Jaén posee aproximadamente 612.612 hectáreas dedicadas al olivar, lo que supone el 82 % de su superficie agraria y el 37 % de la superficie total de olivar de Andalucía (Figura 5) y el 23 % de España (Consejería de Agricultura, Pesca Y Desarrollo Rural, 2015; Perujo and Colombo, 2015).

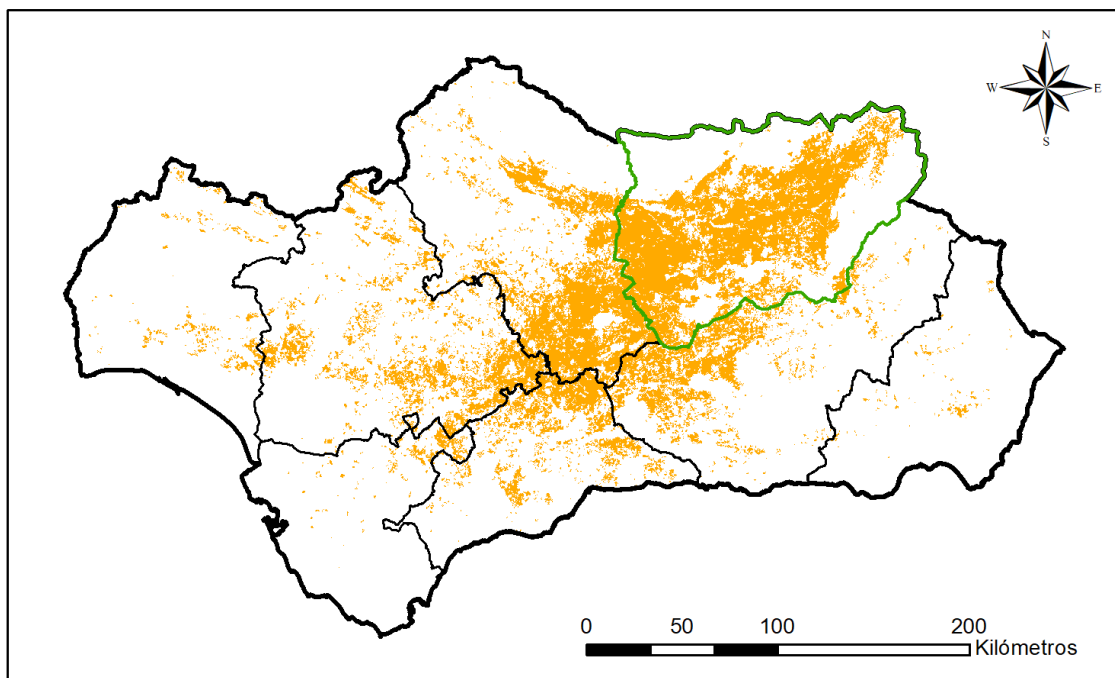


Figura 5. Distribución del cultivo del olivar en Andalucía, en verde se marca la provincia de Jaén. Elaboración propia del mapa a partir de los datos descargados del CORINE Land Cover 2018 (<https://centrodedescargas.cnig.es/CentroDescargas/index.jsp>).

La mayor parte de la aceituna cultivada se emplea para la producción de aceite de oliva en las almazaras. La aceituna recogida en el campo se somete en primer lugar a una limpieza con agua y soplado, posteriormente es sometida a un proceso de molienda o molturado y malaxado, seguido un proceso de separación del aceite. La separación del aceite de oliva del resto de la pasta triturada puede hacerse en dos o tres etapas, la más común es la separación en dos etapas, el 99 % de las almazaras españolas siguen este procedimiento. Consiste en una primera separación en el decantador seguida de una centrifugación vertical para separar el aceite de un orujo semisólido, alperujo (65-74 % de humedad), sin necesidad de añadir agua (Ruiz et al., 2017).



El proceso en tres etapas es más común en Europa; por ejemplo, en Grecia e Italia se obtiene así el 82 % y 55 % del aceite, respectivamente (Echeverría et al., 2017). El método en dos etapas presenta la ventaja de que no necesita añadir agua, reduciendo la generación de aguas residuales respecto al sistema de tres etapas, en el que se obtiene un orujo más seco (50 % de humedad) y mayor cantidad de aguas residuales (Contreras et al., 2020; Echeverría et al., 2017).

Tras la separación del aceite queda el alperujo u orujo, un residuo que está formado por aceite residual, pulpa, cáscara y los huesos triturados; este residuo suele tratarse en las orujeras (o extactoras) para la extracción del aceite residual, el residuo generado en esta industria se denomina orujillo u orujo extractado.

La producción de aceite de oliva y la industria asociada a él genera una gran cantidad de residuos y subproductos susceptibles de ser valorizados (Figura 6).

- **Poda**

La poda es una práctica agrícola que consiste en eliminar mediante la corta las ramas menos productivas, favoreciendo su renovabilidad, aumentando la calidad del árbol y de su fruto. Se genera una biomasa heterogénea formada aproximadamente por un 50 % de hoja, un 25 % de ramas finas (< 5 cm, llamado ramón) y un 25 % de ramas o troncos, madera gruesa (> 5 cm) (Romero-García et al., 2014). La fracción de menor granulometría, hoja y ramón, suele eliminarse por quema directa en el olivar; aunque en los últimos años se ha comenzado a realizar la práctica del triturado y esparcido en el terreno, para mejorar las propiedades del suelo de cultivo y prevenir su degradación. La madera gruesa suele emplearse como combustible en calderas domésticas y en pequeñas industrias.

- **Hoja**

Se encuentra formando parte de la poda (25 %) y en las almazaras, donde va mezclada con la aceituna y se elimina en las primeras etapas de soplante y lavado. La que proviene de las almazaras se emplea para la alimentación animal y la producción del compost, no puede emplearse como combustible debido a su alto porcentaje de humedad.

- **Hueso**

Se obtiene en almazaras y orujeras, se separa por centrifugación. En los últimos años, se ha convertido en una práctica frecuente en las almazaras y orujeras la separación del hueso del resto del residuo, para aprovecharlo como combustible.

- **Orujo o alperujo**

Es la fracción residual obtenida tras la obtención del aceite, está formada por aceite residual, pulpa, piel y puede contener hueso triturado.

- **Orujillo**

Obtenido tras el aprovechamiento en las orujeras del orujo para la extracción del aceite residual (1-3 %) con hexano. Quedando como residuo final el orujillo y obteniendo como producto el aceite de orujo. Es un material agotado formado por piel, pulpa y hueso, normalmente el hueso es separado, quedando un sólido formado únicamente por piel y pulpa. Este residuo suele emplearse como combustible en las propias orujeras o pequeñas industrias (Miranda et al., 2019).

- **Aguas residuales**

También llamado alpechín, se almacena en balsas impermeabilizadas al aire libre con objeto de que reduzca su volumen por evaporación. Se originan en la limpieza de la aceituna a su llegada, en la separación del aceite por decantación y durante el lavado del aceite.



Figura 6. Residuos y subproductos generados en la industria oleícola.



Las aceitunas de mesa se preparan para el consumo alimenticio en las entamadoras; los residuos provenientes de estas industrias son la hoja, el hueso y aguas residuales.

La utilización del hueso de aceituna, junto con otras biomásas procedentes del cultivo del olivar y de sus industrias derivadas son susceptibles de ser utilizadas en una biorrefinería para la obtención de biocombustibles y productos químicos de interés, debido a su carácter residual, abundancia y composición lignocelulósica. Para su valorización es necesario optimizar los diferentes pretratamientos y configuraciones de proceso para la recuperación de las principales fracciones de la biomasa.

El desarrollo de este tipo de industrias podría contribuir significativamente al mantenimiento de la actividad en zonas rurales y a la generación de empleo. También podría contribuir a mejorar las actuaciones de cooperación y asociación de los distintos agentes que intervienen en el sistema productivo (agricultores) y el industrial y comercial (almazaras y extractoras), que determinan la cadena de valor del aceite de oliva. Asimismo, podrá fomentar los procesos de integración de las cooperativas en estructuras de mayor dimensión que mejoren su posición en los mercados y que se unan para la comercialización de sus productos.

Por otra parte, la aplicación de tecnologías y procesos avanzados para la revalorización de la biomasa puede suponer un importante impulso para el desarrollo de empresas con base tecnológica en la región, así como un valor añadido a la industria del aceite de oliva mediante la incorporación de dichas tecnologías y la obtención de biocarburantes y otros productos. A su vez, los desarrollos tecnológicos podrían suponer una importante aportación al conocimiento científico en el ámbito de la obtención de biocombustibles mediante tecnologías avanzadas, que se podrían aplicar a otras biomásas de características similares.

1.2.3. El hueso de aceituna

El hueso de aceituna representa alrededor del 10-15 % en peso de la aceituna (Ruiz et al., 2017); teniendo en cuenta que en España se recogen una media de 7,5 millones de toneladas de aceituna anuales, anualmente se generarían alrededor de 750.000 toneladas de hueso.

En las almazaras, tras la molturación, el hueso es retirado en unas máquinas separadoras que centrifugan la mezcla y separan el hueso del resto del residuo por diferencia de densidad. Esta biomasa lignocelulósica es actualmente muy utilizada en

calderas domésticas o pequeñas calderas industriales, por tener un poder calorífico elevado, cercano a 20511 kJ/kg (Gil et al., 2019).

Es un material que se encuentra centralizado en las almazaras, orujeras y la industria de las aceitunas de mesa, es económico al tratarse de un subproducto generado en el procesado de la aceituna, es abundante, no necesita ningún tipo de adecuación previa para su uso ya que se encuentra triturado debido al proceso de molturado de la aceituna (tamaño de partícula aproximado de 1-3 mm) y presenta una naturaleza lignocelulósica, lo que lo convierte un material con mucho potencial para su valorización integrándolo en el concepto de las biorrefinerías.

El hueso de aceituna está compuesto mayoritariamente por celulosa (21 %), hemicelulosa (23-26 %), siendo el azúcar mayoritario la xilosa (alrededor del 90 % de la fracción hemicelulósica), y lignina (32-36 %). Su contenido en extractos es bajo, únicamente del 4-6 % (Padilla-Rascón et al., 2020b, 2020a). Este material es susceptible de ser utilizado en una biorrefinería para la obtención de biocarburantes y productos químicos de interés. Previamente a la realización de esta Tesis Doctoral ya se habían hecho estudios que corroboraban el alto potencial de esta biomasa para la obtención de compuestos fenólicos, lignina, proteínas, biopolímeros y etanol (Lama-Muñoz et al., 2014; Matos et al., 2010; Rodríguez-Gutiérrez et al., 2014; Romero-García et al., 2016; Vergara-Barberán et al., 2014).

Con la realización de esta Tesis Doctoral se pretende proponer una estrategia eficiente de valorización del hueso de aceituna. Está especialmente centrada en el estudio de diferentes pretratamientos y configuraciones de proceso para recuperar de forma eficiente las fracciones mayoritarias que componen el hueso (glucosa, xilosa y lignina), valorizándolas mediante el desarrollo de procesos de conversión a escala de laboratorio, centrados principalmente en la obtención de furfural y bioetanol.



1.3. Fraccionamiento

Debido a la naturaleza recalcitrante de la biomasa lignocelulósica es necesario su fraccionamiento para su aprovechamiento. El fraccionamiento consiste en la separación de las principales fracciones que componen la biomasa lignocelulosa. Es una etapa clave para la recuperación de sus fracciones mayoritarias (celulosa, hemicelulosa y lignina) y es un factor importante a tener en cuenta para su valorización en las biorrefinerías (Bhatia et al., 2020).

La composición estructural y química de la biomasa es un factor importante para determinar las mejores condiciones de procesado para la recuperación eficiente de las fracciones que la componen. Las fracciones obtenidas son susceptibles de ser empleadas para la producción de productos de interés mediante procesos químicos, enzimáticos o fermentativos.

Esta Tesis Doctoral se centra fundamentalmente en la valorización del hueso de aceituna, hidrolizando la fracción celulósica y hemicelulósica, para la posterior obtención de bioetanol por fermentación de los azúcares y furfural a partir de la deshidratación de las pentosas. La lignina se solubiliza por diferentes técnicas de deslignificación, obteniéndose licores enriquecidos en compuestos fenólicos y lignina susceptible de ser recuperada por precipitación. La deslignificación del material ha sido necesaria para mejorar la digestibilidad enzimática de la celulosa, esta etapa ha permitido también valorizar la lignina contenida en el hueso.

1.3.1. Pretratamiento

El pretratamiento es una etapa clave en el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica; debido a su compleja estructura, es necesaria la realización de un pretratamiento para facilitar el acceso de los azúcares y la lignina que forman esta biomasa (Jaffur et al., 2021). Es una de las etapas más costosas de la valorización de la biomasa, siendo muy importante reducir su coste para aumentar la rentabilidad del proceso (Balat, 2011; Najafi et al., 2021). La selección del pretratamiento tiene un importante impacto en las siguientes etapas del proceso, como son la generación de compuestos inhibidores para la fermentación, requerimientos de molienda, la digestibilidad de la celulosa y la generación de residuos.

Es muy importante elegir el pretratamiento y las condiciones experimentales adecuadas a la biomasa y a su aprovechamiento, para ello se deben tener en cuenta las siguientes premisas principales (Zabed et al., 2016):

- Fracturar la estructura y reducir la polimerización de la biomasa.
- Reducir la cristalinidad de la celulosa.
- Romper los enlaces lignina-carbohidrato, para la separación de las tres fracciones mayoritarias (celulosa, hemicelulosa y lignina). Conlleva la solubilización de la hemicelulosa y/o la redistribución de la lignina.
- Aumentar la superficie y la porosidad de la biomasa.
- Trabajar con altas cargas de sólido.
- Recuperar la mayor cantidad de azúcares y evitar la pérdida por degradación de las fracciones azucaradas.
- Obtener un sólido con una composición enriquecida en celulosa con alta digestibilidad.
- Evitar la formación de compuestos inhibidores que limiten su posterior aprovechamiento empleando enzimas y microorganismos.
- Requerir una reducción del tamaño mínima o nula.
- Asegurar su viabilidad económica con bajos costes de inversión, bajos requerimientos energéticos y uso de reactivos económicos.
- Evitar la generación de residuos.

Según la naturaleza del pretratamiento pueden clasificarse en físicos, químicos, físico-químicos y biológicos, además también pueden combinarse, realizando un pretratamiento en varias etapas. En la Figura 7 indican los pretratamientos más empleados sobre biomasa lignocelulósicas. No todos los métodos tienen suficiente desarrollo tecnológico o económico para realizarse a gran escala industrial.



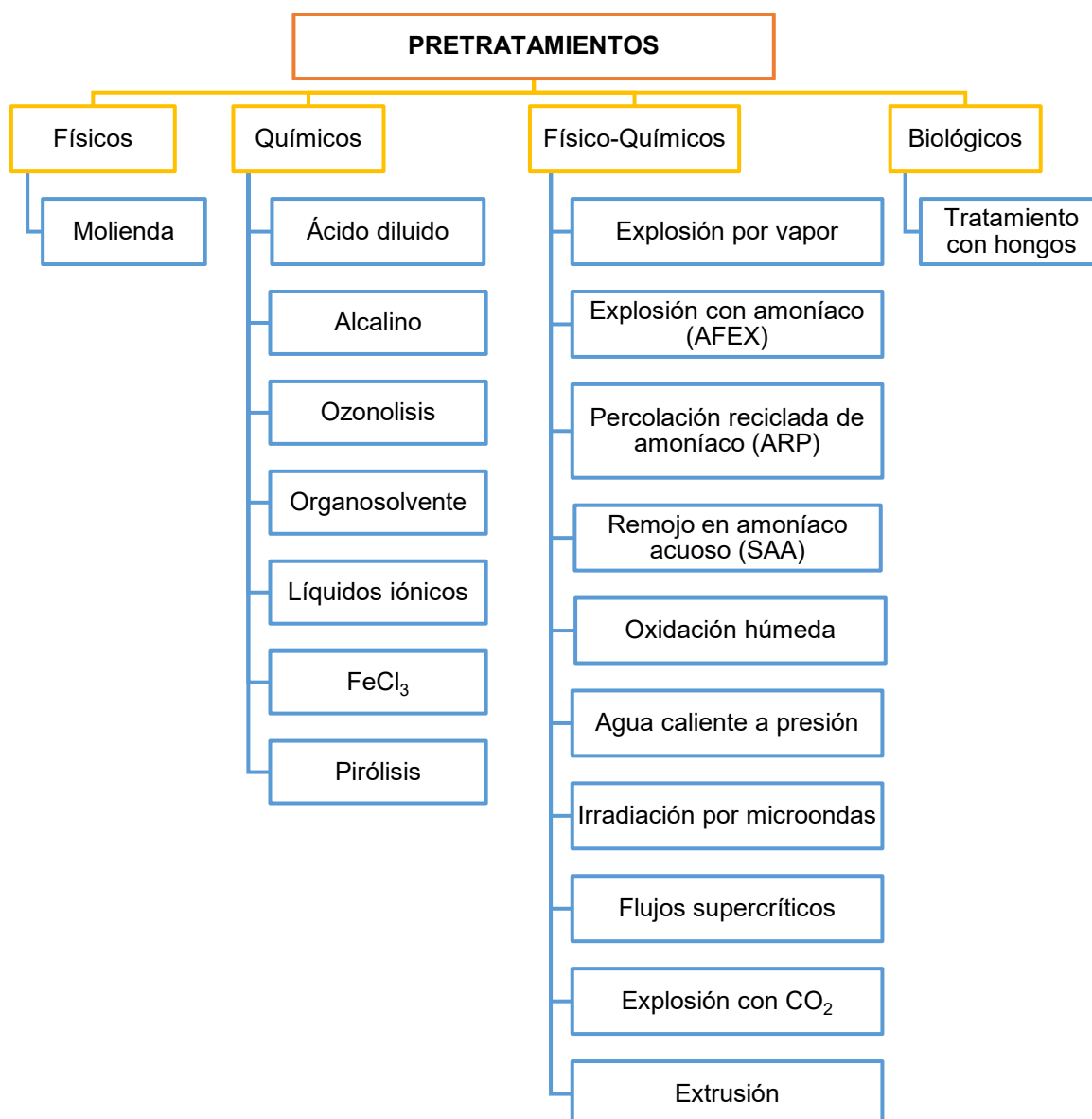


Figura 7. Pretratamientos más empleados para el fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica (Balat, 2011; Conde-Mejía et al., 2012; Duque et al., 2017; López-Linares et al., 2013; Zabed et al., 2016).

A continuación, se describen los pretratamientos empleados en esta Tesis Doctoral con el hueso de aceituna.

1.3.1.1. Pretratamiento con ácido diluido

Este pretratamiento fundamentalmente solubiliza la fracción hemicelulósica y aumenta la digestibilidad enzimática de la celulosa. Puede emplearse ácido concentrado o diluido, suele emplearse el ácido diluido debido a los problemas de corrosión en los equipos, al alto coste de mantenimiento y operación que presenta el ácido concentrado. El

pretratamiento con ácido diluido está muy estudiado y es el más favorable para su utilización con una amplia de biomásas lignocelulósicas.

Los catalizadores más empleados son el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico, el ácido clorhídrico y el ácido nítrico, algunas de las ventajas que presenta el ácido sulfúrico es su alta disponibilidad y su bajo coste, también es muy empleado el ácido fosfórico por su menor corrosión y toxicidad, ya que a bajas concentraciones puede ser empleado como nutriente en la fermentación (Acevedo-García et al., 2018). El empleo de ácido sulfúrico como catalizador de este proceso es el método más extendido y eficaz para la recuperación selectiva de los azúcares hemicelulósicos, evitando su degradación y obteniendo un hidrolizado enriquecido en hemicelulosa con altos rendimientos (Díaz-Blanco et al., 2018; Kim et al., 2015; Rong et al., 2012). Esta metodología presenta unas tasas de solubilización de la hemicelulosa superiores a las obtenidas con otros pretratamientos, como la explosión por vapor o el de agua caliente a presión (Conde-Mejía et al., 2012). La eficacia del empleo de ácido sulfúrico para la hidrólisis de la hemicelulosa presente en el hueso de aceituna está ampliamente estudiada (Lama-Muñoz et al., 2014). El uso de este pretratamiento también produce la alteración de la estructura de la lignina, reduce la polimerización y la cristalinidad de la celulosa y aumenta el área superficial y la porosidad de la biomasa, lo que facilita su posterior hidrólisis enzimática (Zabed et al., 2016). Aun así, este pretratamiento no resulta tan efectivo como otros para la solubilización de la lignina (Taherzadeh and Karimi, 2008).

Este pretratamiento realiza tres funciones importantes: hidroliza la fracción hemicelulósica, (obteniendo un licor enriquecido en este azúcar), facilita la posterior hidrólisis de la celulosa y parte de la lignina. Los principales inconvenientes de estos pretratamientos a pH bajo es la formación de compuestos inhibidores por la degradación de los azúcares y de la lignina (ácidos carboxílicos, compuestos furánicos y fenólicos), que dificultan su fermentación, y la necesidad de neutralizar los licores obtenidos para algunos usos posteriores, como su fermentación (Balat, 2011; Taherzadeh y Karimi, 2008).

1.3.1.2. Pretratamiento alcalino

Emplea soluciones alcalinas para la ruptura de los enlaces entre la lignina y los carbohidratos y altera la estructura de la lignina, facilitando la accesibilidad de la enzima a la hemicelulosa y celulosa (Conde-Mejía et al., 2012; Silverstein et al., 2007). Este pretratamiento muestra una menor solubilización de la celulosa y la hemicelulosa que los pretratamientos hidrotérmicos o ácidos, está orientado a la solubilización de la lignina (Alves-Ferreira et al., 2021).



Las bases más empleadas son el hidróxido sódico, potásico, cálcico y amónico, siendo el hidróxido de sódico el más común (Balat, 2011). Esta metodología suele emplear temperaturas y presiones menores y tiempos mayores que otros pretratamientos, llegando a hacerse procesos a temperatura ambiente con duración de horas o incluso días. Son los procesos más empleados para la obtención de lignina, pero generan aguas residuales que necesitan ser tratadas. Una de las aplicaciones más conocidas es el proceso de Kraft empleado en la producción de pulpa y papel, utiliza sulfuro de sodio e hidróxido de sodio (Sridach, 2010). Este pretratamiento provoca la hinchazón de los materiales lignocelulósicos, aumentando su superficie y disminuyendo su cristalinidad, alterando y rompiendo la estructura de la lignina y sus enlaces éster con la celulosa y la hemicelulosa (Balat, 2011).

