



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Escuela Politécnica Superior de Linares

Trabajo Fin de Grado

MEJORA DE FERMENTABILIDAD DE HIDROLIZADOS DE HOJA DE OLIVO

Alumno: Emilio Lérida Martínez

Tutor: Cristóbal Cara Corpas, Antonia de
Torres Sánchez

Depto.: Ingeniería Química, Ambiental y de
los Materiales

Febrero, 2018

TABLA DE CONTENIDO

1.	RESUMEN / ABSTRACT	4
2.	INTRODUCCIÓN.....	5
2.1	Biocarburantes.....	5
2.1.1	Bioetanol.....	5
2.1.2	Obtención de bioetanol	6
2.2	Biomasa proveniente del olivar	9
2.3	Sustancias inhibidoras resultantes de la hidrólisis.....	10
2.3.1	Furfural e HMF.....	12
2.3.2	Ácidos alifáticos	12
2.3.3	Compuestos fenólicos.....	13
2.3.4	Otros efectos inhibidores	14
2.4	Procedimientos y tecnologías de detoxificación	14
2.5	Diseño experimental	15
3.	OBJETIVOS	16
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1	Materia prima	18
4.2	Hidrólisis ácida en autoclave	19
4.3	Métodos de detoxificación.....	20
4.3.1	Detoxificación con carbón activo y resina.....	20
4.4	Caracterización del hidrolizado	22
4.4.1	Mediante HPLC.....	22
4.4.2	Mediante espectrofotometría (método de Folin-Ciocalteu)	23
4.5	Matriz experimental.....	25
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1	Hidrolizado de hoja de olivo	27
5.2	Detoxificación con Resina	28

5.3	Detoxificación con Carbón	30
5.4	Análisis y discusión de los resultados	31
5.4.1	Influencia sobre la recuperación de azúcares	32
5.4.2	Influencia de los factores estudiados sobre la concentración de ácido acético	34
5.4.3	Influencia de los factores estudiados sobre la concentración de ácido fórmico	34
5.4.4	Influencia de los factores estudiados sobre la concentración de polifenoles totales	35
6.	CONCLUSIONES.....	37
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de obtención de bioetanol de segunda generación. (Mondaray Laguna, Romero Pulido, y López Linares 2016).....	6
Figura 2. Estructura de los tres componentes principales de la biomasa.....	8
Figura 3. Balance de materia medio por hectárea de olivo en España (Romero-García et al. 2014)	9
Figura 4. Esquema de las posibles rutas de conversión de los polímeros que forman la biomasa (Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013).	11
Figura 5. Estructura química del hidroxitirosol, un polifenol presente en la biomasa de olivo (García, Fernández, and Fuentes 2015)	13
Figura 6. Esquema de trabajo.	17
Figura 7. Hoja de olivo secando a temperatura ambiente.	18
Figuras 8 y 9 Molino de cuchillas tipo Retsch (SM 100, Haan, Alemania) y Tamiz de salida de 1cm respectivamente.....	18
Figura 10. Autoclave utilizado para la hidrólisis.	19
Figura 11. Orbital utilizado para la agitación y calefacción de las muestras.....	20
Figura 12. Resina de intercambio iónico utilizada.....	21
Figura 13. Máquina centrífuga utilizada para decantar las partículas de la muestra.	21
Figura 14. Etiqueta de las columnas utilizadas en el cromatógrafo.....	22

Figura 15. Filtración a través de membranas para acondicionar las muestras a HPLC.....	23
Figura 16. Reactivo de Folin-Ciocalteu utilizados para determinar la cantidad de polifenoles.	23
Figura 17. Recta patrón y la ecuación que la define.	24
Figura 18. Espectrofotómetro Milton Roy (Spectronic 301) utilizado para medir la absorbancia a 760 nm.	25
Figuras 19 y 20. Gráficas de la interacción entre A y B (temperatura y tiempo), y entre B y D (tipo de adsorbente y tiempo) en la recuperación de azúcares.....	33
Figura 21. Gráfica de la interacción entre A y B (temperatura y tiempo) en la reducción de fórmico.....	35
Figuras 22 y 23. De izquierda a derecha, gráficas de Pareto y de perturbación dónde se muestra la repercusión del factor D frente a los demás.....	36

1. RESUMEN / ABSTRACT

En este trabajo vamos a estudiar distintos procesos de detoxificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica, hoja de olivo en nuestro caso, con el fin de reducir los compuestos tóxicos que inhiben las etapas posteriores dentro de un proceso más general de obtención de bioetanol. Por otro lado, también se pretende estudiar las condiciones de trabajo que nos permitan obtener una alta recuperación de azúcares, lo que nos permitirá obtener un rendimiento de proceso mayor en relación a la biomasa utilizada como materia prima. Para su evaluación se han medido tanto del hidrolizado de referencia, obtenido por hidrólisis ácida en condiciones suaves, como de los hidrolizados después de detoxificar con resina y carbón activo, la concentración de azúcares y de compuestos reconocidos habitualmente como potencialmente inhibitorios de procesos de fermentación etanólica como son los ácidos acético y fórmico o el contenido en polifenoles.

ABSTRACT

In this paper we will study different detoxification methods for lignocellulose hydrolysates of olive leaf's in our case, in order to reduce the toxic compounds inhibiting the subsequent steps in a more general process of obtaining bioethanol. On the other hand, it is also intended to study the working conditions that allows us to obtain a high recovery of sugars, which will allow us also to obtain a higher output in relation to the biomass used as raw material. For its evaluation, the original hydrolysate, obtained by acid hydrolysis under mild conditions, and the hydrolysates after detoxifying with resin and active carbon, the concentration of sugars and compounds usually recognized as potentially inhibiting ethanolic fermentation processes have been measured, such as acetic and formic acids or the polyphenol content.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Biocarburantes

Debido al incremento constante de población e industria al que el planeta se enfrenta, la demanda energética y de materias primas se mantiene en un crecimiento sostenido a lo largo del tiempo y no se espera que esta situación cambie. Esto supone un problema de cara al futuro ya que por ahora la principal fuente energética y de síntesis química son los combustibles fósiles, cuyas reservas, además de ser finitas debido a la velocidad de explotación frente al período de retorno de las mismas, se encuentran localizadas de manera muy concreta en unos pocos países. Un problema añadido a esto es además que se estima que a medida que el tiempo pase el precio, tanto de la extracción como del transporte y refino, irá aumentando. Los biocarburantes por tanto, entre otras fuentes de energía renovable, tienen un futuro prometedor debido a su disponibilidad y bajo coste en la mayoría de los países (Pandey et al. 2011).

La definición de biocarburante es la de aquel combustible líquido con especificaciones técnicas definidas, que sean equivalentes a las del carburante fósil al que sustituyen en los motores de combustión interna. Los principales biocarburantes son el bioetanol y el biodiésel. (Mondaray Laguna, Romero Pulido, and López Linares 2016).

2.1.1 Bioetanol

Podemos definir al bioetanol como un biocombustible que procede de la fermentación de los azúcares contenidos en la biomasa. En este proceso, están implicados procesos enzimáticos y de fermentación hasta su conversión en etanol. El microorganismo de uso más extendido en la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae*, también conocido como levadura de cerveza (Gracia 2004).

El bioetanol es el biocombustible que más se fabrica o produce a nivel mundial. En 2004 se elaboraron más de 40.000 millones de litros (Pandey et al. 2011). El bioetanol actualmente se utiliza en automoción en mezclas junto con gasolina en concentraciones del 5 o el 10%. Éstas pueden funcionar en los motores actuales sin requerimiento de ninguna adaptación mecánica.

2. INTRODUCCIÓN

Otra alternativa en el uso del bioetanol para automoción es transformarlo para convertirlo en aditivo de la gasolina, en lugar de como sustituto. Éstos se encargan de ajustar el octanaje de las gasolinas, y de contribuir a reducir las emisiones contaminantes. Estos aditivos oxigenantes son algunos como el metanol, el etanol, el tercbutil alcohol (TBA), o el metil-tercbutil éter (MTBE). Además de éstos, existe el etil-tercbutil éter (ETBE), que durante los últimos años se ha impuesto sobre los otros por su menor nivel de emisiones y mayor biodegradabilidad. Como dato, en España todo el etanol dedicado a automoción se convierte en ETBE (Gracia 2004).

2.1.2 Obtención de bioetanol

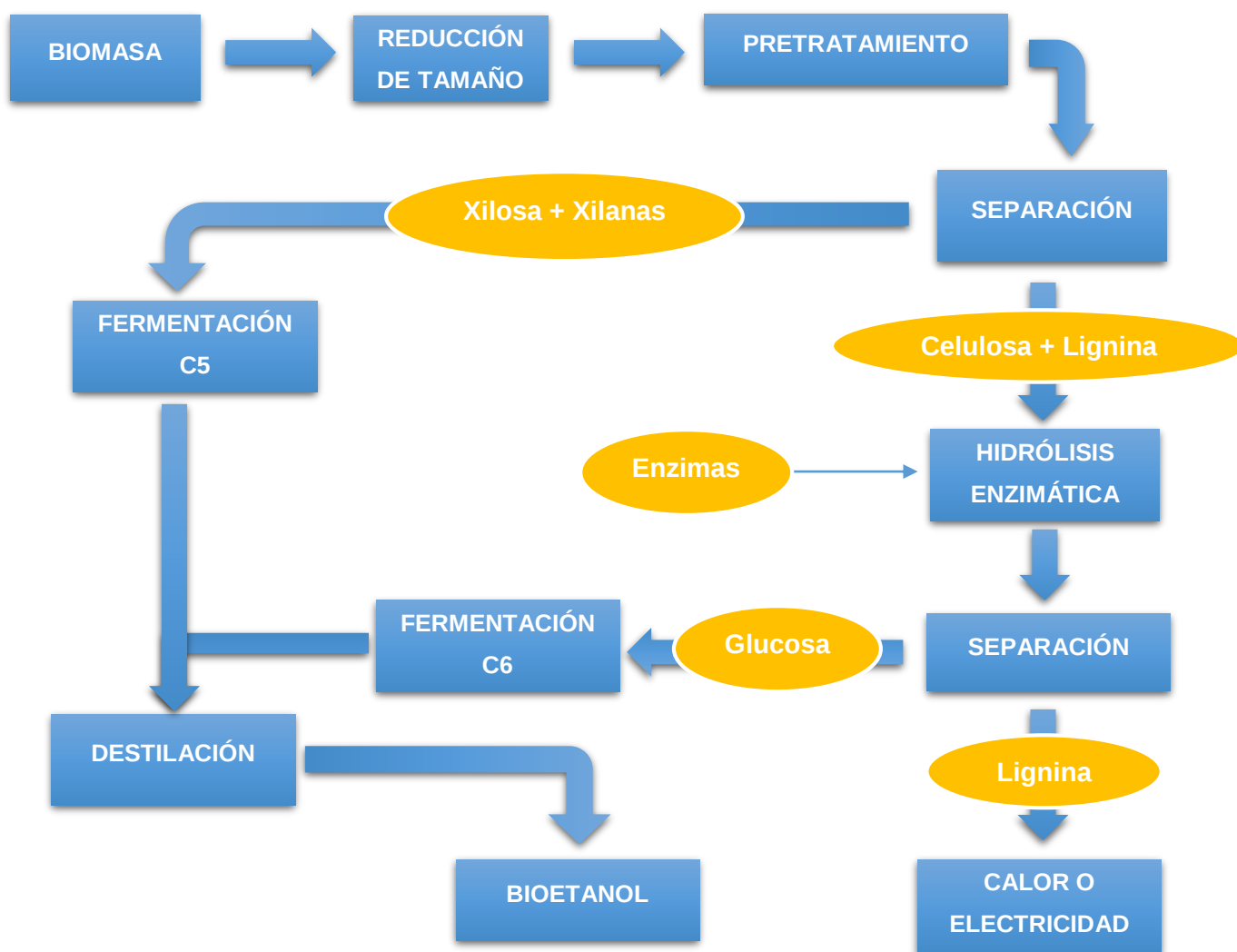


Figura 1. Esquema general de obtención de bioetanol de segunda generación. (Mondaray Laguna, Romero Pulido, y López Linares 2016)

2. INTRODUCCIÓN

El bioetanol es un biocombustible que se obtiene a partir de azúcares vegetales, a través del procedimiento de la fermentación alcohólica de los mismos presentes en cada tipo de biomasa. Y aunque este es un proceso de transformación esencial, no es el único del que se conforma. Para llevar a cabo la fermentación es necesario aislar los azúcares del total de compuestos que constituyen la biomasa, de tal manera que las enzimas puedan catalizar las reacciones químicas que los convierten en alcoholes.

Para conseguir este aislamiento, tenemos que conocer de qué se compone el tipo de materia prima con la que vamos a trabajar. En nuestro caso, es fundamentalmente de tres compuestos: celulosa, hemicelulosa y lignina. Por esta razón, la materia prima recibe el nombre de biomasa lignocelulósica. La proporción y composición de cada una varía dependiendo de la especie, lo que aumenta la complejidad del proceso de conversión en biocarburante.

La gran parte del bioetanol que se comercializa en la actualidad proviene de cultivos de remolacha, cereales o caña de azúcar que se utilizan exclusivamente para este fin. El bioetanol que se obtiene de estas plantaciones se conoce como bioetanol de primera generación (1G). El problema que plantean estos cultivos es el uso tanto del suelo como de las materias primas que forman parte de las utilizadas para el sustento y la alimentación de la población humana y animal. Dado que la disponibilidad de estos recursos es limitada e interfiere de manera directa con otro tipo de plantaciones se plantea un debate en la utilización de estos cultivos (Bellido Díez, González Benito, y García Cubero 2013).

Como alternativa a este proceso surge la obtención de bioetanol de segunda generación (2G), que se nutre de biomasa lignocelulósica de carácter residual. De esta manera además de resolver el dilema ético que surge de las plantaciones energéticas se aprovechan las reservas de biomasa lignocelulósica disponibles. Esto supone además que se incrementaría el nivel de producción de bioetanol. Además de éstos, existe una tercera variante, el bioetanol de tercera generación (3G). Ésta es una rama de obtención con mucho menos volumen de producción actualmente. Esto se debe a la naturaleza del proceso, que utiliza métodos parecidos a los de segunda generación, pero utiliza la biomasa proveniente de cultivos bioenergéticos específicos. Estos se diferencian de los de primera generación en que están acondicionados para mejorar su conversión en bioetanol. Como ejemplo existe el desarrollo de árboles bajos en el contenido de lignina, que abaratan los costes de pretratamiento y mejoran su rendimiento en bioetanol (Mondaray Laguna, Romero Pulido, y López Linares 2016).

2. INTRODUCCIÓN



Figura 2. Estructura de los tres componentes principales de la biomasa

Tanto la celulosa como la hemicelulosa son moléculas compuestas por monosacáridos, lo que las convierte propiamente en polisacáridos. En el caso de la celulosa, es un polisacárido compuesto solamente por moléculas de β -glucosa. En cambio, la hemicelulosa está formada por un conjunto heterogéneo de polisacáridos, que son xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico. Por otra parte, se encuentra la lignina, que es un polímero fenólico reticulado de naturaleza no azucarada. Está compuesto por varios ácidos y alcoholes fenilpropiólicos acoplados de manera aleatoria, donde la mayoría son enlaces éter.