Para aumentar la solubilización de la lignina, en muchas ocasiones el pretratamiento alcalino se puede combinar con un agente oxidante como el hidróxido sódico o el peróxido de hidrógeno (Martínez-Patiño et al., 2017). La metodología consiste en empapar la biomasa con agua ajustada a pH 11-12 (por ejemplo con NaOH) que contiene peróxido de hidrógeno (Taherzadeh y Karimi, 2008). Las principales ventajas son la fácil disponibilidad de peróxido de hidrógeno y del compuesto alcalino, los pocos requerimientos de infraestructura que necesita y la posibilidad de trabajar con altas cargas de sólido. Por el contrario, supone un inconveniente el alto pH al que queda impregnado el sólido (siendo necesario lavarlo con gran volumen de agua), el coste de los reactivos que no son recuperables y la generación de inhibidores por la degradación de la lignina (Dutra et al., 2018).

1.3.1.3. Pretratamiento organosolvente

Este pretratamiento suele emplearse para la deslignificación de la biomasa. En este proceso la biomasa lignocelulósica se calienta y se mezcla con un disolvente compuesto por una disolución de agua y un solvente orgánico, puede ser alcoholes, ésteres, cetonas, glicoles, ácidos orgánicos, fenoles y éteres. Implica la hidrólisis parcial de la hemicelulosa y la deslignificación simultáneas, obteniendo un sólido enriquecido en celulosa y apto para su hidrólisis enzimática, debido al aumento de la porosidad y del área superficial y a la disminución de la cristalinidad y del grado de polimerización (Alves-Ferreira et al., 2021).

Se puede añadir un catalizador que permita reducir la temperatura y/o mejorar el proceso de deslignificación. Algunos de los catalizadores más usados son el ácido sulfúrico, ácido oxálico, salicílico y acetilsalicílico (Taherzadeh and Karimi, 2008). Permiten obtener flujos de lignina con alta pureza y con una estructura de la lignina

parcialmente conservada, pero requieren la recuperación de los disolventes (Lobato-Peralta et al., 2021). Para la elección del disolvente es fundamental considerar el coste del mismo y su simplicidad de recuperación (por ejemplo, por evaporación o condensación), es importante para su posterior reutilización y reducción de costes operativos. La eliminación de los disolventes de la fracción sólida suele ser también necesaria, para evitar problemas de inhibición en la hidrólisis enzimática o la fermentación (Sun and Cheng, 2002).

El pretratamiento organosolvente se puede utilizar en combinación con el pretratamiento ácido. Se ha demostrado la eficacia del empleo de una primera etapa ácida para la solubilización de la hemicelulosa, seguida de un organosolvente para la solubilización de la lignina y alteración de la estructura, obteniendo un sólido enriquecido en celulosa hidrolizable enzimáticamente (Huijgen et al., 2012).

1.3.1.4. Explosión por vapor

Es un pretratamiento en el que la biomasa está sometida a vapor de agua a alta temperatura y presión durante un periodo de tiempo, siendo la presión liberada súbitamente provocando su fraccionamiento (Balat, 2011). Este proceso ejerce sobre la biomasa una combinación de alteraciones físicas y químicas, que provoca la alteración estructural de los enlaces lignina-carbohidrato, reduce la cristalinidad y despolimeriza la celulosa, aumentando su digestibilidad enzimática.

El material puede impregnarse previamente a su explosión por vapor con diferentes catalizadores, para aumentar la digestibilidad enzimática de la celulosa y la hidrólisis de la hemicelulosa, reduciendo los tiempos y temperaturas de trabajo. Los catalizadores más utilizados son el dióxido de azufre, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de sodio. El más empleado es el ácido sulfúrico, es muy eficiente para la recuperación de la hemicelulosa pero también produce compuestos inhibidores (Ballesteros et al., 2006).

Se debe tener cuidado al seleccionar las condiciones, para evitar la degradación de la hemicelulosa y la celulosa (Taherzadeh and Karimi, 2008). Con esta metodología se requiere hasta un 70 % menos de energía que con otros pretratamientos físicos convencionales para lograr la misma reducción de tamaño (Balat, 2011). Además, presenta otras ventajas como que no necesita una previa reducción del tamaño de partícula de la biomasa y puede emplearse a escala industrial. Los principales inconvenientes son la degradación parcial de la hemicelulosa, la incompleta desestructuración de matriz de la biomasa y la generación de inhibidores.



En términos generales, este pretratamiento facilita la hidrólisis de la hemicelulosa y la ruptura de los enlaces lignina-carbohidrato, aumentando la accesibilidad de la celulosa contenida en el hueso para su posterior digestibilidad enzimática. Por tanto, este pretratamiento podría ser de gran utilidad para la producción de azúcares fermentables. (Fernández-Bolaños et al., 2001).

Como se detalla anteriormente, resulta complejo diseñar un pretratamiento en el que se solubilice la fracción hemicelulósica y quede un sólido con alta digestibilidad enzimática, en el que se haya producido una ruptura y reorganización de la estructura lignocelulósica y se haya retirado la lignina. Por ello, en muchas ocasiones se propone el empleo de un pretratamiento en dos etapas, uno centrado en la recuperación de la hemicelulosa y otro en la deslignificación y mejora de la digestibilidad enzimática, de este modo se puede aumentar la recuperación de los azúcares y se reducir la formación de inhibidores.

Si se realiza un pretratamiento en varias etapas la primera fracción azucarada a recuperar sería la hemicelulósica, debido a su naturaleza más lábil que la celulosa y la lignina, siendo la fracción mayoritaria más fácil de hidrolizar y degradar (Moxley and Zhang, 2007). La hemicelulosa tiene un grado de polimerización menor si lo comparamos con la celulosa y la lignina y es más inestable, por lo que se degrada más fácilmente cuando es sometida a un pretratamiento (Luo et al., 2019).

Una vez que la biomasa ha sido pretratada y hay un mejor acceso a los azúcares y la lignina que la compone se pueden seguir dos estrategias:

- **Química:** consiste en transformar los azúcares obtenidos en productos químicos, denominados plataforma, a partir de los cuales se pueden obtener combustibles y compuestos químicos con valor añadido.
- **Biológica:** proceso bioquímico en el que se emplean microorganismos y/o enzimas para obtener por fermentación compuestos químicos y combustibles, como el xilitol y el etanol.

1.3.2. Hidrólisis enzimática

Tras el pretratamiento de la biomasa, normalmente la fracción líquida obtenida está enriquecida en azúcares hemicelulósicos y la fracción sólida en celulosa y puede que también en lignina, depende de si se ha retirado esta fracción en la etapa de pretratamiento. El objetivo de esta etapa de hidrólisis es transformar en monómeros los oligómeros contenidos en el sólido, para lo cual se utilizan ácidos o enzimas. La técnica más empleada y que se ha llevado a cabo en esta Tesis Doctoral ha sido la hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática es un proceso en el que se emplean enzimas producidos por microorganismos: bacterias, levaduras y hongos, para la solubilización de los azúcares contenidos en la biomasa lignocelulósica. Pueden utilizarse directamente estos microorganismos, que secretan enzimas durante su crecimiento en los medios o cócteles enzimáticos comerciales, éstos últimos son los más empleados por su facilidad de uso. La digestibilidad enzimática se ve influenciada por: la composición del sustrato y su estructura, la cristalinidad de la celulosa, la superficie accesible, la porosidad, el tamaño de partícula, contenido en hemicelulosa (la eliminación de la hemicelulosa aumenta el tamaño medio de los poros del sustrato, aumenta la accesibilidad y facilita que la celulosa se hidrolice) y la distribución de la lignina (Barakat et al., 2014; Zabed et al., 2016), por tanto sus rendimientos están estrechamente ligados a la biomasa lignocelulósica empleada y a los pretratamientos previos.

La lignina puede actuar de barrera física dificultando el acceso de la celulosa a las enzimas, uniéndose a la celulosa de forma no productiva, formando complejos lignina-carbohidrato y también produce la adsorción no productiva de la celulosa sobre las ligninas desactivando la celulasa (Yoo et al., 2017). El rendimiento de hidrólisis enzimática también puede verse afectado por factores relacionados con las enzimas, como son el tipo de enzima y dosis empleadas (Zabed et al., 2016).

La hidrólisis enzimática es un proceso que presenta varias ventajas debido a la especificidad de la enzima al sustrato (Zabed et al., 2016). Permite trabajar a temperaturas bajas y largos períodos temporales, además produce bajas cantidades de inhibidores y es respetuosa con el medio ambiente. Como inconvenientes pueden citarse su alto coste, un aspecto muy importante para la generación de etanol rentable, y una hidrólisis enzimática de la celulosa y la hemicelulosa incompleta. A pesar de ello, la hidrólisis enzimática es una metodología con gran potencial, por eso se está trabajando en disminuir su coste y mejorar sus características. Se considera fundamental que tenga alta afinidad al sustrato, sea estable térmicamente, posea flexibilidad para resistir diferentes condiciones de trabajo, tenga poca adsorción a la lignina, resista grandes cargas de sólido y tenga baja inhibición por el sólido u otros compuestos contenidos en el medio (García-Aparicio et al., 2006).

Los principales sistemas enzimáticos utilizados en la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica son las celulasas, hemicelulasas y ligninasas. La celulasa es un cóctel enzimático que actúa sobre la celulosa (polímero) y la transforma en glucosa (monómero). Estas enzimas son producidas por diferentes microorganismos, entre los que se incluyen bacterias, levaduras y hongos.



1.4. Producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

Dado que el hueso tiene una composición química rica en hidratos de carbono, su uso como materia prima para la producción de bioetanol puede ser interesante con un proceso de bioconversión adecuado. La producción de bioetanol con materias primas lignocelulósicas que no compitan con los alimentos es un elemento clave para la sostenibilidad de los biocombustibles, evitando así la controversia alimentos vs combustibles en relación con el uso de materias primas. Además de su uso como combustible alternativo, el hueso tiene un excelente potencial para producción de productos químicos.

1.4.1. Obtención y aplicaciones del bioetanol

Los combustibles líquidos representan alrededor del 40 % del consumo energético mundial, su sustitución por biocombustibles juega un papel fundamental en la reducción de las emisiones de gases invernadero (Mohd Azhar et al., 2017). Según la Directiva Europea 2009/28/CE, se entiende por biocombustible “un combustible líquido o gaseoso utilizado para el transporte, producido a partir de la biomasa”.

El bioetanol se puede obtener a partir de la fermentación con microorganismos de los azúcares que componen la biomasa. Destaca por ser un compuesto con baja toxicidad para el medio ambiente, fácilmente biodegradable, con baja contaminación atmosférica, posee alto octonaje y alto contenido energético, siendo un combustible renovable y alternativo a los obtenidos de fuentes energéticas no renovables. Además de su uso como combustible, tiene más aplicaciones como son la obtención de productos químicos renovables, como el plástico y el polietileno (Najafi et al., 2021).

El bioetanol es el principal biocarburante empleado en el sector del transporte a nivel mundial. Alrededor del 85 % de la producción mundial se concentra en Brasil y Estados Unidos (Mohd Azhar et al., 2017). Puede emplearse como sustitutivo a la gasolina o como aditivo. Actualmente, suele mezclarse con la gasolina en una proporción del 10 % de bioetanol y 90 % de gasolina, denominándose como E10, esta mezcla no requiere una modificación del motor en los vehículos para su uso. Si se emplean vehículos flexibles (FFV, Flexible Fuel Vehicle) con el motor modificado la proporción de bioetanol podría ser mayor, llegando al 85 % (Balat, 2011). El uso del bioetanol contribuye a la reducción del consumo del petróleo y las emisiones de efecto invernadero.

En función de la materia prima empleada para la producción bioetanol se puede clasificar en (Jambo et al., 2016; Mohd Azhar et al., 2017):

- **Primera generación:**

Obtención de bioetanol a partir de la fermentación de materias primas ricas en almidón (maíz, trigo, arroz, patata, cebada...) y azúcar (caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce y frutas). Brasil y Estados Unidos son los principales productores de bioetanol a nivel mundial, empleando maíz y caña de azúcar. En Europa los cultivos más empleados son la patata, el trigo y la remolacha azucarera. La principal problemática asociada es el empleo de recursos alimenticios como combustible, compitiendo el cultivo alimenticio y energético, limitando la producción de alimentos para el consumo y aumentando su precio.

- **Segunda generación o avanzados:**

Utiliza principalmente biomasa lignocelulósica y residuos forestales y agrícolas. Presenta un impacto menor en el medio ambiente ya que son materiales residuales, abundantes y que no compiten con los alimentos. La obtención de bioetanol por fermentación es mucho más sencilla a partir de biomazas azucaradas y amiláceas, sus azúcares son fáciles de hidrolizar porque se encuentran en forma monomérica o formando almidón. En cambio, la biomasa lignocelulósica está formada por una estructura compleja de microfibrillas de celulosa combinadas con cadenas amorfas de hemicelulosas en una matriz de lignina (Lorenci Woiciechowski et al., 2020; Ortiz, 2011), mucho más difícil de hidrolizar. Este es el principal reto a superar para la utilización de la biomasa lignocelulósica como fuente eficiente y rentable de obtención de bioetanol, se encuentra en fase de investigación y desarrollo para mejorar el proceso y reducir los costes para que sea viable comercialmente (Govumoni et al., 2013).

- **Tercera generación:**

Se centra en el uso de biomasa de algas, microalgas y macroalgas. El empleo de las algas como materia prima para la obtención de bioetanol aún se encuentra en desarrollo. Es una técnica con potencial, por la composición de las algas baja en hemicelulosa y lignina, su fácil cultivo en una gran variedad de entornos acuáticos y su alta adsorción de CO₂.



1.4.2. Compuestos inhibidores y detoxificación

En el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos no sólo se obtienen azúcares, también se producen otros compuestos que pueden ser tóxicos o inhibidores para los organismos que se emplean en procesos posteriores de hidrólisis enzimática y fermentación. Son compuestos que se generan por la degradación de la fracción azucarada y la lignina. Habitualmente se encuentran solubles en la fracción líquida obtenida en el pretratamiento (hidrolizado) y pueden impregnar el sólido resultante, suelen eliminarse fácilmente del sólido mediante su lavado.

En términos generales, las condiciones más severas implican una mayor accesibilidad de las fibras y un aumento de la sacarificación enzimática y fermentación, pero también una mayor degradación y pérdida de azúcares, así como una mayor formación de compuestos tóxicos (Alvira et al., 2011).

La naturaleza y concentración de los compuestos inhibidores depende del tipo de materia prima, del pretratamiento y las condiciones experimentales empleadas, en términos generales la concentración de los inhibidores aumenta con la severidad del pretratamiento (temperatura, tiempo, pH, concentración del catalizador...) (Nogueira et al., 2021).

1.4.2.1. Compuestos inhibidores

La toxicidad de los compuestos se debe al efecto individual y también a la interacción y acción sinérgica entre ellos (Jönsson et al., 2013). Estos compuestos inhibidores pueden dividirse en cuatro grupos mayoritarios: compuestos fenólicos, derivados furánicos, ácidos alifáticos y otros azúcares oligoméricos solubles (Kim, 2018) (Figura 8).

Los productos intermedios de la hidrólisis y los productos finales de las digestiones de celulosa, como son los azúcares monoméricos y celolignosacáridos cortos provocan la inhibición de la hidrólisis enzimática. Se ha demostrado que la acumulación de estos compuesto entre los que se incluyen la celobiosa, celooligómeros y xilooligosacáridos inhiben la actividad de la celulasa durante la hidrólisis enzimática (Alvira et al., 2011; Kim, 2018).

El 2-furaldehído (furfural) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) son compuestos furánicos, que se obtienen por la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y las hexosas (glucosa, galactosa y manosa), respectivamente. La formación de estos compuestos depende fundamentalmente de las condiciones experimentales empleadas en el pretratamiento, el empleo de catalizadores ácidos, altas temperaturas y tiempos de

residencia aumenta su concentración, siendo prácticamente imposible evitar por completo la formación de furfural y HMF en pretratamientos ácidos (Jaffur et al., 2021; Kim et al., 2013). La presencia de estos compuestos no tiene un efecto significativo sobre la hidrólisis enzimática, pero sí afecta negativamente a los microorganismos fermentativos, el furfural presenta una mayor severidad de inhibición que el HMF (Kim, 2018). Estos compuestos pueden reducir el crecimiento celular y la tasa de adsorción (Kim, 2018), debido a su bajo peso molecular pueden penetrar la membrana celular y dañar las estructuras internas.

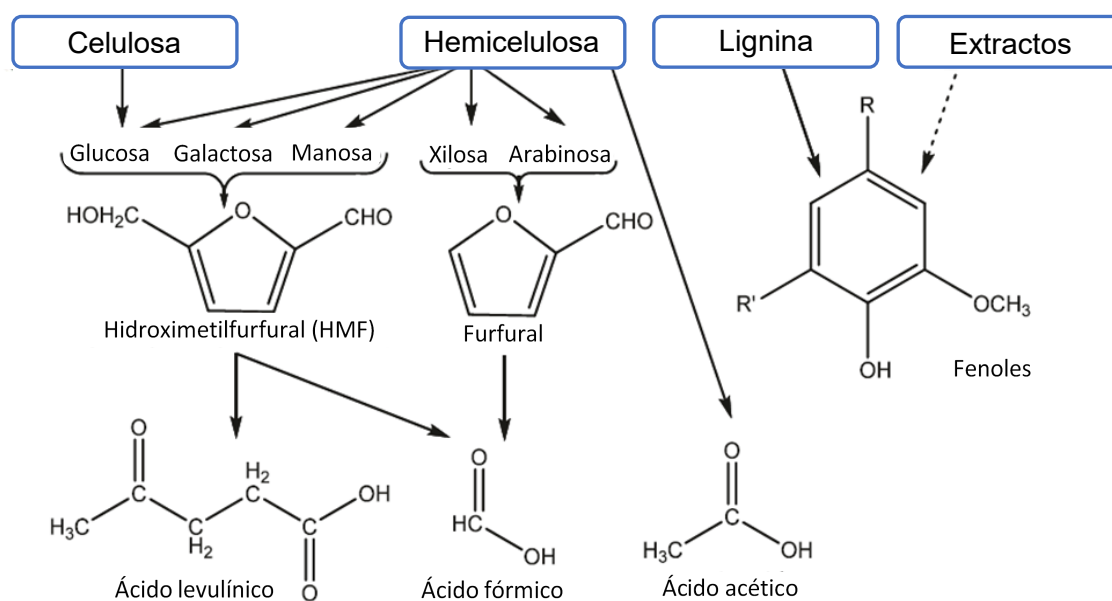


Figura 8. Principales rutas de formación de los inhibidores. Basado en (Jönsson et al., 2013).

En los hidrolizados obtenidos tras el pretratamiento pueden encontrarse ácidos alifáticos. Los ácidos alifáticos más comunes son el ácido acético, fórmico y levulínico, siendo el ácido acético el más abundante y el que menor toxicidad presenta, el ácido fórmico es el más tóxico. El ácido acético se forma por hidrólisis de los grupos acetilo de la hemicelulosa. El ácido fórmico y levulínico se obtienen por la degradación termoquímica ácida de los polisacáridos, el ácido fórmico es un producto obtenido de la degradación del furfural y el ácido levulínico del HMF (Jönsson et al., 2013). Estos compuestos tienen baja influencia en la actividad de las celulasas, pero su presencia en la fermentación puede dificultar el crecimiento de los microorganismos, y reducir el consumo de glucosa y xilosa y la productividad de etanol (Kim, 2018). Su toxicidad está vinculada al pH, ya que sólo la forma molecular no disociada puede difundirse a través de las membranas celulares (Almeida et al., 2007).



Otros compuestos minoritarios que actúan como inhibidores son los compuestos fenólicos, provienen de los extractos y de la solubilización y degradación de la lignina. Suelen encontrarse en bajas concentraciones, pero pueden inhibir a los microorganismos fermentadores de hidrolizados lignocelulósicos.

Los compuestos fenólicos son más tóxicos que otros compuestos inhibidores, incluso a menores concentraciones, ya que su bajo peso molecular les permite penetrar las membranas celulares y dañar las estructuras internas y cambiar la morfología celular (Kim, 2018). También afecta al crecimiento celular disminuyéndolo, aumenta la fluidez de la membrana celular, puede descomponer el ADN e inhibir el ARN y la síntesis de proteínas (Kim, 2018). Además, son tóxicos para las celulasas produciendo su desactivación mediante la precipitación y la adsorción no productiva de estas enzimas (Kim et al., 2011).

El etanol generado durante la fermentación puede inhibir el crecimiento de los microorganismos, los sistemas de transporte de glucosa y los flujos de protones de algunos microorganismos.. Ya que se altera la permeabilidad, la organización y la composición lipídica de la membrana plasmática de la levadura.

1.4.2.2. Detoxificación

Algunos compuestos generados durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica pueden actuar de inhibidores del proceso de fermentación, para minimizar o evitar este efecto se pueden llevar a cabo diferentes estrategias que implican la detoxificación del hidrolizado y la ingeniería de microorganismos para aumentar su tolerancia a los inhibidores (Bhatia et al., 2020).

La eliminación de compuestos tóxicos por detoxificación es el método más extendido para reducir los problemas de inhibición. Desde el punto de vista económico, añadir un paso más para la detoxificación de hidrolizado supone costes adicionales al proceso de obtención de etanol (Nogueira et al., 2021); por tanto es fundamental que este proceso sea barato, eficiente y únicamente se lleve a cabo en el caso de que no sea posible realizar la fermentación con éxito. En el caso de que sea necesario llevar acabo esta etapa, se seleccionará el método de detoxificación en función de la composición del hidrolizado y el microorganismos que se va a emplear (Carvalho et al., 2005). Los métodos de detoxificación pueden clasificarse en (Bhatia et al., 2020):

- **Físicos:** eliminación de compuestos volátiles (ácido acético, furfural, vainillina, etc.) por evaporación, concentrando el hidrolizado. Y por otro lado, la detoxificación por filtración por membranas.

- **Químicos:** precipitación e ionización de algunos compuestos inhibidores. Las técnicas más empleadas son la resina de intercambio iónico, la adsorción con carbón activo y el overliming.
- **Biológicos:** emplean enzimas o microorganismos para alterar la naturaleza química de los inhibidores. Puede realizarse una detoxificación in-situ en la que la fermentación se lleve a cabo simultáneamente a la detoxificación, eliminando la etapa de detoxificación y reduciendo costes (Nogueira et al., 2021).

También pueden combinarse los diferentes métodos de detoxificación para una mayor eliminación de los inhibidores en el caso de que sea necesario.