Estos polisacáridos de la lignocelulosa se hidrolizan para conseguir monosacáridos, que posteriormente serán transformados a través de microorganismos en futuros alcoholes. Esta hidrólisis se puede llevar a través de distintos métodos. Uno de los más comunes es la hidrólisis ácida, mediante ácidos fuertes inorgánicos que catalizan la reacción. Aunque también existen otros como la hidrólisis enzimática. Lo más habitual en estos casos es la conjunción de ambos métodos, utilizando un pretratamiento ácido termoquímico anterior a la hidrólisis enzimática, de tal manera que se aumente la susceptibilidad de los polisacáridos en el proceso de hidrólisis enzimática. Una vez se ha llevado a cabo esta hidrólisis podemos fermentar los monosacáridos. La estrategia de fermentación puede realizarse de forma secuencial o simultánea (Separated Hydrolysis and Fermentation y Simultaneous Saccharification and Fermentation).

2.2 Biomasa proveniente del olivar

Hay distintas definiciones para el término «biomasa». La Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), usa la siguiente: “todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización”. Entre los del proceso de mineralización estarían el carbón, el petróleo y el gas natural, cuya formación hace miles de años no es comparable con el balance neutro de la biomasa en las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) (IDAE and Javier 2007). Este balance hace referencia a que las emisiones de CO₂ provenientes de la biomasa no contribuyen al aumento del efecto invernadero ya que se recuperan de la atmósfera cuando las plantas crecen.

En este trabajo se ha utilizado biomasa procedente de la industria del aceite de oliva, y que hoy por hoy tiene carácter residual. El cultivo del olivar es uno de los más extensos en España, siendo el primer cultivo de Andalucía. En 2015 contaba con más de 1.500.000 de hectáreas plantadas (Consejería de Agricultura y Junta de Andalucía 2015) siendo el aceite de oliva su principal producto. Esta industria produce además distintos subproductos derivados del tratamiento y cultivo del árbol y fruto, como son hojas o poda. Una de las vías de aprovechamiento de estos residuos agrícolas que más se está extendiendo es la producción de biocombustibles.

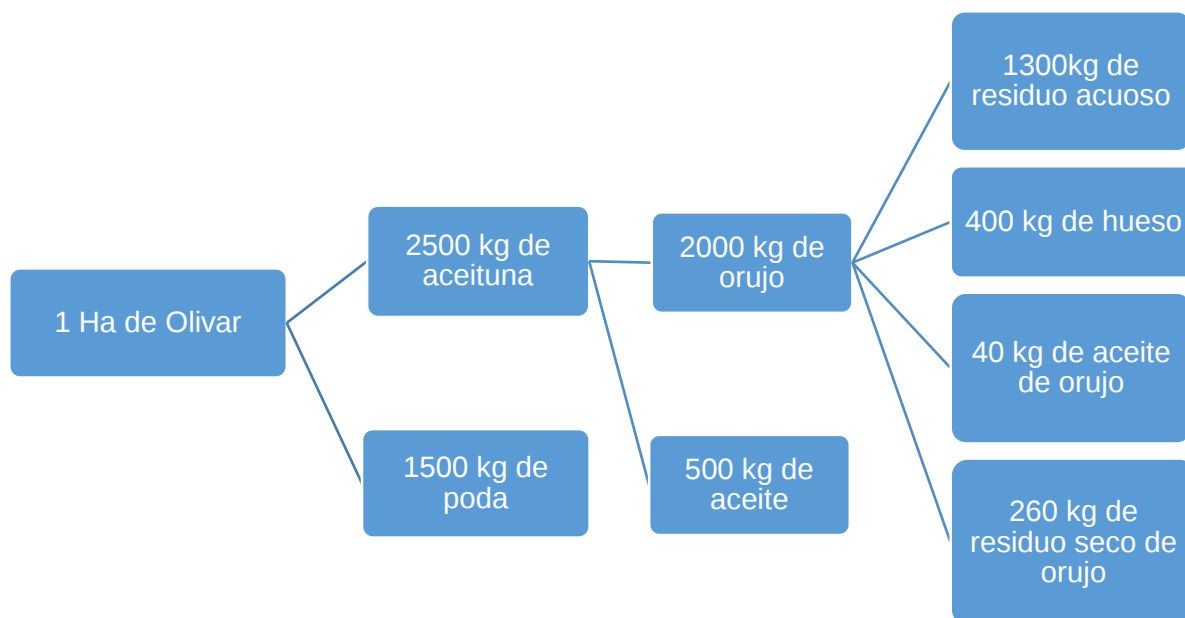


Figura 3. Balance de materia medio por hectárea de olivo en España (Romero-García et al. 2014)

2. INTRODUCCIÓN

Como podemos apreciar en la Figura 3. Balance de materia medio por hectárea de olivo en España (Romero-García et al. 2014) el rendimiento de este proceso industrial no es demasiado alto y se generan una gran cantidad de subproductos que, pese a que cada día se imponen más las técnicas y empresas que los aprovechan, siguen considerándose residuos en la mayoría de ocasiones. Éste es el caso de la hoja, que se halla en dos escenarios de la producción de aceite. Uno de ellos es durante la poda, el cual se estima que constituye alrededor de un 25% del total (Mondaray Laguna, Romero Pulido, and López Linares 2016).

Éstas suelen ser utilizadas como abono al suelo o para su combustión directa. También hay empresas que las pelletizan junto a los residuos leñosos para aprovecharlas en calderas de biomasa. El otro escenario se encuentra es en el proceso de limpieza, que se lleva a cabo en la almazara. En esta etapa se limpia la aceituna y se separa la hoja, por lo que se obtiene sólo esta con apenas restos de residuos leñosos (Damien 2010).

Una de las vías de aprovechamiento que han surgido en los últimos años es la de la utilización de ésta para la obtención de biocombustibles. En concreto la fermentación alcohólica para la obtención de bioetanol.

2.3 Sustancias inhibidoras resultantes de la hidrólisis

Cuando la biomasa lignocelulósica se quiere convertir en bioetanol es necesaria una o varias etapas de hidrólisis en condiciones de severidad, que hacen que se produzcan no sólo azúcares fermentativos, si no también compuestos inhibidores de etapas o procesos posteriores. Durante el proceso de hidrólisis la hemicelulosa, celulosa y lignina disponibles rinden a una serie de monosacáridos como pentosas y hexosas, y también ácidos carboxílicos alifáticos, que suelen ser en su mayoría ácido fórmico, ácido acético y ácido levulínico. Además de estos compuestos, se generan furfural y hidroximetilfurfural (HMF) como consecuencia de la degradación que sufren estos azúcares (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000a, 2000b).

En el caso de la lignina, permanece casi en su totalidad como un residuo sólido después de la hidrólisis. La pequeña parte que lo hace se degrada a compuestos aromáticos y fenoles.

2. INTRODUCCIÓN

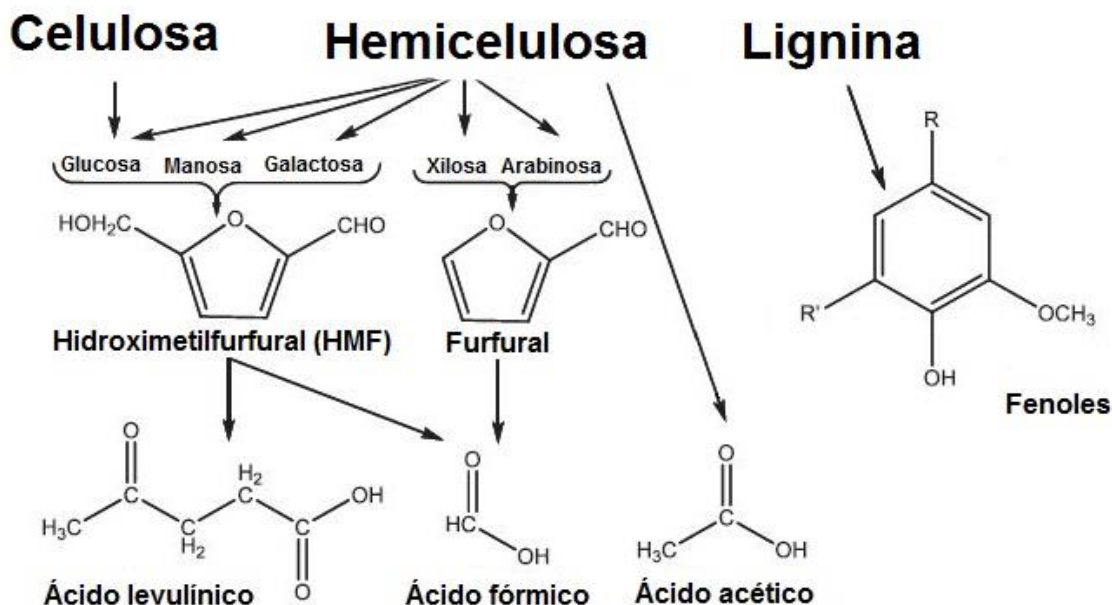


Figura 4. Esquema de las posibles rutas de conversión de los polímeros que forman la biomasa (Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013).

Estos compuestos pueden ser potencialmente inhibidores de enzimas y microorganismos que, posteriormente, se encargarán de llevar a cabo una hidrólisis enzimática y de fermentar los monosacáridos disponibles. La variabilidad de que esto suceda o no es amplia, ya que la aparición de estos compuestos, en mayor o menor medida, está fuertemente relacionada con el carácter de la biomasa lignocelulósica que estemos utilizando en el proceso.

De hecho el rango de factores que pueden afectar a las enzimas es tan amplio que en los casos en los que se lleva a cabo una sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) ha de purgarse el contenido de etanol y butanol generado de manera continua, ya que una concentración mayor de la necesaria de estos compuestos puede dar lugar a que el microorganismo encargado de la fermentación o la hidrólisis enzimática muera. Por ejemplo, en la mayoría de los procesos se utiliza *S. Cerevisiae* (levadura), que se ve inhibida cuando la concentración en volumen de butanol está por encima de un 2% (v/v) (Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013).

2. INTRODUCCIÓN

2.3.1 Furfural e HMF

El furfural y el HMF (Hidroximetilfurfural) son compuestos bastante comunes en los hidrolizados lignocelulósicos ya que éstos se forman por la degradación de pentosas y hexosas respectivamente (Figura 4. Esquema de las posibles rutas de conversión de los polímeros que forman la biomasa (*Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013*)). Tanto el furfural como el HMF suelen inhibir el crecimiento de los microorganismos, por lo que el rendimiento de etanol se ve disminuido.

La manera de actuar de ambos es distinta. El furfural produce sobre los microorganismos la reducción de la velocidad específica de crecimiento (μ), así como la disminución de la productividad volumétrica de etanol y por tanto una menor producción respecto a la biomasa.

Por otra parte el HMF produce efectos menos negativos sobre los microorganismos. Estos aldehídos tienen una alta reactividad y por tanto una gran capacidad para combinarse con algunas moléculas biológicas, como son los lípidos, las proteínas o ácidos nucleicos. Lo cual se traduce muchas veces en daños sobre la membrana plasmática de los microorganismos, por lo que se acaba viendo comprometido el rendimiento de etanol final.

2.3.2 Ácidos alifáticos

Como se muestra en la Figura 4. Esquema de las posibles rutas de conversión de los polímeros que forman la biomasa (*Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013*)., los hidrolizados de biomasa lignocelulósica contienen ácidos alifáticos tales como el ácido acético, el levulínico y el fórmico. El ácido fórmico y el levulínico aparecen como resultado de una degradación de los compuestos furánicos, reacción catalizada especialmente por ácidos en condiciones de temperatura alta, mientras que el ácido acético se forma principalmente por la hidrólisis de los grupos acetilo que contiene la hemicelulosa.

Éstas sustancias ácidas suelen tener un efecto tóxico sobre los distintos microorganismos encargados de la fermentación, y varían en el siguiente orden: ácido acético < ácido levulínico < ácido fórmico. Se ha descubierto además que a partir de concentraciones mayores a 100mM se inhiben microorganismos como la levadura (*S. cerevisiae*). En cambio, con concentraciones por debajo de los 100mM de ácido alifático

2. INTRODUCCIÓN

se obtienen mejores resultados de etanol que en fermentaciones sin éstos (Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013).

Las concentraciones de este tipo de ácidos varían obviamente dependiendo del tipo de biomasa utilizada y las condiciones del pretratamiento ensayadas. (Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013).

2.3.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, o polifenoles, son moléculas que se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. La actividad biológica de los polifenoles está relacionada con su carácter antioxidante (García, Fernández, and Fuentes 2015), por lo que es una sustancia que puede interferir con la fermentación alcohólica que llevan a cabo los microorganismos.

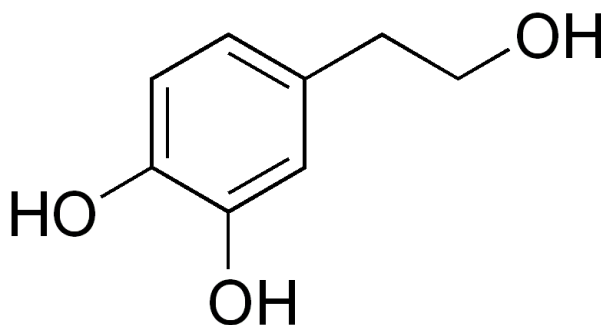


Figura 5. Estructura química del hidroxitirosol, un polifenol presente en la biomasa de olivo (García, Fernández, and Fuentes 2015)

Se pueden utilizar distintos métodos analíticos para identificarlos y cuantificarlos como por ejemplo los métodos cromatográficos, pero la gran variedad de estos compuestos aromáticos hace difícil que se pueda especificar esta medida en cada uno de ellos. Por ello se suele medir el número total de polifenoles, independientemente del tipo de cada uno. El método más conocido para llevar a cabo este recuento es el método Folin-Ciocalteu, cuyo uso se ha extendido en la determinación del contenido en polifenoles totales en extractos obtenidos de biomásas de distinta procedencia (García, Fernández, and Fuentes 2015).

Debido a la heterogeneidad de este grupo, no pueden estimarse con exactitud los efectos que tendrán sobre el crecimiento de los microorganismos y por tanto su rendimiento total. La variabilidad de estos reactivos ha hecho que a día de hoy no se conozca con exactitud el mecanismo de toxicidad que infieren sobre los microorganismos, aunque se han propuesto varios. Uno de ellos es que estos fenoles interfieran con las membranas celulares y cambien su ratio de proteína/lípido (Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013).

2. INTRODUCCIÓN

2.3.4 *Otros efectos inhibidores*

En la práctica, no sólo son las sustancias tóxicas que antes mencionaba las únicas que inhiben el crecimiento o el buen funcionamiento de los microorganismos. El mismo etanol generado en la fermentación afecta a este proceso muchas veces. El etanol afecta a las membranas de las células provocando cambios en la permeabilidad y en la organización y composición de los lípidos (Lin and Tanaka 2006).

De la misma forma, existe la posibilidad de que varios de los componentes tóxicos que mencionaba antes trabajen de manera conjunta. Distintos experimentos muestran esta relación nociva entre furfurales y polifenoles a distintas concentraciones (Jönsson, Alriksson, and Nilvebrant 2013).

Además del posible efecto tóxico de cada una de estas familias de compuestos puedan causar de manera individual, existe la constatación experimental de que la presencia simultánea de ellos tiene un efecto de mayor influencia que la suma de los efectos individuales. Este hecho resulta de especial interés frente a una posible estrategia de detoxificación, que puede pasar por reducir el total de compuestos inhibidores o solo parcial o selectivamente alguno de ellos.

2.4 Procedimientos y tecnologías de detoxificación

La detoxificación de los hidrolizados de biomasa lignocelulósica es un proceso que aumenta el coste general del coste de bioetanol, pero que aun así resulta un paso muy importante. En la mayoría de los casos se suelen utilizar dos métodos debido a la sencillez y el bajo coste, que son: el tratamiento con hidróxido cálcico, que también se conoce como over-liming, y el tratamiento con carbón activo como adsorbente. Éste último es uno de los que utilizaremos en el ensayo. Pese a la eficacia frente a las sustancias tóxicas de estos dos tratamientos, se han detectado casos en los que hay importantes pérdidas de azúcares (Larsson et al. 1999).