Concretamente, en esta Tesis Doctoral se emplearon la evaporación, la adsorción con carbón activo y la resina de intercambio iónico. La evaporación permite eliminar de forma eficaz los compuestos inhibidores volátiles sin producir pérdidas de los azúcares, pero concentra el hidrolizado. La eliminación de compuestos inhibidores del hidrolizado por adsorción con carbón activo es uno de los métodos más extendidos por ser económico, eficaz y por no afectar a los niveles de azúcares del hidrolizado (Chandel et al., 2011). El carbón activo presenta la ventaja frente a otros métodos de que se puede reutilizar a través de métodos de regeneración. La resina de intercambio iónico es una técnica muy eficaz para la eliminación de compuestos inhibidores. Sus inconvenientes son el alto coste de las resinas y la posible reducción de la concentración de azúcares del hidrolizado (Chandel et al., 2011).

Como proceso adicional, es muy común que sea necesario acondicionar los hidrolizados ajustando su pH para que sea posible su fermentación. La mayoría de los hidrolizados hemicelulósicos provienen de pretatamientos ácidos. Para que la fermentación de los licores sea satisfactoria es necesario ajustar su pH al óptimo de crecimiento de los microorganismos.

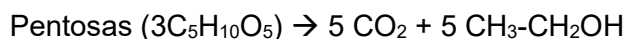
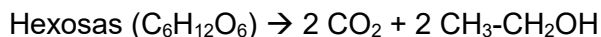
1.4.3. Fermentación

Tras el pretratamiento y la hidrólisis, se obtienen azúcares simples en forma de monómeros susceptibles de ser fermentados por microorganismos para la producción de etanol. La fermentación es un proceso metabólico de microorganismos que convierten los azúcares solubles en alcohol. Puede llevarse a cabo por gran variedad de microorganismos, principalmente se pueden englobar en bacterias, levaduras y hongos. Hay diferentes procesos de fermentación, la digestión anaerobia, la digestión aerobia o compostaje y la fermentación de azúcares, esta Tesis Doctoral se centra en esta última.



Con este proceso finaliza la conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol. Posteriormente el etanol producido es separado, normalmente por destilación.

En la fermentación, los microorganismos transforman las hexosas y las pentosas (principalmente glucosa y xilosa) en etanol según las siguientes reacciones:



Según estas ecuaciones, el rendimiento teórico máximo de obtención de etanol es de 0,51 gramos de etanol por cada gramo de azúcar (51 %); aunque experimentalmente no es posible alcanzar este rendimiento, ya que al menos el 5 % de los azúcares consumidos por los microorganismos es empleado para su metabolismo celular y crecimiento, además no solo producen etanol, también producen otros compuestos minoritarios como el glicerol, xilitol, ácido acético, etc (Quintero et al., 2011; Zabed et al., 2017).

Los microorganismos más empleados en la fermentación son las levaduras, por requerir menos nutrientes, tener altas tasas de crecimiento, mayor crecimiento a pH menores y mayor resistencia a los compuestos inhibidores y a altas concentraciones de etanol. La levadura más empleada por su robustez es *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, únicamente es capaz de fermentar hexosas.

Para obtener mayores rendimientos totales de etanol a partir de biomasa lignocelulósica se pueden fermentar azúcares celulósicos y hemicelulósicos (Boboescu et al., 2018). En la naturaleza hay microorganismos capaces de fermentar hexosas, como son *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Candida shehatae* o *Pachysolen tannophilus*. (Arora et al., 2015; López-Linares et al., 2016), pero los rendimientos obtenidos de los azúcares hemicelulósicos suelen ser más bajos que los obtenidos con los celulósicos (Wang et al., 2019). Para paliar esta problemática se están desarrollando investigaciones centradas en las modificaciones genéticas, por un lado se pretende mejorar genéticamente a los microorganismos que fermentan pentosas y hexosas (*Escherichia coli* o *Klebsiella oxytoca*) y por otro lado se introducen genes implicados en el metabolismo de las pentosas en microorganismos fermentadores de hexosas (*Saccharomyces cerevisiae* o *Zymomonas mobilis*) (Cardona y Sánchez, 2007; Zabed et al., 2016). También existe la posibilidad de realizar una co-fermentación empleando al mismo tiempo microorganismos fermentadores de hexosas y pentosas.

En la presente Tesis Doctoral se han empleado los siguientes microorganismos:

- **Escherichia coli etanologénica**

Se ha utilizado una cepa de *E. coli* etanologénica, cedida por la Universidad de Florida, para la co-fermentación de pentosas y hexosas. Esta cepa se obtuvo por la incorporación de algunos genes de *Zymomonas mobilis* y la anulación de algunos propios que competían con la ruta fermentativa (Geddes et al., 2013).

E. coli es un microorganismo ampliamente modificado genéticamente por las características que presenta: metaboliza gran cantidad de hexosas y pentosas, es fácil de cultivar, tiene un rápido crecimiento, tiene facilidad para su trazabilidad genética y es fácil de manipular genéticamente, lo que la convierte en uno de los microorganismos más estudiados, mejor caracterizados y con un mapa genético más conocido. En los últimos años se han realizado numerosos estudios de laboratorio para mejorar sus propiedades, para que aumente su producción de etanol a partir de hexosas y pentosas y resista mayores concentraciones de compuestos inhibidores.

- **Saccharomyces cerevisiae**

Se empleó una cepa de *S. cerevisiae* denominada “Ethanol Red”, cedida por la empresa francesa de “Fermentis”.

S. cerevisiae es una levadura que destaca por ser tolerante a altas concentraciones de etanol, al estrés osmótico y a condiciones anaerobias, tiene alta selectividad y productividad, baja acumulación de subproductos, alto rendimiento de etanol y de fermentación (Jambo et al., 2016).

Es uno de los microorganismos más utilizados industrialmente para la fermentación de azúcares a etanol, desde hace miles de años se ha empleado para la producción de alcohol, fundamentalmente en las industrias cerveceras y vinícolas (Mohd Azhar et al., 2017). Es incapaz de metabolizar la xilosa, pero sí puede la xilulosa, debido a esto se han realizado múltiples investigaciones para la crear cepas capaces de fermentar la xilosa.

1.4.4. Configuración de proceso para la obtención de bioetanol

Aunque la obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos se presenta como prometedora y ventajosa, aún existen algunos desafíos técnicos y económicos. La necesidad de la realización de diferentes etapas como el pretratamiento, la hidrólisis, la detoxificación y la fermentación, provocan que no sea económicamente competitivo



para su implantación a nivel industrial. Para paliar esta problemática se ha estudiado la integración de procesos en diferentes configuraciones, para de esta forma reducir las etapas y el coste económico y energético y el tiempo de proceso.

Las configuraciones de proceso para la producción de etanol más empleadas son:

- **Hidrólisis y fermentación secuenciales (HFS)**

Se basa en la separación de la hidrólisis y la fermentación en dos etapas diferentes. El primer paso de hidrólisis se llevará a cabo para la solubilización de los azúcares (principalmente la celulosa) contenidos en el sólido resultante del pretratamiento mediante su hidrólisis enzimática, tras este proceso, el hidrolizado enzimático se fermenta a etanol. La separación de los procesos permite que ambos se realicen en condiciones óptimas (Mohd Azhar et al., 2017).

- **Hidrólisis y co-fermentación secuenciales (HCFS)**

Cuando la HFS incluye la co-fermentación de hexosas y pentosas se denomina hidrólisis y co-fermentación secuenciales. Una vez acabada la hidrólisis enzimática se mezcla el hidrolizado enzimático con el hidrolizado obtenido en el pretratamiento con azúcares hemicelulósicos, para fermentarlo conjuntamente

- **Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)**

El proceso de hidrólisis y fermentación se realiza simultáneamente en un solo paso, es un proceso prometedor que está implementado tanto a nivel de la laboratorio como industrial (Zabed et al., 2016). En la SFS los azúcares liberados por la hidrólisis enzimática (principalmente las hexosas) se convierten a etanol a medida que se solubilizan, lo que evita su inhibición enzimática por altas concentraciones de azúcares. Los rendimientos de formación de etanol se pueden ver limitados por la velocidad de hidrólisis de los azúcares, además las diferencias en las condiciones de trabajo óptimas de temperatura y pH para la enzima y el microorganismo pueden hacer que sus rendimientos descendan. Presenta beneficios respecto al procedimiento realizado en etapas secuenciales, al realizarse en una etapa y por tanto en un mismo reactor los costes son menores, el tiempo de procesamiento es menor, presenta una tasa mejorada de hidrólisis, requiere una menor carga enzimática, reduce el riesgo de contaminación, puede emplearse mayor concentración de sustrato y se obtiene un mayor rendimiento de etanol (Balat, 2011; Mohd Azhar et al., 2017).

- **Presacarificación seguida de sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS)**

Previamente al proceso de SFS se realiza una sacarificación en condiciones óptimas de la enzima, para obtener un licor con azucarado previo al inóculo del microorganismo fermentador, tras la incorporación del microorganismo se comienza a fermentar los azúcares solubilizados y se continúa con la sacarificación. Además de los beneficios que presenta la SFS, esta configuración permite acortar tiempos de proceso y aumentar los rendimientos de fermentación.

- **Sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS)**

Si la SFS incluye la co-fermentación de hexosas y pentosas se denomina sacarificación y co-fermentación simultáneas. Se emplearía la fracción líquida enriquecida en hemicelulosas y la sólida en celulosas (slurry). Deben encontrarse las condiciones a las que ambas fracciones fermenten simultáneamente, es un proceso complejo ya que la afinidad por la glucosa es 200 veces mayor que por la xilosa (Hamacher et al., 2002).

- **Bioproceso consolidado (BPC) o conversión microbiana directa (CMD)**

Es una técnica prometedora y alternativa a la SFS que se encuentra en fase de investigación, no solo unifica la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada y la fermentación de los azúcares celulósicos, sino que también produce enzimas (celulasas y hemicelulasas) para convertir a la biomasa en etanol en una sola etapa. Esta técnica podría hacer que este proceso fuera más competitivo y viable económicamente (Zabed et al., 2016), pero actualmente no existen microorganismos suficientemente consolidados que puedan realizar todas las etapas simultáneas, por lo tanto está en investigación la posibilidad de mejorarlos mediante modificación genética (Parisutham et al., 2014).



1.5. Producción de furfural a partir de biomasa lignocelulósica

La fracción azucarada contenida en los materiales lignocelulósicos se puede degradar, transformándose en diferentes compuestos. Concretamente, por deshidratación de los azúcares solubilizados se forman compuestos furánicos, el furfural y el HMF. Estos compuestos tienen efecto inhibitor sobre los microorganismos fermentadores de etanol (como se detalla en la sección 1.4.2.1. Compuestos inhibidores), pero también tienen un enorme potencial para la producción de productos químicos y combustibles de valor añadido (Mariscal et al., 2016). La necesidad de sustituir los recursos fósiles por alternativas renovables ha fomentado la búsqueda de productos químicos plataforma basados en la biomasa.

1.5.1. El furfural: relevancia y principales aplicaciones

El furfural (2-furaldehído) es un aldehído heterocíclico. En los últimos años ha aumentado el interés para investigar su producción a partir de biomasa lignocelulósica para la obtención de biocombustibles y productos químicos.

El Departamento de Energía de los Estados Unidos catalogó el furfural como uno de los 12 productos químicos plataforma más valiosos (Luo et al., 2019; Ye et al., 2021). Su composición formada por enlaces insaturados y grupos aldehídos lo convierte en una molécula versátil susceptible para la obtención de gran variedad de compuestos químicos, se han podido obtener más de 80 productos químicos directa o indirectamente a partir del furfural (Mariscal et al., 2016).

El furfural es muy apreciado por sus propiedades termoendurecibles, fuerza física y resistencia a la corrosión. Se utiliza sobre todo en la producción de resina (más de 70 %), que luego se emplea como aglutinante en las industrias de fundición. El segundo uso principal es como disolvente selectivo en la producción de lubricantes del petróleo (Wondou Business and Technology Services et al., 2006). El furfural y sus compuestos derivados (Figura 9) tienen muchas más aplicaciones; las más relevantes se indican en la Tabla 1 (Kabbour and Luque, 2020).

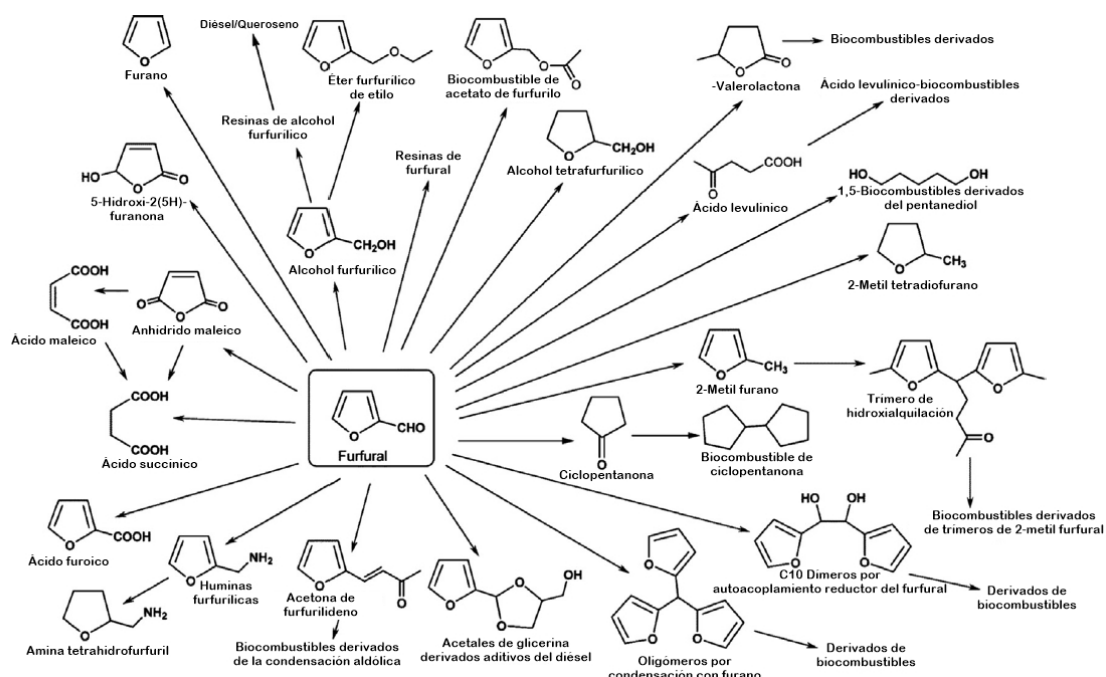


Figura 9. Principales productos derivados del furfural. Basada en Kabbour y Luque (2020).

Tabla 1. Aplicaciones más relevantes del furfural y sus derivados.

Furfural:
• Disolvente • Combustible para el transporte y aditivos de gasolina • Lubricante • Resina • Adhesivo • Agente decolorante • Intermediario en la síntesis de productos farmacéuticos, químicos y biopolímeros • Mezcla de combustible para aviones • Potenciador del suelo y fertilizantes orgánicos • Fungicida y nematicida • Potenciador del sabor de bebidas y alimentos
Derivados del furfural:
• Productos farmacéuticos • Productos químicos agrícolas e industriales • Resina • Síntesis de polímeros y plásticos • Modificación de la madera y conservantes de libros • Alcohol furfurílico para el transbordador espacial



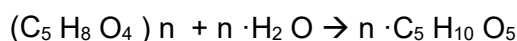
1.5.2. Cinética de reacción

El furfural se obtiene a partir de la deshidratación de las pentosas, fundamentalmente la xilosa y en menor medida la arabinosa, ya que la xilosa suele ser más abundante; estos azúcares forman parte de la fracción hemicelulósica que compone la biomasa lignocelulósica. Aunque la arabinosa es un compuesto potencial para la producción de furfural, su contribución en los procesos comerciales se suele despreciar por sus bajas proporciones en las biomásas lignocelulósicas (Cai et al., 2014; Peleteiro et al., 2014).

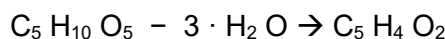
El furfural se produce exclusivamente a partir de biomasa lignocelulósica por deshidratación de pentosas (Kabbour and Luque, 2020), fundamentalmente a partir de residuos agrícolas y forestales, no existe una ruta sintética para la producción de furfural. Actualmente, su producción a partir del bagazo (25-27 % de pentosas) y las mazorcas de maíz (30-32 % de pentosas) representan más del 98 % de todas las materias primas empleadas para la producción de furfural, por su alto contenido en pentosas, su abundancia y su bajo coste (Agirrezabal-Telleria et al., 2014; Kabbour and Luque, 2020; Wondur Business and Technology Services et al., 2006). El hueso de aceituna es una biomasa con gran potencial para su aprovechamiento para la obtención de furfural, ya que las pentosas suponen alrededor del 25-28 % de la composición de este material (Padilla-Rascón et al., 2021, 2020b).

La producción de furfural a partir de biomasa lignocelulósica implica dos etapas. En primer lugar, la hidrólisis de las hemicelulosas, normalmente se realiza una hidrólisis ácida diluida con ácido sulfúrico, ya que según múltiples estudios es el método más eficaz para la recuperación de los azúcares pentósicos con altos rendimientos (Kim et al., 2015). Con el hidrolizado obtenido enriquecido en xilosa se realiza una segunda etapa de deshidratación de la xilosa a furfural. Las siguientes ecuaciones establecen la estequiometría de la formación de furfural a partir de biomasa rica en pentosas (Agirrezabal-Telleria et al., 2014):

- Hidrólisis de pentosas:



- Deshidratación de pentosas:



Según estas ecuaciones, el rendimiento teórico máximo de producción de furfural es de 0,64 gramos de furfural por cada gramo de pentosas (64 %). El proceso de producción de furfural puede desarrollarse de forma conjunta en un mismo reactor (one-pot) o de forma secuencial. La realización del proceso en una etapa reduce costes y tiempos de proceso. La realización del proceso de forma secuencial permite optimizar cada una de las etapas para obtener mejores resultados y facilita la separación del furfural, ya que se producen menos subproductos (Luo et al., 2019). Además, facilita la recuperación y valorización del sólido menos degradado (si es un sistema one-pot sufre mayor degradación) no solubilizado en la hidrólisis, compuesto mayoritariamente por celulosa y lignina, pudiendo aprovecharse para la obtención de otros productos de valor añadido como el etanol, compuestos fenólicos, etc (Sánchez et al., 2013). Los procesos que permiten la obtención de varios productos químicos con valor añadido aprovechando todas las fracciones principales que componen la biomasa lignocelulósica están ganando gran atención dentro del concepto de biorrefinerías sostenibles; mejoran notablemente la economía del proceso y facilitan las estrategias sinérgicas de producción química y biológica (Cai et al., 2014).

La deshidratación de la xilosa a furfural es una de las etapas clave en la obtención de este compuesto. La reacción normalmente tiene lugar en medio ácido, el ácido sulfúrico es el más empleado, aunque también se emplea ácido clorhídrico en menor medida (Kabbour and Luque, 2020).

Es crucial el conocimiento del mecanismo de formación de furfural, para seleccionar una estrategia catalítica y unas condiciones de reacción apropiadas. Los modelos cinéticos descritos para la formación de furfural a partir de la deshidratación de las pentosas suelen incluir diferentes reacciones secundarias. El mecanismo de reacción es bastante complejo, aún no se conoce con seguridad y existe cierta controversia. Se proponen tres mecanismos diferentes para la conversión de la xilosa en furfural, difieren en las reacciones secundarias producidas (Figura 10).

Uno de los mecanismos sugiere el paso simple de deshidratación de la xilosa a furfural, basado en que la xilosa está disuelta, sigue una cinética de primer orden en la que el furfural únicamente se degrada por autopolimerización y la xilosa se descompone directamente.

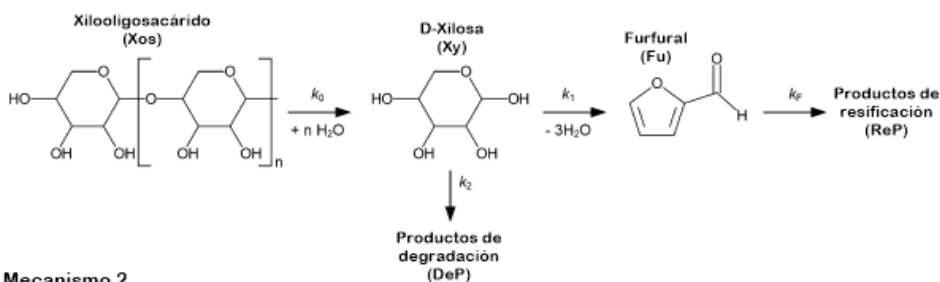
El segundo mecanismo afirma que la degradación del furfural también se ve influenciada por la polimerización cruzada entre la xilosa y el furfural.

El tercer mecanismo sugiere que a partir de la xilosa se produce un compuesto intermedio (xilulosa) y posteriormente el furfural, la polimerización se produce de forma

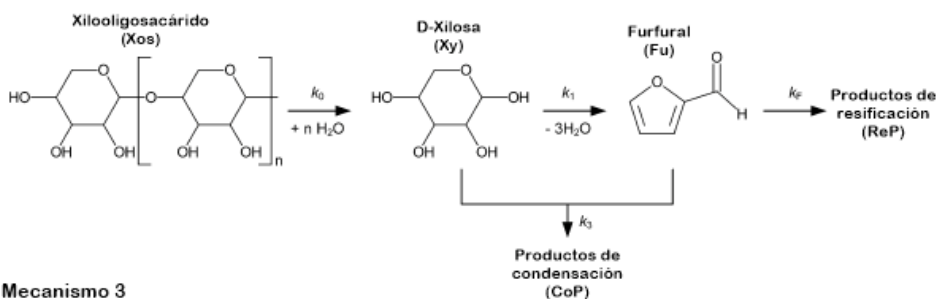


cruzada entre el compuesto intermedio y el furfural (Köchermann et al., 2018). Por tanto, el furfural se puede degradar por autopolimerización (el furfural reacciona consigo mismo) y por polimerización cruzada del furfural (el furfural reacciona con la xilosa y los compuestos intermedios) (Köchermann et al., 2018).

Mecanismo 1



Mecanismo 2



Mecanismo 3

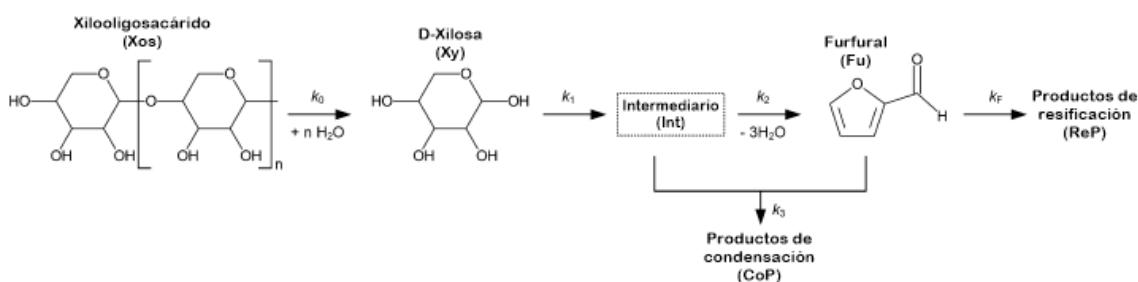


Figura 10. Mecanismos para la conversión de xilosa a furfural. Basada en Köchermann et al. (2018).