2. INTRODUCCIÓN

Es por ello importante conocer la existencia de otros métodos, como pueden ser el tratamiento con resinas de intercambio aniónico/catiónico, la evaporación, el uso de sulfitos, o el tratamiento a través de hongos especializados como el *Trichoderma Reesei*. (Larsson et al. 1999). El inconveniente mayoritario de todos estos métodos de detoxificación es su dificultad y coste a la hora de trasladarlos a grandes producciones de bioetanol, por lo que en la mayoría de casos se suelen utilizar los más asequibles aunque se comprometa la cantidad total de azúcares.

2.5 Diseño experimental

En nuestro trabajo hemos utilizado la metodología del diseño experimental. Ésta se apoya en la matemática estadística para diseñar una base de actuación o camino para cumplir dos objetivos principalmente. El primero, elegir el procedimiento que nos permita averiguar la mayor cantidad de información llevando a cabo el menor número de pruebas o experimentos. Esto nos facilita el trabajo y nos permite reducir tanto el tiempo como el coste de llevar a cabo las pruebas. El segundo, tener una base estadística fiable sobre la que valorar los resultados obtenidos en los experimentos teniendo en cuenta la incertidumbre del propio proceso (Ferré 2002).

En esta metodología de trabajo se aplica cuando se observan una o más variables experimentales dependientes o respuestas (y), cuyo valor depende de los valores de una o más variables independientes (x). Éstas últimas si se pueden controlar, por lo que reciben el nombre de factores. Hay que tener en cuenta que en las respuestas (y) pueden estar influidas por otras variables o factores que no controlemos. La relación existente entre x e y tampoco tiene porqué ser conocida (Ferré 2002).

El tipo de diseño al que recurriremos en este trabajo es un diseño factorial a dos niveles completo. Con este tipo de diseño podemos conocer qué efecto tienen “k” factores sobre una respuesta y descubrir si hay algún tipo de interacción entre ellos. Este método trabaja de forma que se varían varios de estos factores de manera simultánea, pero se evita al mismo tiempo que se repitan experimentos o que cambien en un mismo sentido.

3. OBJETIVOS

1. Tener una mayor referencia de los residuos que se derivan tanto del cultivo del olivar como de la industria asociada y sus posibilidades de valorización.
2. Familiarizarse con técnicas experimentales de laboratorio relacionadas con los conocimientos adquiridos en la formación. Específicamente con métodos analíticos de detoxificación.
3. Introducirse en el empleo de la metodología de diseño de experimentos y en el manejo de software específico para ello.
4. Analizar y discutir el efecto de los distintos tratamientos de detoxificación aplicados a los hidrolizados de hoja de olivo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado de materiales y metodología se presenta todo lo relacionado con los materiales tanto materia prima como reactivos, equipos de ensayo y técnicas de caracterización utilizados en este trabajo que deben permitir analizar e interpretar los resultados obtenidos experimentalmente y que se presentarán más adelante.

Cronológicamente el trabajo experimental se desarrolló de la siguiente forma:

1. Recogida y almacenamiento de hoja de olivo.
2. Producción de hidrolizados acuosos potencialmente fermentables a etanol.
3. Caracterización de los hidrolizados obtenidos: azúcares y tóxicos.
4. Ensayo de las diferentes técnicas de detoxificación propuestas.
5. Caracterización de los hidrolizados después de las detoxificaciones.



Figura 6. Esquema de trabajo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materia prima

La biomasa de hoja de olivo que se ha utilizado en este trabajo ha sido proporcionada por la almazara Unión Oleícola situada en el término municipal de Cambil (Jaén) durante la pasada campaña de recogida de aceitunas. Se trata de hoja obtenida del proceso habitual de limpieza de aceituna previo a la molturación y extracción de aceite de oliva. El material lignocelulósico se seca de manera natural para reducir su contenido en humedad, inicialmente elevado, en torno al (40-50)%.

Para conseguir una mayor homogeneización el lote es molido en un molino de cuchillas tipo Retsch con un tamiz de salida de 1cm. Una vez homogeneizado se determina la humedad en estufa hasta pesada constante a 105°C determinándose un contenido en peso seco del 94%, posteriormente se almacena en una bolsa con auto-cierre en un ambiente seco hasta su utilización en los experimentos.



Figura 7. Hoja de olivo secando a temperatura ambiente.



Figuras 8 y 9 Molino de cuchillas tipo Retsch (SM 100, Haan, Alemania) y Tamiz de salida de 1cm respectivamente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2 Hidrólisis ácida en autoclave

En base a trabajos previos del grupo de investigación y experiencia de los tutores de este trabajo se han seleccionado las condiciones de trabajo para producir un hidrolizado “tipo” a partir de la hoja de olivo en condiciones suficientes para hidrolizar las hemicelulosas primer objetivo habitualmente del fraccionamiento de biomasa lignocelulósica y que posteriormente se utilizará para las diferentes alternativas de detoxificación.

El equipo empleado ha sido un reactor tipo autoclave sin agitación con control de temperatura y tiempo de reacción. Las condiciones ensayadas han sido una relación S/L del 15% (p/v) para lo que se han utilizado frascos de 1L de capacidad y tapón roscado en los que se ha puesto una cantidad en base seca de hoja de 75g y 500mL de disolución acuosa de ácido sulfúrico de concentración al 2%(v/v), para mejorar la hidrólisis de los azúcares hemicelulósicos, el tiempo de reacción ha sido de 60 minutos y la temperatura de 120°C.

Una vez completado el proceso de hidrólisis ácida se separaron mediante filtración a vacío dos fracciones, una sólida y otra líquida que constituye el hidrolizado a detoxificar en el que se han disuelto una cantidad de azúcares y algunos compuestos como ácido acético, ácido fórmico, furfural, hidroximetilfurfural y polifenoles.



Figura 10. Autoclave utilizado para la hidrólisis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3 Métodos de detoxificación

Para el proceso de detoxificación del hidrolizado vamos a utilizar la adsorción sobre material poroso capaz de retener de forma selectiva los compuestos de naturaleza tóxica y así reducir su concentración en el líquido para favorecer su potencial fermentación posterior hasta etanol (Chandel, Silvério, and Singh 2011).

4.3.1 Detoxificación con carbón activo y resina

El procedimiento experimental ha consistido en utilizar un orbital con control de agitación (en nuestro caso 150 rpm), tiempo de contacto y temperatura según los valores de la matriz de experimentos a partir del diseño factorial propuesto, preparando las distintas mezclas con cada uno de los adsorbentes en la relación sólido (adsorbente)-líquido(hidrolizado) correspondiente, utilizando matraces Erlenmeyer de 125mL de capacidad. Una vez conseguida la temperatura y tiempo de contacto en cada caso se retira del agitador orbital y se separa el hidrolizado primero por centrifugación a 3500 rpm en una centrífuga marca Selecta modelo Centronic-BLT y posteriormente se filtran por una membrana de 0,45 micras de nylon sobre un filtro de jeringa de 25mm de diámetro para eliminar cualquier material adsorbente suspendido que aún pudiera encontrarse en el hidrolizado. Las muestras así preparadas se conservan en frío hasta su análisis espectrofotométrico de polifenoles y cromatografía líquida.



Figura 11. Orbital utilizado para la agitación y calefacción de las muestras.

4. MATERIALES Y MÉTODOS



Figura 12. Resina de intercambio iónico utilizada

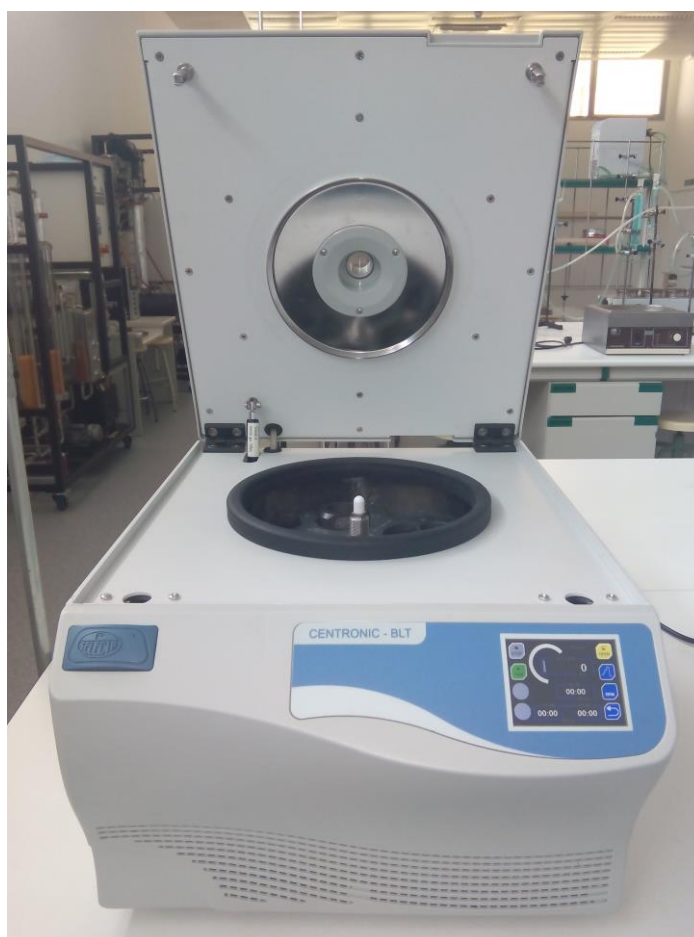


Figura 13. Máquina centrífuga utilizada para decantar las partículas de la muestra.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4 Caracterización del hidrolizado

4.4.1 Mediante HPLC

Tanto el hidrolizado original obtenido por hidrólisis ácida en el autoclave como cada uno de los hidrolizados tratados bajo las distintas condiciones de detoxificación deben ser caracterizados vía HPLC para la cuantificación de azúcares y compuestos tóxicos. La metodología analítica seguida han sido la siguiente. El hidrolizado obtenido se debe acondicionar siempre antes de su inyección haciendo una filtración sobre filtros de jeringa de al menos 45micras para preservar el equipo de cromatografía. Para ello se ha empleado el siguiente equipo y condiciones:

- Equipo de cromatografía Waters modular provisto de bomba monocal, compartimento de termostatación de columnas, inyector automático y detector de Índice de Refracción.
- Columna cromatográfica ICSep ICE-COREGEL-87H3 (300 mm x 7,6 mm)
- Las condiciones de trabajo han sido: fase móvil disolución acuosa de ácido sulfúrico 5 mM, a un flujo de 0,6 mL/min, 65 °C en columna y 35°C en detector.

Mediante la cromatografía líquida podemos ofrecer resultados cuantitativos sobre la concentración de azúcares monoméricos de glucosa, arabinosa y un pico triple que corresponderá a la suma de xilosa, galactosa y manosa presentes en el hidrolizado. En la misma aplicación también podemos obtener datos sobre el contenido de ácido fórmico, ácido acético, furfural (2-furanocarboxilaldehído) e hidroximetilfurfural HMF (5-hidroximetil-2-furaldehído).



Figura 14. Etiqueta de las columnas utilizadas en el cromatógrafo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS



Figura 15. Filtración a través de membranas para acondicionar las muestras a HPLC.

4.4.2 Mediante espectrofotometría (método de Folin-Ciocalteu)

Para determinar la cantidad de polifenoles totales en los resultados utilizamos el método de Folin Ciocalteu. Este método se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a un compuesto de color azul capaz de ser medido a través del espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. El reactivo contiene una mezcla de molibdato sódico y wolframato sódico, diluidos ambos en ácido fosfórico, que reacciona con los polifenoles que se encuentren presentes en la muestra (García, Fernández, and Fuentes 2015).

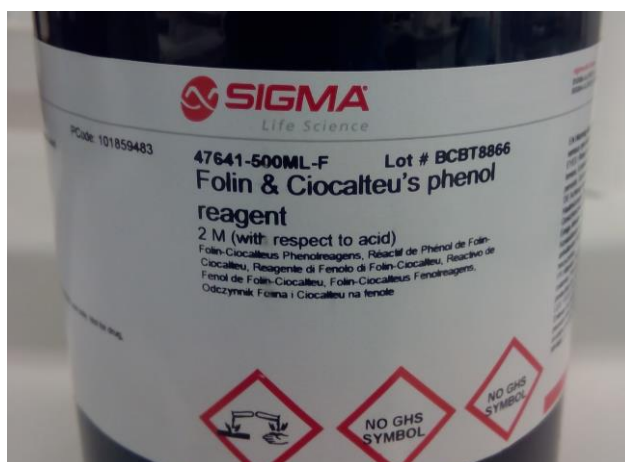


Figura 16. Reactivo de Folin-Ciocalteu utilizados para determinar la cantidad de polifenoles.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El contenido de polifenoles totales se expresa como gramos equivalentes de ácido gálico por unidad de volumen de la muestra analizada, para ello es necesario preparar una recta patrón. Para hacer la recta patrón es necesario preparar una disolución stock de ácido gálico de 0,328 g/L en metanol. La recta patrón se realiza con varios niveles de concentración conocidos a partir de diluciones de la disolución stock, incluyendo un punto donde se sustituye la disolución fenólica por disolvente y que sirve de blanco de disolvente. Midiendo la absorbancia de cada nivel de concentración podremos posteriormente por interpolación calcular el contenido de polifenoles de nuestras muestras problema. Se utilizan rectas patrón con ajuste lineal para comprobar la correlación entre los datos, como por ejemplo:

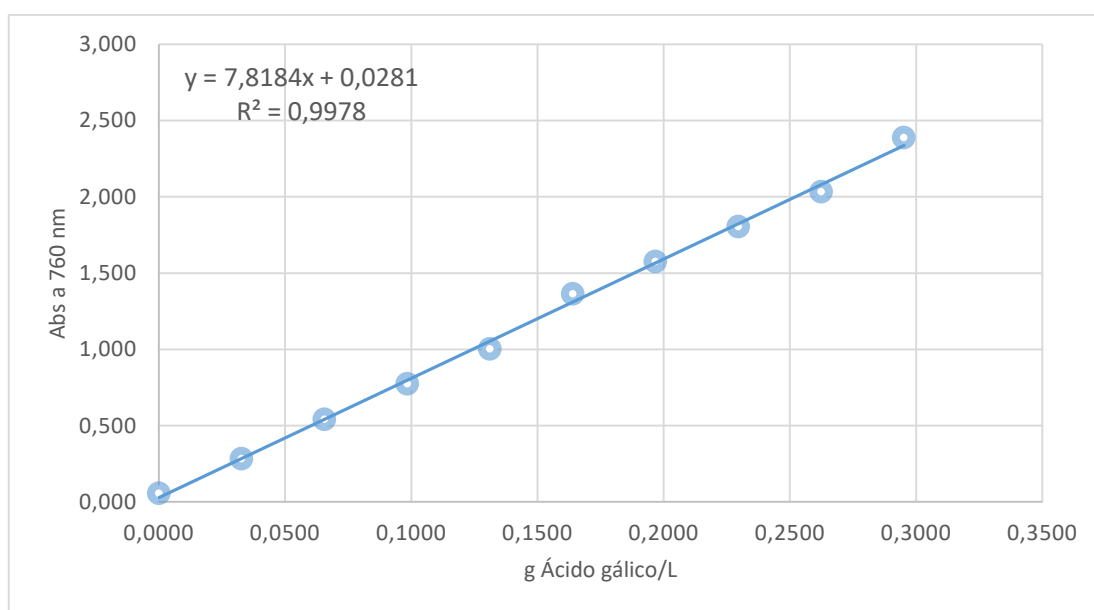


Figura 17. Recta patrón y la ecuación que la define.

Tabla 1. Disolución madre de ácido gálico con metanol de la recta patrón.