Las reacciones secundarias producidas durante el proceso de obtención de furfural pueden ser (Köchermann et al., 2018; Mariscal et al., 2016):

- **Condensación:** reacción entre el furfural y los compuestos intermedios.
- **Fragmentación:** de la xilosa para producir otros compuestos como acetaldehído, formaldehído, gliceraldehído, piruvaldehído, glicolaldehído, acetol y ácido láctico.
- **Autopolimerización o resificación:** reacción del furfural con él mismo, formando oligómeros y polímeros.

Los rendimientos de obtención de furfural descienden a causa de estas reacciones, siendo la más influyente y la que mayores pérdidas de furfural produce la condensación. Las reacciones secundarias disminuyen notoriamente con el aumento de la temperatura, debido al “efecto entropía”, el aumento de la temperatura favorece la desintegración de las moléculas e inhibe la acumulación de moléculas más grandes (Agirrezabal-Telleria et al., 2014; Zeitsch, 2000a).

Como producto de estas reacciones secundarias se forman las huminas, un subproducto sólido de bajo valor que disminuye en gran medida el rendimiento de furfural. No se conocen con exactitud los mecanismos de formación de este compuesto de degradación, pero estudios recientes confirman que es por condensación (Shi et al., 2020).

Se ha investigado la valorización de las huminas para producir otros productos como hidrógeno, gas de síntesis o adhesivos, pero resulta más rentable para la economía de proceso la supresión de este compuesto (Shi et al., 2020). Además, el furfural puede fragmentarse formando moléculas más pequeñas como el ácido fórmico, formaldehído, acetaldehído, piruvaldehído, gliceraldehído, glicolaldehído y ácido láctico (Peleteiro et al., 2016). Por tanto, es esencial diseñar una estrategia de obtención de furfural en la se minimice su degradación y los rendimientos obtenidos sean máximos.

1.5.3. Proceso industrial de obtención de furfural

El furfural tiene un mercado mundial de alrededor de 300.000 toneladas anuales (Luo et al., 2019). Actualmente, China representa más del 70 % de la producción mundial (Agirrezabal-Telleria et al., 2014).

El primer proceso de producción de furfural conocido fue desarrollado por *Quaker Oats* en 1921. Empleó como materia prima las cáscaras de avena secas, se digerían con ácido sulfúrico durante 5 horas a 153 °C con inyección de vapor. Este vapor aportaba calor y retiraba el furfural que posteriormente se recuperaba por destilación (Zeitsch, 2000b).

Actualmente, el furfural se produce industrialmente a partir de biomasa lignocelulósica empleando reactores continuos o discontinuos (por lotes). La biomasa y una solución acuosa con ácidos inorgánicos (siendo el ácido sulfúrico es el catalizador más empleado) se carga en el reactor y se mezclan (Kabbour and Luque, 2020; Nogueira et al., 2021). En este procedimiento los azúcares pentósicos se transforman en monosacáridos (pentosas) por hidrólisis ácida y éstos se deshidratan formando furfural.



La temperatura de reacción se mantiene mediante la adicción de vapor. Para minimizar la pérdida de furfural por reacciones secundarias de autopolimerización y condensación, el furfural se extrae continuamente por destilación con vapor a través de una serie de columnas de destilación, la corriente de furfural se separa con diferentes etapas de purificación consecutivas para conseguir una corriente de furfural de gran pureza (Agirrezabal-Telleria et al., 2014).

En función de la configuración de proceso de separación empleada también se pueden obtener otros subproductos comerciales como el metanol y el ácido acético. El residuo sólido está compuesto principalmente por lignina y celulosa despolimerizada (Bhaumik and Dhepe, 2014), suele secarse y emplearse como combustible para la planta de obtención de furfural (Rong et al., 2012). Las condiciones de trabajo más empleadas suelen ser: 3-4 % de disolución ácida con una proporción de carga de sólido entre 2:1 y 3:1, el tiempo de reacción está entorno a las 3 h y la temperatura es entre 170 y 185 °C. Con esta metodología los rendimientos máximos de furfural se sitúan entre el 45 y el 50 % (Kabbour and Luque, 2020).

Por otro lado, se han probado otros procesos más actuales utilizando principalmente temperaturas de reacción más altas y procesos de separación innovadores, la mayoría de ellos utilizan ácido sulfúrico como catalizador homogéneo (Agirrezabal-Telleria et al., 2014):

- El proceso *Agrifurane* utiliza varios reactores por lotes en serie que funcionan entre 161 y 177 °C. Este proceso resultó ser muy costoso debido al uso de varios reactores.
- El proceso *Escher Wyss* utilizó un alimentador rotatorio con un lecho fluido a 170 °C. La sensibilidad rotatoria y varios problemas de corrosión hicieron que se abandonara este proyecto.
- El proceso de *Rosenlew* opera continuamente alimentando bagazo a través de obturadores hidráulicos. El reactor trabaja a 180 °C y se alimenta vapor a 10 bar. En estas condiciones, el sistema no requiere ningún catalizador añadido ya que las reacciones son “autocatalizadas”. La biomasa fluye hacia abajo, por lo que el proceso se considera como un lecho fijo con arrastre con vapor. Este proceso produce furfural con un rendimiento del 59,5 % pero con una proporción de vapor a furfural de 30:1.
- Los procesos que operan a temperaturas entre 200 y 240 °C, como *Supratherm* y *Stake*, pueden reducir considerablemente el tiempo de

residencia en el reactor y aumentar el rendimiento de furfural a través de tiempos de residencia más bajos y el “efecto de entropía”.

- Por último, el proceso *Suprayield*, combinó una temperatura de 240 °C con una novedosa separación de furfural in situ mediante descompresión instantánea. Este proceso aprovecha el 100 % de recuperación de furfural al mantener la solución en ebullición.

El uso de ácidos minerales fuertes como el ácido sulfúrico o el ácido fosfórico acelera la hidrólisis de las pentosas, pero esta metodología industrial muestra una serie de inconvenientes, especialmente relacionados con efluentes tóxicos y problemas de corrosión (Peleteiro et al., 2016):

- Rendimientos limitados de furfural.
- Alto consumo energético.
- Corrosión del equipo por el ácido empleado.
- Ineficiente y costosa recuperación del catalizador.
- Falta de coproductos valiosos.

Aún es necesario realizar un mayor trabajo de investigación para mejorar el proceso de producción de furfural y aumentar su viabilidad y rentabilidad económica. Se están desarrollando nuevos procesos empleando principalmente temperaturas de reacción más altas, nuevos sistemas catalíticos y procesos de separación innovadores, pero aún se encuentran en fase de investigación y no se ha desarrollado una implantación a nivel industrial.

1.5.4. Configuración de proceso para la obtención de furfural

El catalizador y el sistema de disolventes son los dos factores principales que determinan el rendimiento de obtención de furfural.

1.5.4.1. Catalizadores

La adición de catalizadores tiene un papel importante en la conversión de las pentosas a furfural, mejorando el craqueo de los enlaces químicos de la xilosa y/o oligómeros de xilosa y la reorganización de diferentes especies para formar furfural.

Una etapa clave en la formación de furfural es la deshidratación de la xilosa, por tanto, un aspecto importante a tener en cuenta es que velocidad de esta reacción es lenta.



Para promover esta reacción se emplean diferentes catalizadores, es muy común el empleo de catalizadores que actúan como ácido Brønsted y/o como el ácido de Lewis. El ácido de Lewis promueve la isomerización de la xilosa en xilulosa y el ácido de Brønsted ayuda a deshidratar la xilulosa, mejorando el rendimiento de obtención de furfural significativamente (Choudhary et al., 2012).

Los catalizadores se pueden dividir en (Luo et al., 2019; Ye et al., 2021):

- **Homogéneos**

Se disuelven en el medio de reacción, facilitando la interacción ya que entran en contacto completo con el sustrato. Sin embargo, presentan problemas por su difícil separación, la corrosión de los equipos y la contaminación ambiental. Se consideran catalizadores homogéneos los ácidos diluidos inorgánicos y orgánicos, los cloruros metálicos, las sales y los líquidos iónicos ácidos. Hasta el momento los más empleados son los ácidos diluidos, más concretamente el ácido sulfúrico. En los últimos años, ha crecido el interés por el empleo de los cloruros metálicos como catalizadores, debido a su baja corrosividad y alta actividad catalítica. Algunos de los más empleados son el FeCl_3 , SnCl_4 , AlCl_3 y CrCl_3 , también se está extendiendo el uso de sales inorgánicas como el NaCl debido al aumento de rendimientos observado (Deng et al., 2016; Le Guenic et al., 2015; Ye et al., 2021).

- **Heterogéneos**

Presentan fácil separación y recuperación. Estos catalizadores están limitados por su coste y síntesis, tienen el problema de su fácil desactivación en soluciones acuosas o en sistemas bifásicos con sales. Los más comunes se pueden clasificar en tamices moleculares, resinas macroporosas, óxidos de metales de transición, catalizadores a base de carbono y ácidos heteropólicos. Su actividad catalítica está determinada principalmente por su acidez, tamaño de poro y superficie específica, la cantidad y el tipo de sitios ácidos. Algunos pueden ser bifuncionales, actuando como ácidos de Lewis y de Brønsted simultáneamente.

El furfural también puede formarse sin la presencia de un catalizador, a través de una reacción autocatalítica. La degradación térmica de la xilosa puede producir ácidos orgánicos como el ácido fórmico, que pueden actuar como catalizadores homogéneos (Lamminpää et al., 2012). Otros estudios se han centrado en el empleo de agua marina como disolvente, aprovechando la sal marina disuelta (NaCl) como catalizador o combinándola con otros catalizadores (Hongsi et al., 2014; Mao et al., 2013).

1.5.4.2. Sistemas de disolventes

La selección de un sistema de disolvente adecuado es crucial, ya que la interacción de la biomasa y el catalizador está influenciada por el disolvente. Hay un especial interés en que los disolventes empleados sean “verdes”, evitando el uso de disolventes derivados del petróleo. Podemos dividir los sistemas de disolventes en (Ye et al., 2021):

- **Sistemas monofásicos**

Formado por un solo disolvente o un disolvente mixto miscible. Suelen constituirlo el agua, líquidos iónicos, CO supercrítico, dimetilsulfóxido (DMSO), GVL, N-dimetilacetamida (DMA) y otros disolventes orgánicos. El agua es uno de los disolventes más utilizados por su bajo coste y sostenibilidad, sin embargo, su naturaleza polar puede causar reacciones secundarias con facilidad. El GVL y los líquidos iónicos son disolventes prometedores que están en estudio, ya que debido a sus características pueden mejorar los rendimientos de obtención de furfural.

- **Sistemas bifásicos**

Consiste en un sistema formado por dos fases inmiscibles, una fase de reacción y una fase orgánica de extracción. El furfural se genera en la fase de reacción y rápidamente pasa a la fase orgánica, reduciendo las reacciones secundarias y mejorando la selectividad. El furfural exhibe una mayor afinidad por la fase orgánica, donde las reacciones de degradación se inhiben principalmente debido a la ausencia de un catalizador (Mariscal et al., 2016). Para la fase de reacción suelen emplearse el agua (fundamentalmente) y los líquidos iónicos, y para la fase orgánica el tetrahidrofurano (THF), ciclopentilo metil éter (CPME), el 2-metiltetrahidrofurano (2-MTHF), tolueno, n-butanol y cetona de metil isobutil (MIBK).

Para inhibir la formación de productos secundarios en la producción de furfural, una de las técnicas más prometedoras es el empleo de un disolvente orgánico, formando un sistema bifásico (Le Guenic et al., 2015). El empleo de este sistema no altera la cinética de formación del furfural, su función únicamente es ser un almacén del furfural producido, para evitar su degradación y aumentar su rendimiento y selectividad (Weingarten et al., 2010). Sin embargo, la posterior extracción y la separación del furfural y la recuperación del disolvente conllevan la realización de un complejo proceso con alto consumo energético, lo que supone un gran inconveniente para su uso. Actualmente, se están investigando nuevos materiales sólidos ácidos que faciliten la producción, separación y purificación del furfural.



En la actualidad, la producción de furfural a nivel industrial tiene muchos retos, principalmente el elevado coste energético, los bajos rendimientos y la contaminación ambiental.

En la presente Tesis Doctoral, la obtención de furfural se ha realizado con una estrategia en dos etapas, una primera etapa de pretratamiento ácido optimizado para maximizar la solubilización de la fracción hemicelulósica y una segunda etapa de deshidratación de la xilosa a furfural. Se ha evaluado el efecto de diferentes catalizadores homogéneos, como ácido de Brønsted se empleó el ácido sulfúrico y como ácido de Lewis se ha ensayado con FeCl_3 , NaCl y AlCl_3 . Cabe destacar que en este caso el ácido sulfúrico presenta una doble función, en la primera etapa promueve la hidrólisis ácida de la fracción hemicelulósica y en la segunda etapa actúa como ácido de Lewis en la deshidratación de la xilosa a furfural, no siendo necesario adicionarlo para la segunda etapa. Todos los ensayos se han llevado a cabo en un sistema monofásico en el que se ha empleado el hidrolizado obtenido tras el pretratamiento ácido.

Los ensayos tuvieron lugar en un reactor de microondas. Es una técnica en auge en los últimos años, ya que presenta múltiples ventajas como los tiempos de reacción más cortos y reacciones más eficientes (mayores rendimientos y selectividades). Esta técnica ofrece un tiempo de calentamiento rápido, eficiente y homogéneo, minimizando los gradientes de temperatura dentro de la muestra, acelerando la velocidad de la reacción, aumentando los rendimientos de deshidratación de los carbohidratos y reduciendo la formación de subproductos (Le Guenic et al., 2015; Weingarten et al., 2010). Además, el reactor empleado (Anton Parr, Monowave 400) permitió tener un alto control de las temperaturas y tiempos de trabajo, así como unos enfriamientos relativamente rápidos, minimizando la formación de productos de degradación.

1.6. Valorización de lignina

En la mayoría de sistemas de biorrefinerías actuales, la lignina es aún una fracción subutilizada y suele emplearse como combustible para la generación de energía. Normalmente esta fracción es separada para facilitar la recuperación de las fracciones azucaradas. Sin embargo, su valorización puede suponer una mejora en la viabilidad y sostenibilidad de una biorrefinería (Najafi et al., 2021).

La lignina es un polímero fenólico que forma parte de la pared celular produciendo rigidez y resistencia, está formada por grupos hidroxilo fenólicos y alifáticos. La estructura de la lignina varía en función de la planta, su origen y las condiciones de crecimiento. En general, las ligninas de madera blanda están compuestas principalmente de unidades de guaiacil, mientras que las ligninas de madera dura se basan en proporciones variables de unidades de guaiacil y siringilo (Schorr et al., 2014).

Los procesos de deslignificación de la biomasa descomponen la lignina en fragmentos de menor peso molecular, modificando sus propiedades fisicoquímicas; por eso el proceso de extracción de la lignina tiene gran influencia en su composición y propiedades (Erdocia et al., 2014).

Los procesos deslignificantes más utilizados implican la acción de álcalis que aunque reaccionan principalmente con la lignina, también afectan a las hemicelulosas. Los agentes más utilizados son los hidróxidos de metales alcalinos (sodio, potasio o calcio). Tradicionalmente ha sido uno de los procesos más conocidos por emplearse en la industria de la pulpa y el papel, el proceso Kraft (que utiliza sulfuro de sodio e hidróxido de sodio). Tiene la ventaja de que se puede realizar a bajas temperaturas, aunque la calidad de la lignina es bastante (Alves-Ferreira et al., 2021).

Estos procesos producen actualmente el mayor volumen de lignina, pero son ligeramente específicos y requieren operaciones significativas de tratamiento de aguas residuales. Los procesos organosolv se basan en la utilización de mezclas acuosas de disolventes orgánicos como acetona, etanol, metanol, glicerol, ácido fórmico o ácido acético (Alves-Ferreira et al., 2021). Es una técnica de deslignificación interesante ya que presenta bajo punto de ebullición, simplicidad de proceso y fácil reciclaje. Además permite obtener lignina con bajo contenido de cenizas, mayor pureza (debido a un menor contenido de carbohidratos) y, en general, con bajo peso molecular y mayor hidrofobicidad (Moniz et al., 2018). Tradicionalmente la lignina solubilizada se recupera por precipitación ácida (Schorr et al., 2014), pero las ligninas solubilizadas en



pretratamientos organosolventes pueden precipitarse mediante la adición de agua (Alves-Ferreira et al., 2021).

Los principales usos para la valorización de la lignina se enumeran a continuación;

- La lignina es una excelente fuente de energía y es adecuada en la producción de electricidad, combustible, vapor y gas de síntesis (Schorr et al., 2014).
- Por otro lado, la lignina también tiene un gran potencial para el procesamiento de materiales poliméricos (polímeros conductores, poliuretanos y selladores termoplásticos) (Lobato-Peralta et al., 2021).
- Los últimos estudios, sitúan a la lignina como una fracción susceptible para su valorización para la obtención de compuestos de valor añadido, como antioxidantes, tensioactivos y emulsionantes. Su principal interés se centra en la producción de compuestos fenólicos como el ácido vanílico, el ácido sirringico, el siringaldehído y el p-hidroxibenzaldehído (Alves-Ferreira et al., 2021). Esta propiedad se la confieren los grupos hidroxilo que conforman su estructura aromática (García et al., 2017).

Los compuestos fenólicos son una clase de compuestos químicos formados por uno o más grupos hidroxilo unidos a un grupo de hidrocarburo aromático, que se puede encontrar como glucósidos libres y formas glucosídicas, esto significa que están vinculados a azúcares (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, etc.) (Medina-Torres et al., 2017).

Según su estructura química se pueden clasificar en flavonoides, alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos y lignanos. Suponen la fuente más importante de compuestos bioactivos de la dieta humana, se pueden encontrar en frutas, verduras, vegetales y legumbres. Estos compuestos pueden tener propiedades antioxidantes.

Un antioxidante se puede definir como cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas, generalmente biomoléculas. Pueden tener un origen sintético como la terbutilhidroxiquinona (TBHQ, E319), el butilhidroxianisol (BHA, E320) o el butilhidroxitolueno (BHT, E321), o bien un origen natural. Se pueden emplear en la industria alimentaria, como sustituyente de los antioxidantes sintéticos por naturales. También está en auge su empleo en la industria farmacéutica y cosmética, debido a los beneficios sobre la salud que presentan estos compuestos por sus bioactividades y propiedades saludables. (Gullón et al., 2017).

2. Hipótesis y objetivos



Hipótesis de partida

Existen grandes cantidades disponibles de residuos y subproductos derivados del cultivo del olivar y de la industria oleícola, entre ellos el hueso de aceituna, que pueden emplearse como materias primas en una biorrefinería para la obtención de biocarburantes y productos químicos, lo que constituye una estrategia de valorización de gran interés socioeconómico y medioambiental.

Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es proponer un esquema eficiente de valorización del hueso de aceituna mediante el desarrollo de procesos de conversión a escala de laboratorio de las principales fracciones que lo componen, principalmente enfocado para la obtención de furfural y bioetanol, evaluando diferentes pretratamientos y configuraciones de proceso.

Objetivos específicos

1. Maximizar la recuperación de la hemicelulosa en la fracción líquida y la obtención de hidrolizados con altas concentraciones de xilosa.
2. Determinar las condiciones de operación más adecuadas para la obtención de furfural a partir xilosa sintética y de los hidrolizados del pretratamiento ácido.
3. Evaluar la aplicación de una segunda etapa de pretratamiento que permita mejorar la digestibilidad enzimática la celulosa recuperada en la fracción sólida.
4. Estimar la producción de etanol por fermentación de azúcares celulósicos y hemicelulósicos
5. Realizar un estudio preliminar del potencial de valorización de la lignina solubilizada en los pretratamientos de deslignificación (oxidación alcalina y organosolvente).



3. Resumen de resultados y discusión conjunta



La presente Tesis Doctoral se enmarca en las líneas de investigación desarrolladas por el Grupo “Ingeniería Química y Ambiental” TEP-233 de la Universidad de Jaén en torno al aprovechamiento de biomásas y, particularmente, de residuos del cultivo del olivar y del proceso de fabricación de aceite de oliva.

En los últimos años, estas investigaciones han dado lugar a relevantes resultados científicos, incluyendo varias Tesis Doctorales y cerca de cien artículos científicos que cubren diversos aspectos de la transformación de las diferentes biomásas en productos de interés como biocombustibles, antioxidantes naturales, azúcares, materiales de base biológica, etc.

La presente Tesis Doctoral se enfoca en particular en el hueso de aceituna y estudia sus posibilidades de transformación en etanol y furfural, dos compuestos químicos con un gran potencial de aplicación, con la idea de contribuir al desarrollo de una biorrefinería basada en esta materia prima.

Del trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral se han derivado 6 artículos científicos que se recogen como anexos y se enumeran seguidamente. Los Artículos 1 a 3 están ya publicados en revistas de alto impacto (primer y segundo cuartil). Los Artículos 4 a 6 se presentan como manuscritos enviados para su publicación.

1. Título: Optimization with response surface methodology of microwave-assisted conversion of xylose to furfural
Autores: Carmen Padilla-Rascón, Juan Miguel Romero-García, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro
Publicación: *Molecules* 25, 3574 (2020)
Índice de impacto: 4,412
Posición: 63/178 en la categoría “CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY” (Segundo cuartil)
2. Título: Microwave-assisted production of furfural from the hemicellulosic fraction of olive stones
Autores: Carmen Padilla-Rascón, Juan Miguel Romero-García, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Eulogio Castro
Publicación: *Process Safety and Environmental Protection*, 152, 630–640 (2021)
Índice de impacto: 6.158
Posición 32/156 en la categoría “ENGINEERING, CHEMICAL” (Primer Cuartil)



3. Título: Valorisation of olive stone by-product for sugar production using a sequential acid/steam explosion pretreatment
Autores: Carmen Padilla-Rascón, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Eulogio Castro, José Miguel Oliva, Ignacio Ballesteros, Paloma Manzanares
Publicación: Industrial Crops & Products, 148, 112279 (2020)
Índice de impacto: 5.645
Posición: 2/16 en la categoría “AGRICULTURAL ENGINEERING” (Primer Cuartil)
4. Título: Ethanol production from olive stones using different process strategies
Autores: Juan Miguel Romero-García, Ana Isabel Susmozas, Carmen Padilla-Rascón, Paloma Manzanares, Eulogio Castro, José Miguel Oliva, Inmaculada Romero
Publicación: Renewable Energy (Enviado para su publicación)
Índice de impacto: 8.001
Posición: 16/114 en la categoría “ENERGY & FUELS” (Primer Cuartil)
5. Título: Multicomponent biorefinery based on combined acid / alkaline-oxidative treatment of olive stones for bioenergy and renewable chemicals production
Autores: Carmen Padilla-Rascón, Juan Miguel Romero-García, Inmaculada Romero Encarnación Ruiz, Eulogio Castro
Publicación: Fuel (Enviado para su publicación)
Índice de impacto: 6.609
Posición: 20/143 en la categoría “ENGINEERING, CHEMICAL” (Primer Cuartil)
6. Título: The role of organosolv fractionation in an integrated olive stone based biorefinery
Autores: Carmen Padilla-Rascón, Florbela Carvalheiro, Luís C. Duarte, Luisa B. Roseiro, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro
Publicación: Industrial Crops & Products (Enviado para su publicación)
Índice de impacto: 5.645
Posición: 2/16 en la categoría “AGRICULTURAL ENGINEERING” (Primer Cuartil)

Adicionalmente, los trabajos desarrollados durante una estancia de investigación realizada en el Laboratorio Nacional de Energía y Geología (LNEG) de Lisboa (Portugal) han dado lugar a la solicitud de una patente de invención, que se encuentra actualmente en fase de examen.

En la Figura 11 se muestra un esquema simplificado del conjunto del trabajo experimental llevado a cabo. Se han evaluado diferentes estrategias para el aprovechamiento de las fracciones mayoritarias que componen el hueso de aceituna: celulosa, hemicelulosa y lignina.

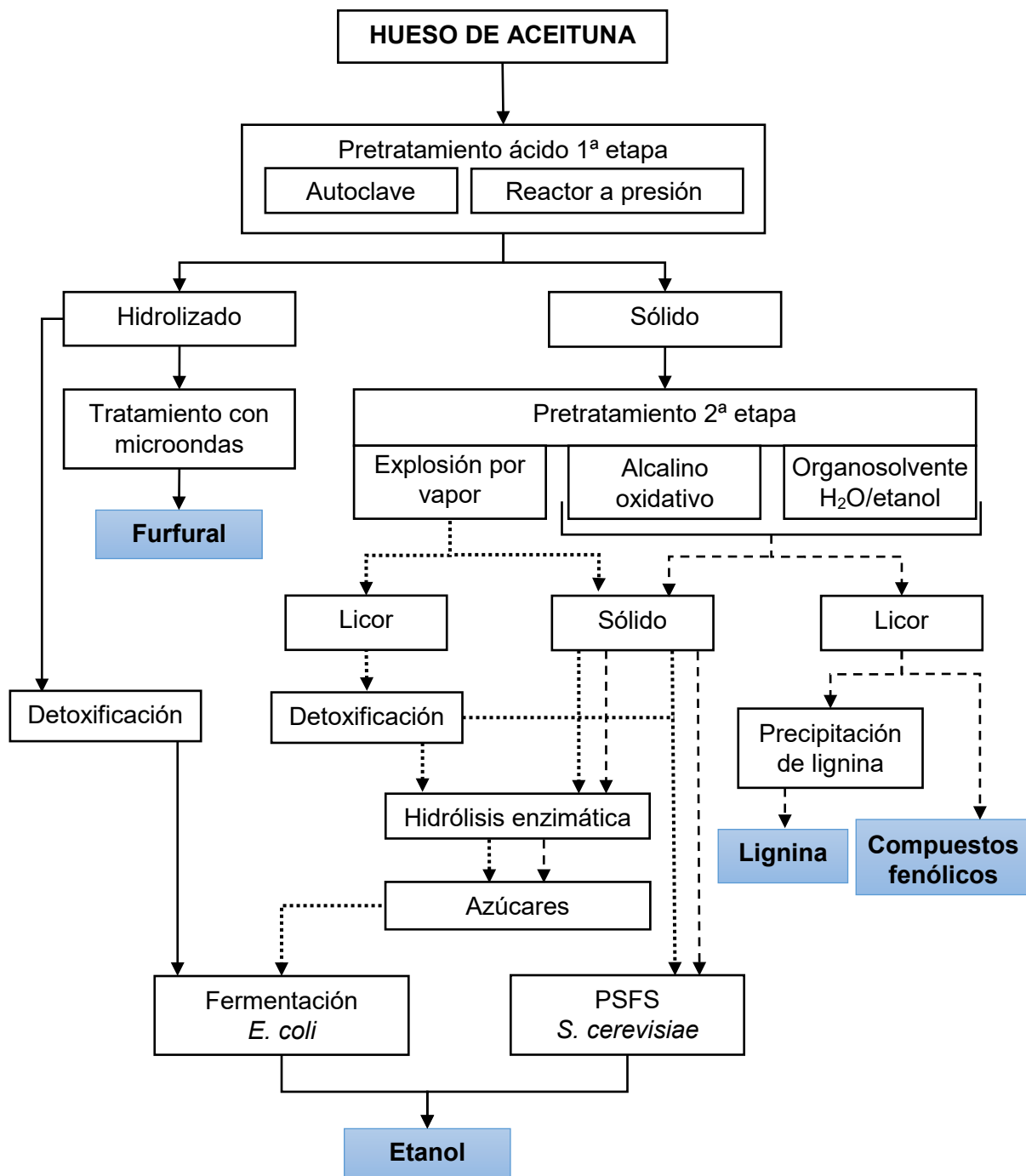


Figura 11. Esquema simplificado del proceso experimental.



En primer lugar, se realizó un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, con el objetivo principal de solubilizar la fracción hemicelulósica. En esta primera etapa, se ha evaluado la influencia de las condiciones experimentales de pretratamiento mediante distintos diseños de experimentos, aplicando la metodología de superficie de respuesta para la optimización de variables experimentales. Esta técnica permite, por una parte, optimizar recursos tanto personales como materiales y, por otra, obtener información de mayor calidad a partir de los resultados experimentales. El software utilizado ha sido Design Expert 8.0.7. Los ensayos se han llevado a cabo en dos tipos de reactores: un autoclave sin agitación para temperaturas inferiores a 130 °C (Artículos 2, 3 y 6) y un reactor a presión tipo tanque agitado (Parr) para temperaturas de hasta 210 °C (Artículo 5). Tras el pretratamiento ácido, las fracciones líquidas (hidrolizados) y sólidas se separaron por filtración.

Los hidrolizados obtenidos en la primera etapa, enriquecidos en xilosa, se emplearon para producir furfural en un reactor de microondas. Las condiciones experimentales se optimizaron en primer lugar con medios sintéticos (Artículo 1) y después con hidrolizados (Artículo 2), variando la temperatura y el tiempo, con el empleo de distintas sales metálicas como catalizador. Con las condiciones seleccionadas, se abordó la producción de furfural para distintos hidrolizados, en las diferentes estrategias de proceso ensayadas (Artículos 5 y 6).

Los sólidos obtenidos tras la primera etapa de pretratamiento ácido, se sometieron a una segunda etapa de pretratamiento, para la valorización de la celulosa y de la lignina. El rendimiento de hidrólisis enzimática de la fracción celulósica se utilizó como principal respuesta para evaluar la eficacia de las distintas condiciones experimentales empleadas. En primer lugar, se ensayó un pretratamiento mediante explosión por vapor a distintas temperaturas (Artículo 3). Las fracciones sólida y líquida resultantes se emplearon para la obtención de etanol, junto con el hidrolizado obtenido en la primera etapa ácida, mediante diferentes estrategias de fermentación con los microorganismos *E. coli* y *S. cerevisiae* (Artículo 4).

También se llevaron a cabo como segunda etapa pretratamientos deslignificantes, con el objetivo de enriquecer el contenido en celulosa del sólido y mejorar su digestibilidad, así como valorizar la fracción de lignina solubilizada en los líquidos. Por una parte, se realizó un pretratamiento alcalino oxidativo con peróxido de hidrógeno (Artículo 5). Se cuantificaron los compuestos fenólicos del licor y se precipitó la lignina solubilizada mediante acidificación. Por otra parte, se realizó un segundo pretratamiento de deslignificación organosolvente, con una mezcla agua/etanol (Artículo 6). El sólido obtenido se empleó para la obtención de etanol con una presacarificación seguida de

sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS) con *S. cerevisiae*. En el líquido se cuantificaron e identificaron los compuestos fenólicos mayoritarios y se precipitó la lignina soluble mediante la adición de agua. Cabe destacar que gran parte del trabajo experimental correspondiente al Artículo 6 se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Energía y Geología (LNEG) de Lisboa (Portugal), como fruto de una estancia de investigación internacional realizada en 2020, bajo la supervisión de Florbela Carvalheiro, Luis C. Duarte y Luisa B. Roseiro.

A continuación, se realiza un resumen de los principales resultados obtenidos y una discusión conjunta de los mismos.



3.1. Materia prima

El hueso de aceituna empleado fue suministrado por una empresa local dedicada a su comercialización como combustible (Peláez Renovables S.L.), ubicada en Jaén. Esta empresa lo recoge de almazaras de la provincia de Jaén y lo lleva a sus instalaciones, donde es sometido a un proceso de secado, eliminación de finos, limpieza y homogeneización; obteniendo un hueso con un tamaño de partícula entre 1-3.15 mm y una humedad aproximada del 8 %.

El proceso de obtención de aceite de oliva virgen en las almazaras consiste básicamente de tres etapas: molienda de la aceituna, batido de la pasta molida y centrifugación para separar la fase oleosa de la fase semisólida que queda como subproducto, formada por restos de pulpa, piel y hueso. Este subproducto, denominado orujo o alperujo, se lleva a las industrias extractoras de aceite de orujo (orujeras), donde generalmente se le extrae mediante disolventes el aceite residual, tras un secado del orujo, resultando un residuo final denominado orujillo. La separación del hueso de la pasta de aceituna molida en las almazaras y del orujo en las extractoras se ha convertido en una práctica habitual en los últimos años, debido al uso creciente del hueso de aceituna como combustible en calderas domésticas o en las propias instalaciones oleícolas. Esta disponibilidad del hueso localizado en grandes cantidades en almazaras y extractoras es una ventaja de tipo logístico de cara a su posible uso como materia prima en biorrefinerías, para la obtención de biocombustibles y otros productos de alto valor añadido.

En la presente Tesis Doctoral, se ha trabajado con diferentes lotes de hueso (Tabla 2). El lote 1 se empleó en los Artículos 3 y 4, el lote 2 para el Artículo 2 y el lote 3 para los Artículos 5 y 6. Estos lotes empleados como materia prima inicial, así como los sólidos obtenidos tras los distintos pretratamientos han sido caracterizados según los protocolos establecidos por el National Renewable Energy Laboratory (NREL) de EE.UU (Sluiter et al., 2012), para determinar su composición en celulosa (como glucosa), hemicelulosa (xilosa, galactosa y arabinosa), lignina, extractos, grupos acetilo y cenizas. En el caso de la materia prima inicial, se realizan dos etapas de extracción previas, acuosa y etanólica, para determinar su fracción de extractivos. El procedimiento de caracterización está basado en una hidrólisis ácida en dos etapas, la primera etapa a baja temperatura (30 °C) y alta concentración de H_2SO_4 (72 %), seguida de otra etapa ácida a alta temperatura (120 °C) y baja concentración de H_2SO_4 (4 %). Los azúcares y los grupos acetilo se cuantifican por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la lignina ácido soluble (LAS) por espectrofotometría y la lignina ácido insoluble (LAI) y las cenizas por pesada.

Tabla 2. Composición (% peso seco) de los lotes de hueso de aceituna empleados y comparación con otros autores (Romero-García et al., 2016; Ruiz et al., 2017).

Componentes (% peso seco)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Otros autores
Celulosa	20,9 ± 0,2	21,0 ± 0,8	21,0 ± 1,1	19,2-24,1
Glucosa	23,0 ± 0,2	23,1 ± 0,8	23,1 ± 1,2	21,2-26,5
Hemicelulosa	26,0 ± 0,1	23,2 ± 2,3	24,8 ± 1,6	28,6-34,4
Xilosa	26,6 ± 0,1	24,4 ± 1,1	24,0 ± 1,8	27,1-28,8
Galactosa	1,4 ± 0	0,85 ± 0,6	2,0 ± 0,1	2,6-5,2
Arabinosa	1,3 ± 0,0	0,73 ± 0,7	2,0 ± 0,1	2,6-4,8
Lignina	35,6 ± 0,4	32,2 ± 1,3	32,9 ± 0,3	32,5-37,2
LAI	33,9 ± 0,4	31,0 ± 1,2	31,7 ± 0,3	30,9-35,2
LAS	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,6-2
Extractos	6,3 ± 0,5	3,5 ± 0,2	4,1 ± 0,6	5,5-8,9
Grupos acetilo	5,9 ± 0,1	3,2 ± 0,5	3,3 ± 0,3	6,6
Cenizas	0,6 ± 0,0	0,70 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4

Como puede observarse en la Tabla 2, los lotes empleados tienen una composición muy similar. El hueso de aceituna presenta un alto contenido de polisacáridos: 21 % de celulosa y 23-26 % de hemicelulosa, suponiendo la xilosa alrededor del 90 % del total de la hemicelulosa. Esta composición está en el rango de las reportadas en otros estudios previos, aunque su contenido en hemicelulosa es ligeramente inferior (Romero-García et al., 2016; Ruiz et al., 2017). En comparación con otras biomásas derivadas del olivo (Contreras et al., 2020), el hueso es el subproducto con mayor contenido en polisacáridos, alcanzando el 47 %, frente al 36 % presente en la poda de olivo, el 21 % en el orujillo o el 16 % en las hojas de olivo. El contenido de lignina del hueso (32-36 %) también es mayor que en la poda (18 %), orujillo (22 %) y hojas (19 %). Por el contrario, el contenido de extractos de hueso (3,5-6 %) es menor que en el resto de biomásas derivadas del olivo (29, 39 y 49 % para la poda, hojas y orujillo, respectivamente).



3.2. Pretratamiento e hidrólisis enzimática: rendimiento en azúcares

Buena parte del trabajo experimental realizado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en la aplicación de diferentes pretratamientos al hueso de aceituna, siguiendo una estrategia general de fraccionamiento en dos etapas, con el objetivo principal de conseguir la mayor recuperación de azúcares en forma monomérica, susceptibles de ser transformados en furfural y etanol. En la Tabla 3 se resumen los pretratamientos empleados y las correspondientes condiciones experimentales ensayadas en cada artículo. Las fracciones sólidas y líquidas obtenidas tras cada pretratamiento se han separado por filtración y se han caracterizado, para determinar su contenido en azúcares y lignina, y los compuestos de degradación formados: ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico, HMF y furfural.

Tabla 3. Pretratamientos y condiciones experimentales ensayadas con el hueso de aceituna.

Artículo	Lote de hueso	Pretratamientos	Condiciones experimentales
2	2	Ácido diluido (autoclave)	Diseño factorial T: 120-130 °C; 1,5-3,5 % H ₂ SO ₄ (p/v) Variables fijas: S/L: 20 % (p/v); t: 60 min
3	1	Ácido diluido (autoclave)	Diseño Box-Behnken T: 120-130 °C; 2,5-5,8% H ₂ SO ₄ (p/v); S/L: 20-60% (p/v) Variables fijas: t: 60 min
		Explosión por vapor	T: 180, 195, 210 y 225 °C Variables fijas: t: 5 min
5	3	Ácido diluido (reactor Parr)	Diseño compuesto central rotatable T: 170-200 °C; 0,5-2 % H ₂ SO ₄ (p/v) Variables fijas: S/L: 40 % (p/v); t: 0 min
		Oxidación alcalina	1, 3, 5 y 7 % H ₂ O ₂ (p/v) Variables fijas: S/L: 10 % (p/v); t: 60 min; T: 80 °C; pH 11.5 con NaOH
6	3	Ácido diluido (autoclave)	Condiciones optimizadas en el Artículo 3: T: 128 °C; 3,48 % H ₂ SO ₄ (p/v); S/L: 33 % (p/v)
		Organosolvente (reactor Parr)	T: 140, 165 y 190 °C; 0-0,98% H ₂ SO ₄ (p/v); t: 0-120 min Variables fijas: S/L: 16,67 % (p/v); 50 % etanol/H ₂ O

T: temperatura; t: tiempo; S/L: relación sólido/líquido.

El pretratamiento ácido realizado como primera etapa se llevó a cabo según diferentes diseños de experimentos, para evaluar la influencia de las distintas variables y sus posibles interacciones. El objetivo principal de esta primera etapa es la solubilización y

recuperación de azúcares hemicelulósicos (principalmente xilosa) en la fracción líquida. La realización de una segunda etapa sobre la fracción sólida obtenida ha sido necesaria para que la celulosa recuperada en el sólido pretratado sea susceptible de ser sacarificada a glucosa con altos rendimientos. Los ensayos de hidrólisis enzimática (HE) realizados para evaluar la digestibilidad enzimática de la celulosa se han llevado a cabo en condiciones estándares, con la enzima Cellic® CTec2 (Novozymes) con una concentración de 15 FPU/g sustrato y β -glucosidasa (Novozymes) al 10 % respecto a la concentración de Cellic® CTec 2. La relación sólido/líquido fue del 5 % (p/v) en tampón de citrato de sodio (0,05 M), a 50 °C durante 72 h. El principal parámetro empleado para evaluar la eficacia del pretratamiento ha sido el rendimiento de HE, expresado como la glucosa liberada por HE, referida en porcentaje a la cantidad de glucosa contenida en la materia prima.

El Artículo 2 se ha centrado en la producción de furfural (sección 3.4) a partir de la xilosa solubilizada en los hidrolizados obtenidos mediante el pretratamiento del hueso de aceituna con ácido sulfúrico en autoclave, variando la temperatura (120-130 °C) y la concentración de ácido (1,5-3,5 % H_2SO_4), siguiendo un diseño experimental de tipo factorial (Tabla 1, Artículo 2). La carga de sólido empleada fue del 20 % (p/v) y el tiempo se fijó en 60 minutos.

Con respecto a recuperación de xilosa en los hidrolizados, el modelo obtenido de superficie de respuesta muestra que a concentraciones de ácido intermedias y temperaturas altas la concentración de xilosa obtenida es máxima, lo que indica que en condiciones más severas la xilosa ya se está degradando y por tanto su concentración no aumenta (Figura 4, Artículo 2). Según el modelo, las condiciones óptimas para obtener la máxima concentración de xilosa son 130 °C y 2,6 % (p/v) de H_2SO_4 , con las que se obtuvo un hidrolizado con una concentración de 40,27 g/L de xilosa y una recuperación de xilosa del 83 % con respecto a la contenida en la materia prima.

En el Artículo 3 se optimizó la primera etapa de pretratamiento ácido en autoclave, incluyendo la carga de sólido como variable experimental (20-60 % (p/v)), con vistas a incrementar la concentración de azúcares solubilizados. También se modificó la temperatura (120-130 °C) y la concentración de ácido (2,5-5,8 % H_2SO_4 (p/v)), según un diseño de experimentos tipo Box-Behnken (Tabla 1, Artículo 3).

Tras analizar la influencia de cada una de las variables, se pudo observar que la baja carga de sólido y de ácido y la alta temperatura tienen una influencia positiva en la recuperación de xilosa (Figura 2, Artículo 3). Como es de esperar, la carga de biomasa fue el factor más influyente en la concentración de xilosa del hidrolizado, con una



influencia positiva significativa. A baja temperatura y concentración de ácido la concentración de xilosa es baja, son unas condiciones demasiado suaves para su solubilización (Figura 1, Artículo 3). Por otra parte, a alta temperatura y concentración de ácido, las concentraciones de xilosa también son bajas, debido a su degradación, observándose un aumento de la concentración de furfural a estas condiciones (Figura 1, Artículo 3).

Las condiciones óptimas se determinaron maximizando la concentración y el rendimiento en xilosa y minimizando la formación de furfural, con vistas a la utilización del hidrolizado para la obtención de etanol (Artículo 4), ya que el furfural es un inhibidor de la fermentación. Las condiciones óptimas se obtuvieron a 128°C, 3,48 % H_2SO_4 (p/v) y S/L 33 % (p/v), con las que se obtuvo un hidrolizado con una concentración de xilosa de 62,1 g/L y una recuperación de xilosa del 71 %. La fracción sólida resultante queda enriquecida en celulosa (31,6 % en peso), aunque de su HE sólo se consigue recuperar el 2 % de la glucosa contenida en el hueso sin pretratar.

Para aumentar su digestibilidad enzimática se sometió a una segunda etapa de pretratamiento mediante explosión por vapor (sin lavar, para aprovechar el ácido de impregnación, aproximadamente 2,4 g H_2SO_4 /100 g sustrato), donde se varió la temperatura de trabajo (180-225 °C). Tras este segundo pretratamiento se obtuvieron rendimientos de HE del 26-32 %. Para aumentar los rendimientos obtenidos se efectuó una molienda de la biomasa pretratada a un tamaño de partícula de 1 mm, previamente a la HE, con lo que se consiguió un aumento de los rendimientos de HE hasta un 58-64 % (14,7 g glucosa/100 g hueso). Las fracciones sólida y líquida de esta segunda etapa de pretratamiento se utilizaron también para la obtención de etanol (Artículo 4).

Para el Artículo 5 también se empleó un pretratamiento ácido, en este caso en un reactor a presión (Parr) de 1 L, lo que permitió aumentar la temperatura de trabajo (170-200 °C), que se varió junto con la concentración de ácido (0,5-2 % H_2SO_4 (p/v)) según un diseño compuesto central rotatable (Tabla 1, Artículo 5). La relación sólido líquido fue del 40 % (p/v).

En este trabajo se pretendía obtener una alta recuperación de xilosa en el hidrolizado y alta digestibilidad enzimática de la celulosa contenida en el sólido en una única etapa de pretratamiento ácido. La concentración de xilosa en el hidrolizado aumentó con el incremento de la concentración de ácido a temperaturas bajas, disminuyendo a condiciones más severas (alta temperatura y concentración de ácido) por degradación, mientras que aumentaba la concentración de glucosa en el hidrolizado, debido a la solubilización de parte de la celulosa (Figura 1, Artículo 5). Las concentraciones de

glucosa obtenidas por HE de la celulosa contenida en los sólidos pretratados fueron mayores a temperaturas más altas y a concentraciones de ácido medias/bajas (Figura 2, Artículo 5).