Nivel	Metanol (mL)	Disolución de ácido gálico (mL)	Absorbancia a 760 nm	g A.G/L
1	1000	0	0,056	0,0000
2	900	100	0,283	0,0328
3	800	200	0,541	0,0656
4	700	300	0,775	0,0984
5	600	400	1,003	0,1312
6	500	500	1,363	0,1640
7	400	600	1,575	0,1968
8	300	700	1,804	0,2296
9	200	800	2,033	0,2624
10	100	900	2,388	0,2952

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.2.1 Procedimiento experimental

Lo primero que hay que hacer es preparar los dos reactivos necesarios para la determinación de fenoles totales: reactivo de Folin diluido (proporción 1:10 con agua destilada) y una disolución de Na_2CO_3 al 7,5% con agua destilada.

Seguidamente, colocamos en tubos de ensayo 300 μL de la muestra, tanto las diluciones correspondientes de las muestras problema como de las diluciones de la recta patrón. Adicionamos 2,5 mL de la dilución de Folin Colcialteu y agitamos en Vortex, posteriormente adicionamos 2 mL de Na_2CO_3 (7,5%) y volvemos a agitar.

Se deja incubar una hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. A continuación se mide la absorbancia de las muestras a 760 nm.



Figura 18. Espectrofotómetro Milton Roy (Spectronic 301) utilizado para medir la absorbancia a 760 nm.

4.5 Matriz experimental

El esquema de trabajo seguido es un diseño factorial a dos niveles que permite evaluar la influencia y posible interacción de los factores seleccionados: temperatura en el rango (30-50) $^{\circ}\text{C}$; tiempo de contacto entre (60-90)min; porcentaje de adsorbente utilizado (4-8)% .El software utilizado es Design-Expert “Stat Ease” versión 8.0.0 que nos va a ayudar a realizar el análisis de los resultados. A continuación se presenta la matriz de experimentos que se genera en la que cada fila (RUN) será finalmente un experimento.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Matriz experimental de ensayos de detoxificación con Resina.

Experimento	Temperatura °C	Tiempo min	Adsorbente % s/l
RUN1	50	30	8
RUN4	50	60	8
RUN5	50	60	4
RUN6	30	60	8
RUN8	50	30	4
RUN9	30	30	4
RUN10	30	30	8
RUN12	30	60	4

Tabla 3. Matriz experimental ensayos de detoxificación con Carbón Activo

Experimento	Temperatura °C	Tiempo min	Adsorbente % s/l
RUN2	50	60	8
RUN3	50	30	4
RUN7	50	60	4
RUN11	30	60	8
RUN13	50	30	8
RUN14	30	30	8
RUN15	30	60	4
RUN16	30	30	4

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo ha sido analizar la eficacia del proceso de adsorción como procedimiento de detoxificación sobre hidrolizados obtenidos por hidrólisis ácida de biomasa de hoja de olivo, analizando el contenido de azúcares potencialmente fermentables a etanol y determinando los compuestos tóxicos más habituales: contenido en polifenoles totales o presencia de ácidos como el fórmico o el acético. En este apartado se muestran los principales resultados obtenidos en el trabajo experimental desarrollado.

5.1 Hidrolizado de hoja de olivo

En este apartado mostramos las cantidades y concentraciones relevantes de azúcares que contiene el hidrolizado original, desde el que partimos en nuestra línea de investigación sobre métodos de detoxificación. Los resultados de xilosa, galactosa y manosa se muestran bajo el mismo pico en la caracterización mediante HPLC, lo que denominamos pico triple, y que aparece de igual forma en la tabla que expongo a continuación.

Tabla 4. Contenido en azúcares del hidrolizado

AZÚCARES (g/L)		
Glucosa	Xilosa + Galactosa + Manosa	Arabinosa
7,03	6,92	5,42

En la siguiente tabla se representa de igual forma los resultados de las concentraciones de tóxicos que contiene el hidrolizado. En este caso no se encuentran resultados significativos sobre la presencia de Furfural e HMF en la muestra lo que indicaría que la severidad del pretratamiento no ha sido elevada, y por tanto la degradación de azúcares no ha sido relevante.

Tabla 5. Contenido en ácidos inorgánicos y compuestos furánicos del hidrolizado.

TÓXICOS (g/L)			
Acético	Fórmico	Furfural	HMF
1,31	1,6	-	-

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Contenido en polifenoles del hidrolizado.

Muestra Hidrolizado original	g A.G equivalentes/1 L	Desviación típica (%)
<i>MF</i>	1,71	3,3031%

5.2 Detoxificación con Resina

Tabla 7. Azúcares presentes en las muestras tratadas con resina.

Experimento	Azúcares (g/L)				Recuperación de azúcares (%)
	Glucosa	Xilosa + Galactosa + Manosa	Arabinosa	TOTALES	
RUN1	7	6,9	5,3	19,2	99,12
RUN4	6,42	6,32	4,86	17,6	90,86
RUN5	4,72	4,66	3,59	12,97	66,96
RUN6	5,42	5,24	4,16	14,82	76,51
RUN8	5,34	5,27	4,07	14,68	75,79
RUN9	4,85	4,78	3,7	13,33	68,82
RUN10	4,68	4,54	3,61	12,83	66,24
RUN12	6,61	6,51	5,01	18,13	93,60
H. original	7,03	6,92	5,42	19,37	100,00

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 8. Tóxicos presentes en las muestras tratadas con resina.

Experimento	Tóxicos (g/L)			
	Ácético	Reducción (%)	Fórmico	Reducción (%)
RUN1	0,21	84,0%	0,60	62,5%
RUN4	1,24	5,3%	1,23	23,1%
RUN5	0,82	37,4%	0,80	50,0%
RUN6	0,78	40,5%	0,61	61,9%
RUN8	1,05	19,8%	1,06	33,8%
RUN9	0,82	37,4%	0,78	51,3%
RUN10	0,66	49,6%	0,53	66,9%
RUN12	1,21	7,6%	1,24	22,5%
Hidrolizado original	1,31	0,0%	1,60	0,0%

Tabla 9. Contenido en polifenoles de las muestras tratadas con resina.

Experimento	g A.G equivalentes/L	Reducción (%)
RUN1	1,6241	5,4%
RUN4	1,6314	5,0%
RUN5	1,6812	2,1%
RUN6	1,6258	5,3%
RUN8	1,6325	4,9%
RUN9	1,6825	2,0%
RUN10	1,6365	4,7%
RUN12	1,6900	1,6%

5.3 Detoxificación con Carbón

Tabla 10. Azúcares presentes en las muestras tratadas con carbón activo.

Experimento	Azúcares (g/L)				Recuperación de azúcares (%)
	Glucosa	Xilosa + Galactosa + Manosa	Arabinosa	TOTALES	
RUN2	6,11	5,9	4,63	16,64	85,91
RUN3	7,01	6,90	5,40	19,31	99,69
RUN7	5,74	5,67	4,38	15,79	81,52
RUN11	5,79	5,72	4,42	15,93	82,24
RUN13	5,57	5,46	5,01	16,04	82,81
RUN14	6,58	6,34	4,97	17,89	92,36
RUN15	6,81	6,72	5,19	18,72	96,64
RUN16	6,27	6,18	4,76	17,21	88,85
Hidrolizado original	7,03	6,92	5,42	19,37	100,00

Tabla 11. Tóxicos presentes en las muestras tratadas con carbón activo.

Experimento	Tóxicos (g/L)			
	Ácético	Reducción (%)	Fórmico	Reducción (%)
RUN2	0,92	29,8%	0,63	60,6%
RUN3	1,30	0,8%	1,49	6,9%
RUN7	1,10	16,0%	1,11	30,6%
RUN11	1,11	15,3%	1,20	25,0%
RUN13	0,96	26,7%	0,87	45,6%
RUN14	1,01	22,9%	0,76	52,5%
RUN15	1,29	1,5%	1,38	13,8%
RUN16	1,19	9,2%	1,25	21,9%
Hidrolizado original	1,31	0,0%	1,60	0,0%

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12. Contenido en polifenoles de las muestras tratadas con carbón activo.