Del análisis estadístico de las respuestas obtenidas, maximizando simultáneamente la concentración de xilosa en el hidrolizado y la de glucosa por HE de la celulosa, se determinaron como condiciones óptimas 194 °C y 0,5 % H_2SO_4 (p/v) (Figura 3, Artículo 5). Bajo estas condiciones se obtuvo un hidrolizado con una concentración de 67 g/L de xilosa y una recuperación de xilosa del 70 %, valores similares a los obtenidos en la primera etapa ácida en autoclave en el Artículo 2. Así, el empleo de un reactor a presión, permitió reducir considerablemente las concentraciones de ácido a emplear, aunque con temperaturas de operación más altas. El rendimiento de HE de la celulosa en estas condiciones óptimas fue del 41 % (9,4 g/100 g hueso), con lo que se mejora el rendimiento global de azúcares en una sola etapa con respecto al Artículo 2, aunque la digestibilidad de la celulosa todavía es mejorable, con lo que se evidencia el carácter altamente recalcitrante de la estructura del hueso de aceituna, que hace muy difícil el aprovechamiento de sus azúcares estructurales en una única etapa.

Para aumentar los rendimientos de HE, se ensayó un tratamiento alcalino oxidativo con peróxido de hidrógeno (Martínez-Patiño et al., 2017). Se ensayaron diferentes concentraciones de H_2O_2 (1-7 %) a pH 11,5 con NaOH, durante 60 min a 80 °C. Con un 7 % de H_2O_2 , el contenido en celulosa del sólido pretratado se incrementó hasta el 52 %, como consecuencia de solubilización del 51 % de la lignina que se alcanzó en esas condiciones. El rendimiento de HE de la celulosa ascendió hasta el 70,34 % (16,22 g/100 g hueso). El hidrolizado enriquecido en xilosa obtenido en el pretratamiento ácido se empleó para la obtención de furfural (apartado 3.4).

En el Artículo 6 se replicaron las condiciones óptimas de la primera etapa ácida del Artículo 3 (128 °C, 3,48 % H_2SO_4 (p/v) y S/L 33 % (p/v)). El hidrolizado (65,8 g/L de xilosa) se empleó para la producción de furfural (apartado 3.4). Con el lote de material sólido pretratado obtenido, se abordó la aplicación de una segunda etapa de pretratamiento por organosolvente (50 % etanol:50 % agua).

Esta investigación se llevó a cabo en una estancia de investigación internacional, en el Laboratorio Nacional de Energía y Geología (LNEG) de Lisboa (Portugal). Se ensayaron diferentes condiciones experimentales, modificando la temperatura (140-190 °C), la concentración de ácido sulfúrico (0-0,98 %) y el tiempo (0-120 min) (Tabla 2, Artículo 6), manteniendo fija la relación sólido/líquido (16.67 % en sólidos). Tras la determinación de los rendimientos de HE, se concluye que las mejores condiciones de



operación son 190 °C y 30 min, sin el empleo de ácido, obteniéndose un rendimiento de hidrólisis enzimática del 76 % (19,1 g/100 g hueso) a partir de un sólido enriquecido en celulosa (54,5 %), como consecuencia del grado de deslignificación alcanzado (49,8 %).

En estas condiciones se ensayó la producción de etanol mediante PSFS (apartado 3.3). Por otra parte, se determinó la composición de compuestos fenólicos en las fracciones líquidas obtenidas y su capacidad antioxidante, así como la separación mediante precipitación de la lignina solubilizada (apartado 3.5).

En la Tabla 4 se incluyen, a efectos comparativos, los rendimientos de azúcares recuperados en los distintos pretratamientos ensayados, en las condiciones óptimas determinadas en cada uno de los artículos. Con la primera etapa de pretratamiento ácido se ha conseguido recuperar entre 19 y 22,6 g hemicelulosas/100 g de hueso, a las distintas condiciones optimizadas de trabajo en cada artículo, a pesar de que las variables, los rangos de estudio y las respuestas seleccionadas para la optimización no fueron las mismas. Las mismas condiciones óptimas de pretratamiento ácido se emplearon con dos lotes de hueso diferentes (Artículo 3 y 6), no observándose diferencias significativas en los resultados, lo que es indicativo de la reproducibilidad del proceso. La glucosa solubilizada en la fracción líquida resultante del pretratamiento ácido es baja en las condiciones optimizadas, recuperándose la mayor parte de la celulosa en la fracción sólida. En las condiciones más severas de las ensayadas, se ha observado una mayor solubilización de celulosa y, al mismo tiempo, la degradación de los azúcares hemicelulósicos solubilizados (Tabla 1, Artículo 5).

La realización de una segunda etapa de pretratamiento se hace necesaria en todos los casos, dado que la digestibilidad enzimática de la celulosa de la fracción sólida obtenida en la primera etapa de pretratamiento ácido es baja. El máximo valor alcanzado fue de 9,4 g glucosa/100g hueso en el Artículo 5, en las condiciones experimentales en las que se realizó la optimización conjunta de la recuperación de azúcares hemicelulósicos en el hidrolizado y de glucosa por HE (194 °C y 0,5 % H₂SO₄ (p/v)) (Tabla 4). No obstante, este resultado representa un rendimiento limitado, del 41 % de la celulosa del material, lo que resulta indicativo de la alta recalcitrancia que tiene esta biomasa. De entre los pretratamientos ensayados como segunda etapa (explosión con vapor y deslignificación mediante oxidación alcalina o por organosolvente) el más efectivo para aumentar la digestibilidad enzimática de la celulosa ha sido el organosolvente, alcanzándose una recuperación de 19,1 g glucosa/100g hueso.

Los valores de rendimientos globales en azúcares que se recogen en la última columna de la Tabla 4, muestran la totalidad de los azúcares obtenidos en las dos etapas de

pretratamiento, excepto en el caso del Artículo 2, que contempla solo una etapa de pretratamiento, ya que este trabajo se centró en la producción de furfural a partir de la fracción hemicelulósica. Cuando se aplican estrategias de fraccionamiento del hueso de aceituna en dos etapas, en las condiciones optimizadas se consigue recuperar entre el 71 y el 88 % de los azúcares de la materia prima. Los mayores rendimientos globales de azúcares se obtienen con el pretratamiento ácido en el autoclave a 128 °C, 3,48 % H₂SO₄ (p/v) y una carga de sólido del 33 % (p/v), seguido de un pretratamiento organosolvente (190 °C y 30 min), llegando a recuperarse 45 g azúcares/100 g hueso de aceituna.

Tabla 4. Rendimientos de azúcares recuperados en las condiciones óptimas determinadas para los distintos pretratamientos ensayados.

Artículo	Pretratamiento y condiciones	Azúcares recuperados en el líquido (g/100 g hueso)		Glucosa recuperada por HE (g/100 g hueso)	Rendimiento global de azúcares*	
		Glu.	Hemi.		(g/100 g hueso)	(%)
2	Ácido diluido T: 130 °C; 2,6 % H ₂ SO ₄ (p/v)	0,5	22,6	-	23,1	47,1
3	Ácido diluido T: 128 °C; 3,48 % H ₂ SO ₄ (p/v); S/L: 33 % (p/v)	0,8	21,0	0,5	42,8	81,8
	Steam explosion T: 195 °C	2,3	4,0	14,7		
5	Ácido diluido T: 194 °C; 0,5 % H ₂ SO ₄ (p/v)	0,8	19,2	9,4	36,2	70,8
	Oxidación alcalina 7 % H ₂ O ₂	-	-	16,2		
6	Ácido diluido T: 128 °C; 3,48 % H ₂ SO ₄ (p/v); S/L: 33 % (p/v)	0,4	22,1	0,5	45,0	88,0
	Organosolvente T: 190 °C; t: 30 min	1,4	2	19,1		

T: temperatura; t: tiempo; S/L: relación sólido/líquido; HE: hidrólisis enzimática.

* Rendimiento global de azúcares: suma de todos los azúcares obtenidos en el hidrolizado de la primera etapa, el licor de la segunda etapa y la glucosa recuperada por HE a partir del sólido pretratado en la segunda etapa.



3.3. Producción de etanol

La obtención de etanol a partir de los azúcares contenidos en el hueso de aceituna se ha abordado en los Artículos 4 y 6. El Artículo 4 se centra en la producción de etanol a partir de las distintas fracciones de azúcares generadas durante el fraccionamiento del hueso en dos etapas llevado a cabo en el Artículo 3, mediante distintas estrategias de fermentación con la levadura *S. cerevisiae* y la bacteria *E. coli* (capaz de fermentar tanto hexosas como pentosas). En el Artículo 6 se ensaya la producción de etanol a partir de la fracción celulósica mediante un proceso de presacarificación y fermentación simultáneas (PSFS) con *S. cerevisiae*.

En el Artículo 4 se plantea la conversión a etanol de los azúcares recuperados en las dos etapas de pretratamiento secuencial de hueso (Artículo 3), una etapa ácida para la solubilización de las hemicelulosas en la fracción líquida (128 °C, 3,48 % H_2SO_4 (p/v) y S/L 33 % (p/v)) y una etapa de explosión por vapor (195 °C, 5 minutos), de la que se obtiene una segunda fracción líquida y una fracción sólida enriquecida en celulosa, susceptible de generar glucosa por hidrólisis enzimática. El objetivo del trabajo, además de conseguir una efectiva conversión de hexosas y pentosas, es alcanzar elevadas concentraciones de etanol, por encima del 4 % (p/v), que es considerada como la concentración mínima para hacer viable su separación por destilación (Koppram et al., 2014). Para ello se utiliza una alta carga de sólidos en la HE, del 20 % (p/v). Las distintas estrategias de fermentación ensayadas están representadas esquemáticamente en la Figura 1 del Artículo 4:

- Estrategia 1: fermentación conjunta con *E. coli*, de la mezcla del hidrolizado de la etapa ácida y del hidrolizado enzimático obtenido a partir de las fracciones sólida y líquida del tratamiento de explosión por vapor.
- Estrategia 2: fermentación separada con *E. coli*, del hidrolizado de la etapa ácida y del hidrolizado enzimático obtenido a partir de las fracciones sólida y líquida obtenidas del tratamiento de explosión por vapor.
- Estrategia 3: fermentación separada con *E. coli*, del hidrolizado de la etapa ácida y presacarificación y fermentación simultáneas con *S. cerevisiae* de las fracciones sólida y líquida obtenidas del tratamiento de explosión por vapor.

En todos los casos fue necesario realizar tratamientos de detoxificación de las fracciones líquidas obtenidas en las dos etapas de pretratamiento, para reducir la concentración de compuestos inhibidores para la fermentación y la HE. Se han empleado los tratamientos de adsorción con carbón activo y de intercambio iónico con

resinas. En el caso del hidrolizado de la primera etapa ácida fue necesario además realizar una etapa adicional de evaporación.

De los resultados obtenidos, se descartó la estrategia 1, con la que no se consiguió superar una concentración de etanol de 20 g/L. Con las estrategias 2 y 3 se obtienen rendimientos y concentraciones de etanol similares, hasta 25 g/L de etanol a partir del hidrolizado de la primera etapa ácida (7,56 g etanol/100 g hueso, Tabla 5) y hasta 36 g/L de etanol (8,53-8,68 g etanol/100 g hueso) a partir de las fracciones sólida y líquida del pretratamiento de explosión por vapor. Esta concentración es superior a la mínima requerida para la separación del etanol por destilación (32 g/L, 4 % p/v (Koppram et al., 2014)). En cuanto a los tiempos de proceso, la estrategia 3 (PSFS) se mostró más efectiva, con un tiempo total de 52 h (4 h de presacarificación y 48 h de SFS), frente a las 70 h de proceso en el caso de la estrategia 2 (Figura 6, Artículo 4). Ambas presentan un tiempo de 96 h para la fermentación del hidrolizado de la primera etapa ácida. Por tanto, se puede concluir que la PSFS es el proceso más adecuado para la producción de etanol a partir de la glucosa del hueso. Sin embargo, la conversión de xilosa a etanol mediante fermentación presenta más dificultades que a partir de la glucosa, quedando una importante cantidad sin consumir en todas las estrategias ensayadas (Figuras 2 y 3, Artículo 4).

En el Artículo 6, la fracción sólida resultante de la segunda etapa de pretratamiento por organosolvente en las condiciones optimizadas (190 °C, 30 minutos, 50 % ethanol:50 % H₂O), enriquecida en celulosa, se empleó para la producción de etanol mediante PSFS. En este caso, la fracción líquida obtenida por organosolvente no resulta apta para la fermentación y su valorización se plantea a partir de la fracción de lignina solubilizada (sección 3.5). La fracción líquida de la primera etapa ácida se ha empleado para la producción de furfural (sección 3.4). Las condiciones de operación de la PSFS fueron similares a las empleadas en el Artículo 4, con un 20 % (p/v) de sólidos. En la Figura 3 del Artículo 6 se recogen los resultados obtenidos con las distintas cargas enzimáticas ensayadas (15, 30 y 40 FPU Cellic® CTec2/g sustrato). Se alcanzan 47 g/L de etanol con 30 FPU/ g sustrato, que corresponde a un rendimiento en etanol del 61,4 % con respecto al máximo teórico que podría obtenerse.

De la comparación de los rendimientos de obtención de etanol a partir de hueso que se recogen en la Tabla 5, puede observarse que si bien el rendimiento en etanol con respecto a la materia prima inicial es inferior en el caso de la PSFS de la fracción sólida de organosolvente (6,22 g etanol/100 de hueso), la concentración de etanol es muy superior (47 g/L), superando ampliamente la requerida para su destilación.



Tabla 5. Estrategias óptimas empleadas para la producción de etanol por fermentación.

Artículo	Estrategia	Estrategia	Etanol producido	
			(g/L)	(g/100 de hueso)
4	Estrategia 2	<i>E. coli</i> : hidrolizado	25	7,56
		<i>E. coli</i> : HE licor (licor EV + sólido EV)	35	8,53
4	Estrategia 3	<i>E. coli</i> : hidrolizado	25	7,56
		PSFS <i>S. cerevisiae</i> : sólido EV + licor EV	36	8,68
6	PSFS <i>S. cerevisiae</i> : sólido organosolvente		47	6,22

Licor EV: licor detoxificado obtenido mediante explosión por vapor; Sólido EV: sólido obtenido mediante explosión por vapor.

3.4. Producción de furfural

La obtención de furfural se ha abordado en los Artículos 1, 2, 5 y 6. En el Artículo 1 se llevó a cabo un estudio preliminar en medio sintético, mientras que el Artículo 2 se centró en la producción de furfural a partir de hidrolizados de hueso de aceituna. En los Artículos 5 y 6, se aplicaron las mejores condiciones determinadas en el Artículo 2 para la producción de furfural a partir de hidrolizados de hueso, dentro de una estrategia global de biorrefinería. A efectos comparativos, en la Figura 12 se han recogido los mejores valores de concentración y rendimiento en furfural obtenidos en cada caso, así como la concentración inicial de xilosa.

En el estudio preliminar realizado con xilosa sintética (30 g/L), se determinaron los factores más influyentes y las condiciones más adecuadas para la producción de furfural en un reactor de microondas (Artículo 1). Se aplicó la metodología de diseño de experimentos, con un primer diseño de tipo factorial y un segundo diseño experimental de tipo compuesto central rotatable. Las variables de estudio fueron la temperatura, el tiempo de reacción y la concentración de catalizador (FeCl_3). Los catalizadores empleados fueron el ácido sulfúrico al 2 % (p/v), que actúa como ácido de Brønsted, y FeCl_3 (0,05-0,3 M) como ácido de Lewis. Como respuestas se maximizaron conjuntamente el rendimiento en furfural, la conversión de xilosa y la selectividad. En las condiciones optimizadas (210 °C, 0,5 min y 0,05 M FeCl_3) se obtuvo una concentración de furfural de 11 g/L y un rendimiento del 57 % (Figura 12).

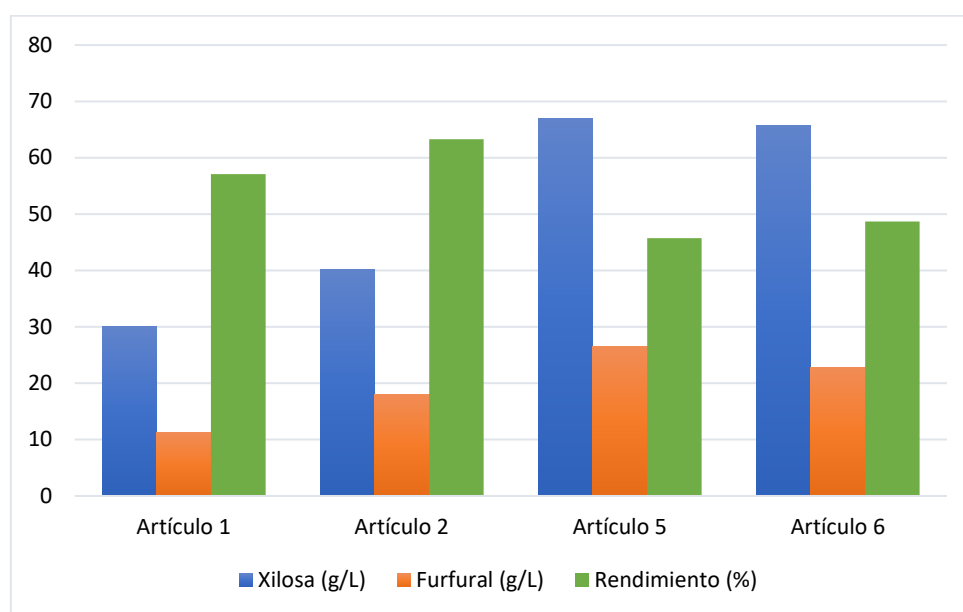


Figura 12. Producción y rendimiento en furfural obtenido en los distintos artículos, con diferentes concentraciones iniciales de xilosa.



En el Artículo 2 se estudió la producción de furfural a partir de hidrolizados ricos en xilosa obtenidos de la solubilización de las hemicelulosas de hueso de aceituna pretratados mediante hidrólisis con ácido sulfúrico en distintas condiciones (14 experimentos de un diseño experimental de dos factores, temperatura y concentración de ácido). Para la obtención de furfural se utilizó el reactor de microondas, aplicando una rampa de calentamiento en varias etapas, hasta alcanzarse los 200 °C (Figura 2, Artículo 2). Se empleó FeCl_3 0,2 M como catalizador, sin añadir ácido sulfúrico adicional al ya presente en los hidrolizados. Las conversiones de xilosa fueron superiores al 90 % en todos los experimentos, mientras que la selectividad en furfural osciló en el rango 51-80 %, lo que indica que aunque la mayor parte de la xilosa se convierte en furfural, parte del furfural formado se va degradando debido a reacciones de polimerización.

Del análisis de los resultados con la metodología de superficie de respuesta, la concentración de ácido empleada en la etapa de pretratamiento tiene mayor influencia que la temperatura en los rendimientos en furfural obtenidos y en la conversión de xilosa. No obstante, hay que tener en cuenta el efecto de estos factores en la concentración de xilosa obtenida en el pretratamiento. La concentración inicial de xilosa presente en el proceso de producción de furfural, afecta a los rendimientos obtenidos. Así, el mayor rendimiento en furfural obtenido en este diseño experimental (71 %, Tabla 3 del Artículo 2) corresponde a la concentración inicial de xilosa más baja (20,6 g/L), disminuyendo al aumentar la concentración de xilosa, debido a las mayores pérdidas de furfural por degradación (Gómez Millán et al., 2019). Sin embargo, la obtención de mayores concentraciones de furfural es importante para la aplicabilidad industrial del proceso, para lo que se requieren elevadas concentraciones iniciales de xilosa.

En las condiciones de pretratamiento optimizadas para obtener una mayor recuperación de xilosa en la fracción líquida (130 °C y 2,6 % H_2SO_4 (p/v)) se estudió la producción de furfural con distintas sales metálicas como catalizador (FeCl_3 , NaCl y AlCl_3) variando su concentración en el rango 0,1-0,3 M, sin añadir H_2SO_4 adicional al ya estar presente en el hidrolizado. Los resultados obtenidos (Tabla 5, Artículo 2) muestran un aumento de la conversión de xilosa con el incremento de la concentración de catalizador, mientras que el rendimiento en furfural disminuye a las mayores concentraciones de catalizador empleadas (0,2 y 0,3 M de FeCl_3 y AlCl_3 ; 0,3 M de NaCl), lo que indica pérdidas de furfural por degradación a las concentraciones más altas de catalizador. La mayor concentración (18 g/L) y rendimiento (63,3 %) de furfural se obtuvieron con FeCl_3 0,1 M (Figura 12).

En los ensayos realizados sin la adición de catalizador, la concentración de furfural, el rendimiento y la conversión fueron menores que con el empleo de catalizadores,

excepto en los casos donde hubo pérdidas por degradación a altas concentraciones de catalizador. Por otra parte, para evaluar el efecto de una disminución de la temperatura, se evaluó la producción de furfural a 170 °C, resultando concentraciones de furfural y rendimientos inferiores a los obtenidos a 200 °C.

En los Artículos 5 y 6, las condiciones experimentales optimizadas en el Artículo 2 se aplicaron a la producción de furfural a partir de la xilosa solubilizada en la primera etapa ácida de pretratamiento del hueso, con unas concentraciones iniciales de xilosa de 67 y 65,8 g/L, respectivamente. Como catalizador se empleó FeCl_3 , modificando su concentración en el rango 0,1-0,3 M, para optimizarla según la concentración de H_2SO_4 presente en el hidrolizado. Así, en el Artículo 6 los mayores valores de concentración y rendimiento en furfural (22,7 g/L y 48,7 %, respectivamente) se alcanzaron con una concentración de FeCl_3 de 0,1 M, mientras que en el Artículo 5 se obtuvieron con FeCl_3 0,3 M (26,5 g/L de furfural, 45,7 % de rendimiento). La mayor concentración de catalizador que fue necesaria en el Artículo 5 puede atribuirse a la baja concentración de H_2SO_4 empleado en el pretratamiento ácido.

Como se muestra en la Figura 12, la concentración de furfural obtenida aumenta cuanto mayor es la concentración de xilosa del hidrolizado de partida, mientras que los respectivos rendimientos descienden. Este comportamiento se debe a las pérdidas de furfural por degradación, ya que a mayores concentraciones de furfural mayor es su autopolimerización. Los rendimientos de furfural producido son similares a los obtenidos industrialmente en la actualidad, entre el 45 y el 50 % (Kabbour and Luque, 2020). La degradación del furfural por autopolimerización podría limitarse con el empleo de sistemas bifásicos, en los que se incluye una fase orgánica en la que se va solubilizando el furfural producido evitándose así su degradación (Le Guenic et al., 2015).

En el Artículo 1, aunque la concentración de xilosa inicial (30 g/L) fue menor que la de los hidrolizados de hueso (Figura 12), el rendimiento en furfural alcanzado fue ligeramente inferior al que se obtuvo en el Artículo 2, a partir de un hidrolizado con una concentración de xilosa de 40,3 g/L. Esto podría atribuirse a la presencia de otros compuestos en los hidrolizados de hueso que provienen de un pretratamiento ácido, que podrían favorecer a la producción de furfural. Por ejemplo, algunos autores apuntan a las propiedades catalíticas del ácido fórmico en la producción de furfural (Lamminpää et al., 2012).



3.5. Recuperación de la fracción de lignina

La fracción mayoritaria no azucarada contenida en el hueso de aceituna es la lignina (32-35 %, Tabla 2), por lo que su aprovechamiento también resultaría de gran interés en el contexto de una biorrefinería basada en esta materia prima. En la Tabla 6 se recogen los porcentajes de solubilización de lignina que se obtienen con la aplicación de los distintos pretratamientos ensayados, así como los rendimientos de precipitación de la lignina solubilizada en los dos artículos en los que se han utilizado como segunda etapa pretratamientos específicamente orientados a la deslignificación, como el tratamiento de oxidación alcalina con peróxido de hidrógeno (Artículo 5) y el tratamiento por organosolvente (Artículo 6).

Como puede observarse, los pretratamientos ácidos tienen escasa capacidad para deslignificar el material, en las condiciones ensayadas, obteniéndose la mayor solubilización de lignina (15,42 %) en el pretratamiento ácido aplicado en el Artículo 5, correspondiente a una mayor temperatura (194 °C). La segunda etapa de pretratamiento mediante explosión por vapor aplicada en el Artículo 3, también presenta una baja deslignificación (16,22 %). Por el contrario, con los tratamientos de deslignificación por oxidación alcalina y por organosolvente se alcanzan mayores porcentajes de solubilización de lignina (51,11 y 49,82 %, respectivamente).

Tabla 6. Rendimiento de deslignificación y lignina recuperada por precipitación.

Artículo	Pretratamiento y condiciones	Rendimiento de deslignificación (%)	Precipitación de lignina (g/100 g hueso)
2	Ácido diluido T: 130 °C; 2,6 % H ₂ SO ₄ (p/v)	2,40	-
3	Ácido diluido T: 128 °C; 3,48 % H ₂ SO ₄ (p/v); S/L: 33 % (p/v)	4,28	-
	Explosión por vapor T: 195 °C	16,22	-
5	Ácido diluido T: 194 °C; 0,5 % H ₂ SO ₄ (p/v)	15,42	-
	Oxidación alcalina 7 % H ₂ O ₂	51,11	10,95
6	Ácido diluido T: 128 °C; 3,48 % H ₂ SO ₄ (p/v); S/L: 33 % (p/v)	3,71	-
	Organosolvente T: 190 °C; t: 30 min	49,82	7,42

La deslignificación del material tiene un claro efecto positivo en la digestibilidad enzimática de la celulosa contenida en el sólido pretratado (sección 3.2). La lignina presente en el material puede dificultar la hidrólisis enzimática, por su actuación como barrera física, obstaculizando el acceso de la celulosa a las enzimas, su unión a la celulosa de forma no productiva o la formación de complejos lignina-carbohidrato (Yoo et al., 2017).

En el caso de la aplicación de una segunda etapa de oxidación alcalina, se produjo un aumento del rendimiento de hidrólisis enzimática conforme se fue incrementando la concentración de peróxido de hidrógeno (Figura 4, Artículo 5) en consonancia con el mayor grado de deslignificación alcanzado. Con la aplicación de una segunda etapa de pretratamiento por organosolvente, con una mezcla 50 % etanol:50 % agua, a 190 °C durante 30 minutos, se alcanza una sacarificación casi completa de la celulosa (96 %), con un rendimiento de hidrólisis enzimática del 76 %, frente al 2 % de rendimiento que se obtiene a partir del sólido resultante de la primera etapa de pretratamiento con ácido.

Por otra parte, el enriquecimiento del sólido en celulosa que provoca la mayor deslignificación del material, favorece la producción de mayores concentraciones de etanol (sección 3.3), lo que resulta de gran interés para la viabilidad de su separación por destilación.

Para la recuperación de la lignina solubilizada durante el pretratamiento, se han ensayado dos procedimientos de precipitación. En el licor obtenido con el pretratamiento alcalino (Artículo 5), la lignina se precipitó por acidificación con H_2SO_4 hasta pH 3, obteniéndose 10,95 g lignina/100 g hueso (Tabla 6). Se determinó el poder calorífico de la lignina precipitada, resultando un valor de 21733 kJ/kg. Esta lignina podría utilizarse industrialmente como biocombustible, o en la propia biorrefinería. La precipitación de la lignina solubilizada en el pretratamiento organosolvente (Artículo 6) se realizó por adición de agua (20 % licor:80 % agua), recuperándose 7,42 g lignina/100 g hueso.

Para la valorización de las fracciones líquidas obtenidas tras la deslignificación, se analizó su contenido en compuestos fenólicos, resultando unas concentraciones de 25,32 y 41,55 mg GAE/g hueso, en los tratamientos de oxidación alcalina y organosolvente, respectivamente (Tabla 7). En el caso de los licores procedentes del pretratamiento por organosolvente, también se determinó su capacidad antioxidante (DPPH) y el porcentaje de inhibición, obteniéndose una concentración de 10,91 mg trolox equivalente/ g hueso de aceituna y un porcentaje de inhibición inferior al 80 %, por lo que no es significativo.



Tabla 7. Concentraciones totales de compuestos fenólicos (TPC) (mg GAE/g hueso de aceituna), fenoles precipitados por PPVP (PP PVPP) (mg GAE/g hueso de aceituna), capacidad antioxidante (DPPH) (mg TE/ g hueso de aceituna) y DPPH inhibición (%) de los licores obtenidos en los pretratamientos deslignificantes.

Artículo	Pretratamiento y condiciones	TPC	PP PVPP	DPPH	% inhibición DDPH
5	Oxidación alcalina 7 % H ₂ O ₂	25,32	-	-	-
6	Ácido diluido T: 128 °C; 3,48 % H ₂ SO ₄ (p/v); S/L: 33 % (p/v)	8,82	4,34	6,53	50,93
	Organosolvente T: 190 °C; t: 30 min	41,55	20,44	10,91	73,45

Con el empleo del reactivo PVPP (polivinilpolipirrolidona) se consiguieron precipitar fenoles de alto peso molecular, procedentes también de la lignina que se ha solubilizado. La aplicación de estos compuestos fenólicos puede ser de gran interés, por lo que se han iniciado los trámites de una posible patente de este proceso. Si se compara el contenido en compuestos fenólicos tras los tratamientos de deslignificación, con los presentes en el hidrolizado ácido de la primera etapa (8,82 mg GAE/g hueso), éstos son muy inferiores, ya que provienen de la fracción de extractos del hueso, que representa únicamente entre el 4-6 % de esta biomasa (Tabla 2). La capacidad antioxidante determinada también es menor en este hidrolizado.

El licor generado en el pretratamiento organosolvente se analizó también por electroforesis capilar para determinar su perfil fenólico e identificar los principales compuestos fenólicos presentes. Se obtuvieron matrices complejas, como puede verse en la Figura 2 del Artículo 6 donde se muestra el electroferograma del pretratamiento con organosolventes realizado a 190 °C y 30 min. Como se puede observar, los compuestos identificados procedían de la degradación de la lignina, excepto la epicatequina y el furfural. El furfural, que procede de la degradación de la fracción de azúcar, también se identificó con HPLC en los licores del organosolvente.

3.6. Consideración final

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral permite deducir que el hueso de aceituna obtenido en el proceso de producción de aceite de oliva constituye una prometedora materia prima para el desarrollo de una biorrefinería en la que se obtengan principalmente compuestos químicos renovables, como el etanol y el furfural, que pueden sustituir a los equivalentes derivados en la actualidad de fuentes de energía fósiles.

No obstante, antes de que esta biorrefinería se convierta en una realidad, será preciso abordar otros estudios, algunos de los cuales se mencionan en los artículos científicos resultantes de este trabajo. Especialmente relevantes habrán de ser también los correspondientes al escalado, incluyendo la simulación técnico-económica, así como el análisis medioambiental.

Esta Tesis Doctoral puede considerarse, por tanto, una contribución al desarrollo de la Bioeconomía utilizando como punto de partida una biomasa ampliamente disponible en el entorno de influencia de la Universidad de Jaén y en general en los países productores de aceite de oliva.



4. Conclusiones



Las principales conclusiones que se derivan del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se enumeran a continuación:

1. El hueso de aceituna es un material renovable con potencial para su valorización en el contexto de una biorrefinería de biomasa lignocelulósica.
2. La realización de una primera etapa de pretratamiento ácido resulta eficaz para la recuperación de la hemicelulsa en la fracción líquida, preservándose la mayor parte de celulosa en la fracción sólida.
3. Resulta necesaria la realización de una segunda etapa de pretratamiento para mejorar la digestibilidad enzimática de la celulosa.
4. Los pretratamientos deslignificantes (oxidación alcalina y organosolvente) son más eficaces para aumentar los rendimientos de hidrólisis enzimática y al mismo tiempo aumentar el contenido en celulosa del sólido y con ello el potencial para alcanzar altas concentraciones de etanol.
5. Con una estrategia secuencial en dos etapas, una primera etapa ácida seguida de una organosolvente, se llega a obtener una recuperación de azúcares del 88% de los contenidos en la materia prima inicial.
6. Los hidrolizados ácidos obtenidos, con altas concentraciones de xilosa, tienen gran potencial para la producción de furfural, alcanzándose 26,5 g/L de furfural con un 46 % de rendimiento.
7. Es posible obtener etanol conjuntamente de las fracciones celulósica y hemicelulósica, con un rendimiento de 16 g etanol /100 g hueso, si bien la fermentación de azúcares hemicelulósicos requiere de varias etapas de detoxificación y parte de la xilosa queda sin consumir.
8. La configuración de proceso de presacarificación y fermentación simultáneas resulta eficiente para la producción de etanol a partir de la celulosa, llegándose a alcanzar 47 g/L de etanol, con un 61 % de rendimiento.
9. De los pretratamientos deslignificantes se obtiene una corriente líquida enriquecida en compuestos fenólicos y lignina susceptible de ser recuperada por precipitación.
10. El hueso de aceituna es una biomasa lignocelulósica susceptible de ser valorizada para la obtención de etanol, furfural, lignina y compuestos fenólicos.



Conclusions

The main conclusions derived from the work carried out in this Doctoral Thesis are listed below:

1. The olive stones are a renewable material potentially valorisable due to their chemical composition in the context of a lignocellulosic biomass biorefinery.
2. A first acid pre-treatment stage is effective for the recovery of the hemicellulose in the liquid fraction, while preserving most of the cellulose in the solid fraction.
3. A second pre-treatment step is necessary to improve the enzymatic digestibility of the cellulose.
4. Delignification pre-treatments (alkaline oxidation and organosolv) are more effective in increasing enzymatic hydrolysis yields and, at the same time, increasing the cellulose content of the solid and thus the potential to reach high ethanol concentrations.
5. With a sequential two-step strategy, a first acid step followed by an organosolvent step, a sugars recovery of 88% of the initial feedstock content is achieved.
6. The acid hydrolysates obtained, with high concentrations of xylose, have a high potential for furfural production, reaching 26.5 g/L of furfural with a 46 % yield.
7. It is possible to obtain ethanol jointly from the cellulosic and hemicellulosic fractions, with a yield of 16 g ethanol/100 g olive stones, although the fermentation of hemicellulosic sugars requires several detoxification stages and part of the xylose remains unconsumed.
8. The simultaneous pre-saccharification and fermentation process configuration is efficient for the production of ethanol from cellulose, reaching 47 g/L of ethanol, with a 61 % yield.
9. From the delignification pre-treatments, a liquid stream enriched in phenolic compounds and lignin is obtained, which can be recovered by precipitation.
10. Olive stones are a lignocellulosic biomass that can be processed to obtain ethanol, furfural, lignin and phenolic compounds.



Referencias



- Acevedo-García, V., Padilla-Rascón, C., Díaz, M.J., Moya, M., Casto, E., 2018. Fermentable sugars production from acid-catalysed steam exploded barley straw. *Chem. Eng. Trans.* 70, 1939–1944.
<https://doi.org/10.3303/CET1870324>
- Agencia Europea del Medio Ambiente, 2018. CORINE. Int. Renew. Energy & IRENA. (Fecha de acceso enero de 2022)
URL <https://centrodedescargas.cnig.es/CentroDescargas/index.jsp>
- Agirrezabal-Tellería, I., Gandarias, I., Arias, P.L., 2014. Heterogeneous acid-catalysts for the production of furan-derived compounds (furfural and hydroxymethylfurfural) from renewable carbohydrates: A review. *Catal. Today* 234, 42–58.
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2013.11.027>
- Almeida, J.R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 340–349.
<https://doi.org/10.1002/jctb.1676>
- Alves-Ferreira, J., Lourenço, A., Morgado, F., Duarte, L.C., Roseiro, L.B., Fernandes, M.C., Pereira, H., Carneiro, F., 2021. Delignification of *Cistus ladanifer* Biomass by Organosolv and Alkali Processes. *Energies* 14, 1127.
<https://doi.org/10.3390/en14041127>
- Alvira, P., Negro, M.J., Ballesteros, M., 2011. Effect of endoxylanase and α -l-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102, 4552–4558.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.112>
- 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.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00889>
- Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers. Manag.* 52, 858–875.
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2006. Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129, 13.
<https://doi.org/10.1385/ABAB:130:1:496>



- Barakat, A., Mayer-Laigle, C., Solhy, A., Arancon, R.A.D., de Vries, H., Luque, R., 2014. Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. *RSC Adv* 4, 48109–48127.
<https://doi.org/10.1039/C4RA07568D>
- Bhatia, S.K., Jagtap, S.S., Bedekar, A.A., Bhatia, R.K., Patel, A.K., Pant, D., Rajesh Banu, J., Rao, C.V., Kim, Y.-G., Yang, Y.-H., 2020. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresour. Technol.* 300, 122724.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>
- Bhaumik, P., Dhepe, P.L., 2014. Exceptionally high yields of furfural from assorted raw biomass over solid acids. *RSC Adv.* 4, 26215.
<https://doi.org/10.1039/c4ra04119d>
- BioPlat, Sustainable Chemistry, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, 2017. Manual sobre las Biorrefinerías en España.
- Boboescu, I.-Z., Gélinas, M., Beigbeder, J.-B., Lavoie, J.-M., 2018. High-efficiency second generation ethanol from the hemicellulosic fraction of softwood chips mixed with construction and demolition residues. *Bioresour. Technol.* 266, 421–430.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.056>
- Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J.P., Welton, T., 2013. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* 15, 550.
<https://doi.org/10.1039/c2gc36364j>
- Cai, C.M., Zhang, T., Kumar, R., Wyman, C.E., 2014. Integrated furfural production as a renewable fuel and chemical platform from lignocellulosic biomass: Furfural production from lignocellulosic biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 2–10.
<https://doi.org/10.1002/jctb.4168>
- Cardona, C.A., Sánchez, Ó.J., 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour. Technol.* 98, 2415–2457.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.002>
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Lopes, S., Parajó, J.C., Pereira, H., Gírio, F.M., 2005. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochem.* 40, 1215–1223.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.015>

Chandel, A.K., da Silva, S.S., Singh, O.V., 2011. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production, in: Dos Santos Bernardes, M.A. (Ed.), *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. InTech.

<https://doi.org/10.5772/16454>

Choudhary, V., Sandler, S.I., Vlachos, D.G., 2012. Conversion of Xylose to Furfural Using Lewis and Brønsted Acid Catalysts in Aqueous Media. *ACS Catal.* 2, 2022–2028.

<https://doi.org/10.1021/cs300265d>

Conde-Mejía, C., Jiménez-Gutiérrez, A., El-Halwagi, M., 2012. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Saf. Environ. Prot.* 90, 189–202.

<https://doi.org/10.1016/j.psep.2011.08.004>

Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, 2015. Plan Director del Olivar 146.

Contreras, M. del M., Romero, I., Moya, M., Castro, E., 2020. Olive-derived biomass as a renewable source of value-added products. *Process Biochem.* 97, 43–56.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.013>

Deng, A., Lin, Q., Yan, Y., Li, H., Ren, J., Liu, C., Sun, R., 2016. A feasible process for furfural production from the pre-hydrolysis liquor of corncob via biochar catalysts in a new biphasic system. *Bioresour. Technol.* 216, 754–760.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.002>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.074>

Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2017. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. *Renew. Energy* 114, 1427–1441.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.050>

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

<https://doi.org/10.1007/s13399-017-0277-3>



- Echeverria, M.C., Pellegrino, E., Nuti, M., 2017. The Solid Wastes of Coffee Production and of Olive Oil Extraction: Management Perspectives in Rural Areas, in: Mihai, F.-C. (Ed.), Solid Waste Management in Rural Areas. InTech.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.69427>
- Erdocia, X., Prado, R., Corcuera, M.Á., Labidi, J., 2014. Effect of different organosolv treatments on the structure and properties of olive tree pruning lignin. *J. Ind. Eng. Chem.* 20, 1103–1108.
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.06.048>
- Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A., Rodríguez, R., Guillén, R., Jiménez, A., 2001. Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresour. Technol.* 79, 53–61.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00015-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00015-3)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT), 2021. (Fecha de acceso enero de 2022)
URL <https://www.fao.org/faostat/en/#home>
- García, A., Spigno, G., Labidi, J., 2017. Antioxidant and biocide behaviour of lignin fractions from apple tree pruning residues. *Ind. Crops Prod.* 104, 242–252.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.063>
- García-Aparicio, P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Negro, J., 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129, 11.
<https://doi.org/10.1385/abab:129:1:278>
- Gavahian, M., Mousavi Khaneghah, A., Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., Garcia-Mantrana, I., Collado, M.C., Meléndez-Martínez, A.J., Barba, F.J., 2019. Health benefits of olive oil and its components: Impacts on gut microbiota antioxidant activities, and prevention of noncommunicable diseases. *Trends Food Sci. Technol.* 88, 220–227.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.008>
- Geddes, C.C., Mullinnix, M.T., Nieves, I.U., Hoffman, R.W., Sagues, W.J., York, S.W., Shanmugam, K.T., Erickson, J.E., Vermerris, W.E., Ingram, L.O., 2013. Seed train development for the fermentation of bagasse from sweet sorghum and sugarcane using a simplified fermentation process. *Bioresour. Technol.* 128, 716–724.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.121>

Gil, M.V., González-Vázquez, M.P., García, R., Rubiera, F., Pevida, C., 2019. Assessing the influence of biomass properties on the gasification process using multivariate data analysis. *Energy Conversion and Management* 184, 649–660.

<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.01.093>

Gómez Millán, G., Hellsten, S., King, A.W.T., Pokki, J.-P., Llorca, J., Sixta, H., 2019. A comparative study of water-immiscible organic solvents in the production of furfural from xylose and birch hydrolysate. *J. Ind. Eng. Chem.* 72, 354–363.

<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.12.037>

Govumoni, S.P., Koti, S., Kothagouni, S.Y., S, V., Linga, V.R., 2013. Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production. *Carbohydr. Polym.* 91, 646–650.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.019>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.014>

Gullón, P., Gullón, B., Astray, G., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M.A., Simal-Gandara, J., 2020. Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods. *Food Res. Int.* 137, 109683.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109683>

Hamacher, T., Becker, J., Gárdonyi, M., Hahn-Hägerdal, B., Boles, E., 2002. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* 148, 2783–2788.

<https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2783>

Hongsiri, W., Danon, B., Jong, W. de, 2014. Kinetic Study on the Dilute Acidic Dehydration of Pentoses toward Furfural in Seawater. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53, 5455–5463.

<https://doi.org/10.1021/ie404374y>

Huijgen, W.J.J., Smit, A.T., de Wild, P.J., den Uil, H., 2012. Fractionation of wheat straw by prehydrolysis, organosolv delignification and enzymatic hydrolysis for production of sugars and lignin. *Bioresour. Technol.* 114, 389–398.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.143>



- Jaffur, N., Jeetah, P., Kumar, G., 2021. A review on enzymes and pathways for manufacturing polyhydroxybutyrate from lignocellulosic materials. *3 Biotech* 11, 483.
<https://doi.org/10.1007/s13205-021-03009-x>
- Jambo, S.A., Abdulla, R., Mohd Azhar, S.H., Marbawi, H., Gansau, J.A., Ravindra, P., 2016. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 65, 756–769.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification 10.
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- Kabbour, M., Luque, R., 2020. Furfural as a platform chemical, in: *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Elsevier, pp. 283–297.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64307-0.00010-X>
- Kamm, B., Gruber, P.R., Kamm, M., 2016. Biorefineries-Industrial Processes and Products, in: *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 1–38.
<https://doi.org/10.1002/9783527619849>
- Kim, D., 2018. Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. *Molecules* 23, 309.
<https://doi.org/10.3390/molecules23020309>
- Kim, S.B., Lee, J.H., Yang, X., Lee, J., Kim, S.W., 2015. Furfural production from hydrolysate of barley straw after dilute sulfuric acid pretreatment. *Korean J. Chem. Eng.* 32, 2280–2284.
<https://doi.org/10.1007/s11814-015-0029-7>
- Kim, Y., Kreke, T., Hendrickson, R., Parenti, J., Ladisch, M.R., 2013. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. *Bioresour. Technol.* 135, 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.130>
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 408–415.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.01.007>

Köchermann, J., Mühlenberg, J., Klemm, M., 2018. Kinetics of Hydrothermal Furfural Production from Organosolv Hemicellulose and D -Xylose. *Ind. Eng. Chem. Res.* 57, 14417–14427.

<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b03402>

Koppram, R., Tomás-Pejó, E., Xiros, C., Olsson, L., 2014. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. *Trends Biotechnol.* 32, 46–53.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.003>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.051>

Lamminpää, K., Ahola, J., Tanskanen, J., 2012. Kinetics of Xylose Dehydration into Furfural in Formic Acid. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 6297–6303.

<https://doi.org/10.1021/ie2018367>

Le Guenic, S., Delbecq, F., Ceballos, C., Len, C., 2015. Microwave-assisted dehydration of D-xylose into furfural by diluted inexpensive inorganic salts solution in a biphasic system. *J. Mol. Catal. Chem.* 410, 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.molcata.2015.08.019>

Lobato-Peralta, D.R., Duque-Brito, E., Villafán-Vidales, H.I., Longoria, A., Sebastian, P.J., Cuentas-Gallegos, A.K., Arancibia-Bulnes, C.A., Okoye, P.U., 2021. A review on trends in lignin extraction and valorization of lignocellulosic biomass for energy applications. *J. Clean. Prod.* 293, 126123.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126123>

López-Linares, J.C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., 2016. Bioconversion of Rapeseed Straw: Enzymatic Hydrolysis of Whole Slurry and Cofermentation by an Ethanogenic *Escherichia coli*. *Energy Fuels* 30, 9532–9539.

<https://doi.org/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 FeCl₃ prior enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 128, 180–187.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.076>

Lorenci Woiciechowski, A., Dalmas Neto, C.J., Porto de Souza Vandenberghe, L., de Carvalho Neto, D.P., Novak Sydney, A.C., Letti, L.A.J., Karp, S.G., Zevallos Torres, L.A., Soccol, C.R., 2020. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their



effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. *Bioresour. Technol.* 304, 122848.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>

Luo, Y., Li, Z., Li, X., Liu, X., Fan, J., Clark, J.H., Hu, C., 2019. The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review. *Catal. Today* 319, 14–24.

<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.06.042>

Mahmood, H., Moniruzzaman, M., Iqbal, T., Khan, M.J., 2019. Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and value-added products. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 20, 18–24.

<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.08.001>

Mao, L., Zhang, L., Gao, N., Li, A., 2013. Seawater-based furfural production via corncob hydrolysis catalyzed by FeCl₃ in acetic acid steam. *Green Chem.* 15, 727.

<https://doi.org/10.1039/c2gc36346a>

Mariscal, R., Maireles-Torres, P., Ojeda, M., Sádaba, I., López Granados, M., 2016. Furfural: a renewable and versatile platform molecule for the synthesis of chemicals and fuels. *Energy Environ. Sci.* 9, 1144–1189.

<https://doi.org/10.1039/C5EE02666K>

Martínez-Patiño, J.C., Ruiz, E., Cara, C., Romero, I., Castro, E., 2018. Advanced bioethanol production from olive tree biomass using different bioconversion schemes. *Biochem. Eng. J.* 137, 172–181.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.002>

Martínez-Patiño, J.C., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., López-Linares, J.C., Castro, E., 2017. Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 239, 326–335.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.102>

Matos, M., Barreiro, M.F., Gandini, A., 2010. Olive stone as a renewable source of biopolyols. *Ind. Crops Prod.* 32, 7–12.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.02.010>

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, 47.

<https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Subsecretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación, Subdirección General de Análisis, Coordinación y Estadística, 2019. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos (ESYRCE). Análisis de las Plantaciones de Olivar en España.

Miranda, I., Simões, R., Medeiros, B., Nampoothiri, K.M., Sukumaran, R.K., Rajan, D., Pereira, H., Ferreira-Dias, S., 2019. Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. *Bioresour. Technol.* 292, 121936.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121936>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>

Moniz, P., Serralheiro, C., Matos, C.T., Boeriu, C.G., Frissen, A.E., Duarte, L.C., Roseiro, L.B., Pereira, H., Carneiro, F., 2018. Membrane separation and characterisation of lignin and its derived products obtained by a mild ethanol organosolv treatment of rice straw. *Process Biochem.* 65, 136–145.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.012>

Moxley, G., Zhang, Y.-H.P., 2007. More Accurate Determination of Acid-Labile Carbohydrates in Lignocellulose by Modified Quantitative Saccharification. *Energy Fuels* 21, 3684–3688.

<https://doi.org/10.1021/ef7003893>

Najafi, E., Castro, E., Karimi, K., 2021. Biorefining for olive wastes management and efficient bioenergy production. *Energy Convers. Manag.* 244, 114467.

<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.114467>

Nogueira, C. da C., Padilha, C.E. de A., Dantas, J.M. de M., Medeiros, F.G.M. de, Guilherme, A. de A., Souza, D.F. de S., Santos, E.S. dos, 2021. In-situ detoxification strategies to boost bioalcohol production from lignocellulosic biomass. *Renew. Energy* 180, 914–936.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.09.012>

Octave, S., Thomas, D., 2009. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie* 91, 659–664.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.015>



Ortiz, W.G.C., 2011. Materiales lignocelulosicos como fuente de biocombustibles y productos químicos como fuente de biocombustibles y productos químicos. *Tecno Esufa* 16, 6.

Padilla-Rascón, C., Romero-García, J.M., Ruiz, E., Castro, E., 2020a. Optimization with Response Surface Methodology of Microwave-Assisted Conversion of Xylose to Furfural. *Molecules* 25, 3574.

<https://doi.org/10.3390/molecules25163574>

Padilla-Rascón, C., Romero-García, J.M., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., 2021. Microwave-assisted production of furfural from the hemicellulosic fraction of olive stones. *Process Saf. Environ. Prot.* 152, 630–640.

<https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.06.035>

Padilla-Rascón, C., Ruiz-Ramos, E., Romero, I., Castro, E., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Manzanares, P., 2020b. Valorisation of olive stone by-product for sugar production using a sequential acid/steam explosion pretreatment. *Ind. Crops Prod.* 148, 112279.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112279>

Parisutham, V., Kim, T.H., Lee, S.K., 2014. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresour. Technol.* 161, 431–440.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.114>

Peleteiro, S., Garrote, G., Santos, V., Parajó, J.C., 2014. Conversion of hexoses and pentoses into furans in an ionic liquid 5.

Peleteiro, S., Rivas, S., Alonso, J.L., Santos, V., Parajó, J.C., 2016. Furfural production using ionic liquids: A review. *Bioresour. Technol.* 202, 181–191.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.017>

Perujo, M., Colombo, S., 2015. Caracterización de la fragmentación espacial y dispersión en los olivares de la provincia de Jaén.

Quintero, J.A., Rincón, L.E., Cardona, C.A., 2011. Production of Bioethanol from Agroindustrial Residues as Feedstocks, in: *Biofuels*. Elsevier, pp. 251–285.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00011-5>

Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senent, F., Lama-Muñoz, A., García, A., Fernández-Bolaños, J., 2014. Properties of Lignin, Cellulose, and Hemicelluloses Isolated from Olive Cake and Olive Stones: Binding of Water, Oil, Bile Acids, and Glucose. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8973–8981.

<https://doi.org/10.1021/jf502062b>

Romero-García, J.M., Martínez-Patiño, C., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., 2016. Ethanol production from olive stone hydrolysates by xylose fermenting microorganisms. *Bioethanol* 2.

<https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0002>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.062>

Rong, C., Ding, X., Zhu, Y., Li, Y., Wang, L., Qu, Y., Ma, X., Wang, Z., 2012. Production of furfural from xylose at atmospheric pressure by dilute sulfuric acid and inorganic salts. *Carbohydr. Res.* 350, 77–80.

<https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.11.023>

Ruiz, E., Romero-García, J.M., Romero, I., Manzanares, P., Negro, M.J., Castro, E., 2017. Olive-derived biomass as a source of energy and chemicals. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 11, 1077–1094.

<https://doi.org/10.1002/bbb.1812>

Sánchez, C., Serrano, L., Andres, M.A., Labidi, J., 2013. Furfural production from corn cobs autohydrolysis liquors by microwave technology. *Ind. Crops Prod.* 42, 513–519.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.042>

Schorr, D., Diouf, P.N., Stevanovic, T., 2014. Evaluation of industrial lignins for biocomposites production. *Ind. Crops Prod.* 52, 65–73.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.014>

Shi, N., Liu, Q., Cen, H., Ju, R., He, X., Ma, L., 2020. Formation of humins during degradation of carbohydrates and furfural derivatives in various solvents. *Biomass Convers. Biorefinery* 10, 277–287.

<https://doi.org/10.1007/s13399-019-00414-4>

Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D., Osborne, J., 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresour. Technol.* 98, 3000–3011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.022>

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2012. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, Revised August 2012. ed. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.



- Sridach, W., 2010. The environmentally benign pulping process of non-wood fibers 17, 105-123.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 11.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Taherzadeh, M., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621–1651.
<https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M.J., Herrero-Martínez, J.M., Simó-Alfonso, E.F., 2014. Efficient Extraction of Olive Pulp and Stone Proteins by using an Enzyme-Assisted Method: Enzyme extraction of olive proteins.... *J. Food Sci.* 79, C1298–C1304.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12499>
- Wang, L., York, S.W., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., 2019. Simultaneous fermentation of biomass-derived sugars to ethanol by a co-culture of an engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 273, 269–276.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.016>
- Weingarten, R., Cho, J., Conner, Jr., Wm.C., Huber, G.W., 2010. Kinetics of furfural production by dehydration of xylose in a biphasic reactor with microwave heating. *Green Chem.* 12, 1423.
<https://doi.org/10.1039/c003459b>
- Wondu Business and Technology Services, Rural Industries Research and Development Corporation (Australia), R.I.R. and D.C. (Australia), Environment and Farm Management Research and Development Program, 2006. Furfural chemicals and biofuels from agriculture: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, A.C.T.
- Ye, L., Han, Y., Wang, X., Lu, X., Qi, X., Yu, H., 2021. Recent progress in furfural production from hemicellulose and its derivatives: Conversion mechanism, catalytic system, solvent selection. *Mol. Catal.* 515, 111899.
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2021.111899>
- Yoo, C.G., Li, M., Meng, X., Pu, Y., Ragauskas, A.J., 2017. Effects of organosolv and ammonia pretreatments on lignin properties and its inhibition for enzymatic hydrolysis. *Green Chem.* 19, 2006–2016.
<https://doi.org/10.1039/C6GC03627A>

Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G., 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 66, 751–774.

<https://doi.org/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. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 71, 475–501.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>

Zeitsch, K.J. (Ed.), 2000a. 6. Furfural loss reactions, in: *Sugar Series*. Elsevier, pp. 19–22.

[https://doi.org/10.1016/S0167-7675\(00\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7675(00)80006-8)

Zeitsch, K.J. (Ed.), 2000b. 10. Furfural processes, in: *Sugar Series*. Elsevier, pp. 36–74.

[https://doi.org/10.1016/S0167-7675\(00\)80010-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7675(00)80010-X)



Anexos



Artículo 1

Título: Optimization with response surface methodology of microwave-assisted conversion of xylose to furfural

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Juan Miguel Romero-García, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro

Publicación: Molecules 25, 3574 (2020)

DOI: 10.3390/molecules25163574

Índice de impacto: 4,412

Posición: 63/178 en la categoría “CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY” (Segundo cuartil)

Abstract: The production of furfural from renewable sources, such as lignocellulosic biomass, has gained great interest within the concept of biorefineries. In lignocellulosic materials, xylose is the most abundant pentose, which forms the hemicellulosic part. One of the key steps in the production of furfural from biomass is the dehydration reaction of the pentoses. The objective of this work was to assess the conditions under which the concentration of furfural is maximized from a synthetic, monophasic, and homogeneous xylose medium. The experiments were carried out in a microwave reactor. FeCl_3 in different proportions and sulfuric acid were used as catalysts. A two-level, three-factor experimental design was developed for this purpose. The results were further analyzed through a second experimental design and optimization was performed by response surface methodology. The best operational conditions for the highest furfural yield (57%) turned out to be 210 °C, 0.5 min, and 0.05 M FeCl_3 .



Artículo 2

Título: **Microwave-assisted production of furfural from the hemicellulosic fraction of olive stones**

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Juan Miguel Romero-García, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Eulogio Castro

Publicación: Process Safety and Environmental Protection, 152, 630–640 (2021)

DOI: 10.1016/j.psep.2021.06.035

Índice de impacto: 6.158

Posición 32/156 en la categoría “ENGINEERING, CHEMICAL” (Primer Cuartil)

Abstract: Olive stone (OS) is a lignocellulosic material obtained as a coproduct in the olive oil production industry, mainly composed of hemicelluloses, with xylose accounting for 24.4 % by weight as the main sugar. In this study, an optimized process for obtaining furfural from OS was assessed. The process consists of two steps; the first one, aimed at maximizing the solubilization of xylose, was performed in an autoclave at 130 °C and 2.6 %w/v H₂SO₄, resulting in 83 % xylose recovery in the liquid fraction. The second step, using the optimized liquid produced previously, was carried out in a microwave reactor at 200 °C with the addition of 0.1 M FeCl₃ from which a solution with 18 g/L furfural and 63.3 % yield was obtained, equivalent to almost 90 kg of furfural per tonne of processed OS. Taking into account these results along with additional advantages in comparison with other lignocellulosic materials (such as no need of a grinding stage and being already available in the olive mills), OS can be considered as a promising raw material for furfural production.



Artículo 3

Título: Valorisation of olive stone by-product for sugar production using a sequential acid/steam explosion pretreatment

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Eulogio Castro, José Miguel Oliva, Ignacio Ballesteros, Paloma Manzanares

Publicación: Industrial Crops & Products, 148, 112279 (2020)

DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112279

Índice de impacto: 5.645

Posición: 2/16 en la categoría “AGRICULTURAL ENGINEERING” (Primer Cuartil)

Abstract: Olive stones are a lignocellulosic biomass generated as a by-product in the olive oil industry. They are of interest for use as a feedstock in the production of biofuels and other bioproducts in a biorefinery context. The aim of this work was to evaluate the potential of sugar production from olive stones, as a first approach in a valorisation process for this by-product. The process strategy tested consisted of a sequential fractionation process of the lignocellulosic components of olive stones based on acid pretreatment and steam explosion followed by enzymatic hydrolysis. In the first acid step, the study of pretreatment temperature, sulfuric acid concentration and biomass loading led to optimized conditions of 128 °C, 10.5 g acid/100 g olive stones and 33 % solids. This yielded a pre-treatment liquor with a xylose recovery of 71 %. In the steam explosion pre-treatment, the influence of increasing temperature from 180 to 225 °C at a fixed time of 5 min was evaluated through the assessment of sugar recovery and the enzymatic digestibility of sequentially pretreated olive stones. This permitted the selection of the most adequate steam explosion conditions (i.e., 195 °C for 5 min). As a result of the combined pretreatment under the selected operation conditions, an overall sugar production yield of 83 % of the total sugar content in raw olive stones can be obtained, taking into account the different sugar streams generated along the whole process.



Artículo 4

Título: **Ethanol production from olive stones using different process strategies**

Autores: Juan Miguel Romero-García, Ana Isabel Susmozas, Carmen Padilla-Rascón, Paloma Manzanares, Eulogio Castro, José Miguel Oliva, Inmaculada Romero

Publicación: Renewable Energy (Enviado para su publicación)

Índice de impacto: 8.001

Posición: 16/114 en la categoría “ENERGY & FUELS” (Primer Cuartil)

Abstract: In this work, olive stone is used as a lignocellulosic raw material for ethanol production. In order to optimise the ethanol production yield, three different process strategies are studied considering the different streams produced in a sequential pretreatment of olive stone with dilute sulfuric acid/steam explosion (SE), which has been previously tested and demonstrated to be an effective fractionation strategy for olive stone biomass. Strategy 1 features fermentation with *E. coli* SL100 of the mixture of the detoxified prehydrolysate from the dilute sulfuric acid stage and the enzymatic hydrolysate of WIS and detoxified SE liquid fractions. Strategy 2 consists of fermentation with *E. coli* SL100 separately from the prehydrolysate and the enzymatic hydrolysate of WIS and detoxified SE liquid fractions. Strategy 3 considers fermentation with *E. coli* SL100 of the prehydrolysate from the acid stage and presaccharification and simultaneous saccharification and fermentation with *S. cerevisiae* “Ethanol Red” of WIS and detoxified SE liquid fractions. Strategies 2 and 3 reach a similar ethanol production of ~162 kg/t, which is the highest ethanol yield reported so far from olive stones. The latter strategy uses two different microorganisms that allow an ethanol concentration close to 40 g/L to be obtained.



Artículo 5

Título: Multicompound biorefinery based on combined acid / alkaline-oxidative treatment of olive stones for bioenergy and renewable chemicals production

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Juan Miguel Romero-García, Inmaculada Romero Encarnación Ruiz, Eulogio Castro

Publicación: Fuel (Enviado para su publicación)

Índice de impacto: 6.609

Posición: 20/143 en la categoría “ENGINEERING, CHEMICAL” (Primer Cuartil)

Abstract: The use of renewable lignocelulosic biomass as raw materials for biorefineries is of great interest to replace fossil fuels. In this work, an integrated process to obtain sugars and other value-added compounds from olive stones (OS) was investigated. Firstly, OS was subjected to dilute acid pretreatment through a central composite rotatable experimental design, at varying temperatures (170-200 °C) and sulfuric acid concentrations (0.5-2%). Under optimized conditions (194.6 °C and 0.5% w/v sulfosulfuric acid), a recovery of 70% of xylose was achieved in the acid pretreatment and 41% of glucose in the subsequent enzymatic hydrolysis. Then, delignification with alkaline peroxide was applied to improve cellulose digestibility. Delignification yields reached 51% with 7% H₂O₂, increasing EH yields up to 70.3%. Phenolic compounds of potential interest were detected in the liquors, to a concentration of 25.3 mg GAE/g OS. Solubilized lignin was recovered by acid precipitation with a yield of 76.3%, representing 11 g lignin/100 g OS, with a calorific value of 21733 kJ/kg. Also 26.5 g/L of furfural were obtained from the xylose rich acid hydrolysate with a yield of 45.7%. OS can be considered as a promising raw material for a multiproduct biorefinery



Artículo 6

Título: The role of organosolv fractionation in an integrated olive stone based biorefinery

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Florbela Carvalheiro, Luís C. Duarte, Luisa B. Roseiro, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro

Publicación: Industrial Crops & Products (Enviado para su publicación)

Índice de impacto: 5.645

Posición: 2/16 en la categoría “AGRICULTURAL ENGINEERING” (Primer Cuartil)

Olive stones (OS) constitutes a waste lignocellulosic material produced by the olive oil industry in great amounts, that currently is only used as a low value energy source for industrial or domestic boilers. Aiming at its full valorization this work proposes and validates an integrated strategy aiming to obtain three different streams of sugars / lignin-derived compounds. Dilute acid hydrolysis was used to obtain a xylose-rich hydrolysate that was chemically converted into furfural with a 48.7 % yield. The resulting acid-pretreated solid biomass that consisted mainly of lignin and cellulose, was subject to a catalyzed ethanol-based organosolv delignification. Temperature, time and sulfuric acid concentration were optimized in order to recover added-value lignin products and digestible cellulose.

At the optimal conditions (190 °C and 30 min), a 50 % delignification was reached, together with the highest enzymatic hydrolysis yields (190 g glucose/kg of OS). Phenolic compounds content in organosolv liquors reached 41.6 mg GAE/g OS. This extract presented an antioxidant capacity up to 10.9 mg TE/g OS. The pretreated solid fraction was used as a substrate for ethanol production by a presaccharification and simultaneous saccharification and fermentation process, enabling to obtain an ethanol concentration of 47 g/L, with a fermentation yield of 61.4 %.



Contribuciones a congresos



Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha participado en los siguientes congresos:

1. Multifactorial analysis of the xylose conversion into furfural by dilute acid catalysis in aqueous media.

Nombre del congreso: 4 th Iberoamerican Congress on Biorefineries,

Ámbito: Internacional. Año: 2018. Lugar: Jaén (España)

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Manuel Moya, Eulogio Castro, Cristóbal Cara

2. Furfural production by microwave irradiation of xylose solutions in dilute acidic media: surface response optimization

Nombre del congreso: 2nd International Workshop on Biorefinery of Lignocellulosic Materials

Ámbito: Internacional. Año: 2019. Lugar: Córdoba (España)

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Manuel Moya, Eulogio Castro, Cristóbal Cara

3. Solubilization of olive stone hemicelluloses by diluted acid hydrolysis and subsequent dehydration of xylose into furfural in a microwave reactor

Nombre del congreso: 3rd International Congress of Chemical Engineering, ANQUE-ICCE-CIBIQ 2019

Ámbito: Internacional. Año: 2019. Lugar: Santander (España)

Autores: Carmen Padilla-Rascón¹, Cristóbal Cara, Encarnación Ruiz, Inmaculada Romero, Antonia de Torres, Juan Miguel Romero-García, Eulogio Castro

4. Sugar production from olive stones by autoclave acid pretreatment followed by steam explosion

Nombre del congreso: 7th International Conference on Sustainable Solid Waste Management

Ámbito: Internacional. Año: 2019. Lugar: Heraklion, Isla de Creta (Grecia)

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Cristóbal Cara, Inmaculada Romero, Paloma Manzanares, José Migue. Oliva, Eulogio Castro, Encarnación Ruiz

5. Exhausted olive pomace phenolic rich extracts obtention, a first step for a biorefinery scheme proposal

Nombre del congreso: 1st International Electronic Conference on Food Science and Functional Foods

Ámbito: Internacional. Año: 2020. Lugar: online



Autores: Irene Gómez-Cruz, Inmaculada Romero, María del Mar Contreras, Carmen Padilla-Rascón, Florbela Carvalheiro, Luis C. Duarte, Luisa B. Roseiro

6. Olive pits, an attractive source of valuable compounds

Nombre del congreso: 1st Greenering International Conference

Ámbito: Internacional. Año: 2021. Lugar: Caparica (Portugal), online

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro

7. Two-step fractionation of olive stones for the full recovery of sugar and lignin

Nombre del congreso: 29th European Biomass Conference & Exhibition (EUBCE)

Ámbito: Internacional. Año: 2021. Lugar: online

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro, Irene Gómez-Cruz, Luís C. Duarte, Florbela Carvalheiro

8. Dilute acid and hydrothermal treatments for improving sugar production from olive stones

Nombre del congreso: 29th European Biomass Conference & Exhibition (EUBCE)

Ámbito: Internacional. Año: 2021. Lugar: online

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Juan Miguel Romero-García, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro

9. Improvement of the enzymatic hydrolysis of olive stones by two-stage pretreatment of acid hydrolysis and organosolv

Nombre del congreso: 8th International Conference on Sustainable Solid Waste Management

Ámbito: Internacional. Año: 2021. Lugar: online

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro, Luisa B. Roseiro, Luís C. Duarte, Florbela. Carvalheiro

10. Maximization of xylose production from olive stones by acid pretreatment

Nombre del congreso: 8th International Conference on Sustainable Solid Waste Management

Ámbito: Internacional. Año: 2021. Lugar: online

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Juan Miguel Romero-García, Inmaculada Romero, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro

11. Enhanced enzymatic hydrolysis of pretreated and delignified olive stones

Nombre del congreso: LignoCOST Action Lignin

Ámbito: Internacional. Año: 2021. Lugar: online

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro

12. Effective production of bioactive phenolic compounds from olive stones

Nombre del congreso: The 2nd International Electronic Conference on Foods.

Future Foods and Food Technologies for a Sustainable Word

Ámbito: Internacional. Año: 2021. Lugar: online

Autores: Carmen Padilla-Rascón, Encarnación Ruiz, Eulogio Castro, Luisa B. Roseiro, Luis C. Duarte, Florbela Carvalheiro