Experimento	g A.G equivalentes/L	Reducción (%)
RUN2	0,3041	82,3%
RUN3	0,7102	58,6%
RUN7	0,7180	58,2%
RUN11	0,2046	88,1%
RUN13	0,1720	90,0%
RUN14	0,2071	87,9%
RUN15	0,6220	63,8%
RUN16	0,8929	48,0%

5.4 Análisis y discusión de los resultados

En este apartado se van a discutir los resultados obtenidos mediante el procesamiento de la información experimental con el software Design-Expert. Mediante análisis factorial, según la matriz representada en la Tabla 13. *Matriz de diseño experimental* Se han seleccionado varias respuestas para evaluar la eficacia de los distintos procesos de detoxificación ensayados: recuperación de azúcares (expresado en tanto por ciento), disminución de ácido acético, ácido fórmico, y contenido en polifenoles totales (gramos de ácido gálico equivalente por litro).

Tabla 13. Matriz de diseño experimental

Nº RUN	Temperatura (Cº)	Tiempo (min)	Concentración (%)	Adsorbente
RUN1	50	30	8	RESINA
RUN2	50	60	8	CARBÓN ACTIVO
RUN3	50	30	4	CARBÓN ACTIVO
RUN4	50	60	8	RESINA
RUN5	50	60	4	RESINA
RUN6	30	60	8	RESINA
RUN7	50	60	4	CARBÓN ACTIVO
RUN8	50	30	4	RESINA
RUN9	30	30	4	RESINA
RUN10	30	30	8	RESINA
RUN11	30	60	8	CARBÓN ACTIVO
RUN12	30	60	4	RESINA
RUN13	50	30	8	CARBÓN ACTIVO
RUN14	30	30	8	CARBÓN ACTIVO
RUN15	30	60	4	CARBÓN ACTIVO

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RUN16	30	30	4	CARBÓN ACTIVO
--------------	----	----	---	---------------

5.4.1 Influencia sobre la recuperación de azúcares

En la siguiente tabla se pueden observar las contribuciones más significativas de cada factor experimental sobre el rendimiento de recuperación de azúcares, después de los procesos de detoxificación ensayados.

Tabla 14. Contribución de cada uno de los factores sobre el rendimiento de recuperación de azúcares

Factores**	% Contribución
A-Temperatura	23,99
B-Tiempo	0,32
C-%Adsorbente	12,57
D-Adsorbente	2,08
AB	16,81
AC	0,13
AD	1,97
BD	9,32

En la tabla de contribuciones se observa cómo el factor que más influye es la temperatura, con una contribución del 23,99%, seguido del porcentaje de adsorbente utilizado. La contribución tanto del tipo de adsorbente como sobre todo del tiempo es minoritaria. Por otra parte, cabe destacar la contribución de la combinación de la temperatura con el tiempo, que llega a ser del 16,81%. Para evaluar el efecto de todos los factores, tanto de sus efectos principales como de sus posibles interacciones, se pueden resumir en la siguiente ecuación:

$$\text{Recuperación de azúcares} = 81,51 - 9,83A + 0,50B - 3,47C + 2,89D - 3,59AB + 0,35AC + 1,38AD - 2,67BD \quad **$$

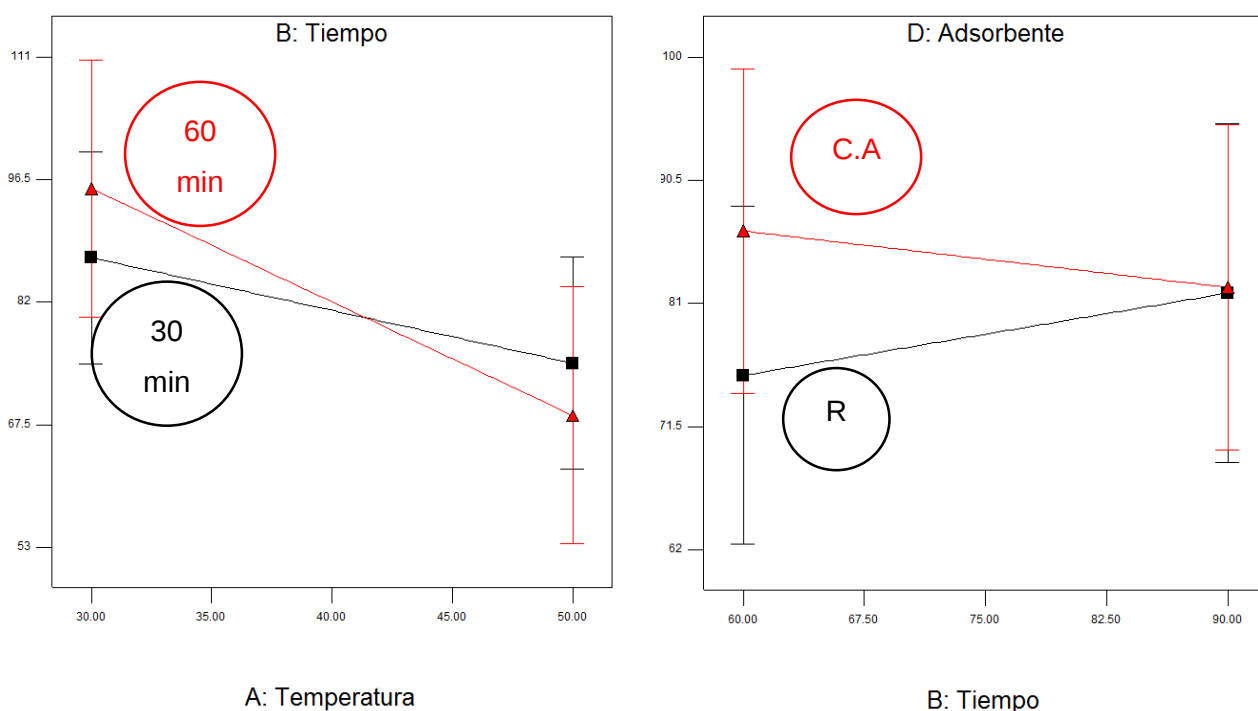
******La nomenclatura de cada factor está recogida en la Tabla 14. *Contribución de cada uno de los factores sobre el rendimiento de recuperación de azúcares*

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De esta forma, y tomando como referencia los coeficientes numéricos que acompañan a cada término de la ecuación, podemos evaluar cómo puede variar el valor de la respuesta (en este caso la recuperación de azúcares) en relación tanto a los efectos principales (Temperatura, tiempo, %Adsorbente, y Adsorbente) como los efectos derivados de la interacción de cada pareja de factores (AB, AC, AD, BD). Indicar también que los signos de los coeficientes de la ecuación indican la influencia de cada factor.

El término independiente en este caso 81,51 corresponde al valor medio de todas las respuestas, lo que generalmente corresponde también al valor esperable en el centro del dominio. Se concluye que en relación a los efectos principales, la recuperación de azúcares es mejor para valores bajos de temperatura y porcentaje de adsorbente.

En cuanto a los efectos de interacción, son de resaltar la influencia que muestran las combinaciones AB y BD, donde el efecto de un factor se ve influenciado por el valor o nivel del otro factor implicado. En la siguiente figura se muestra un ejemplo gráfico de dichas interacciones.



Figuras 19 y 20. Gráficas de la interacción entre A y B (temperatura y tiempo), y entre B y D (tipo de adsorbente y tiempo) en la recuperación de azúcares.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las gráficas anteriores podemos concluir que para obtener mayores recuperaciones de azúcares deberíamos trabajar a una temperatura baja, tiempos reducidos y con carbón activo como tipo de adsorbente.

5.4.2 Influencia de los factores estudiados sobre la concentración de ácido acético

En el caso de la reducción de ácido acético la ecuación modelo muestra cómo el tipo de adsorbente, seguido del porcentaje del mismo y el tiempo, son los factores más significativos, además de cómo influyen de manera negativa o positiva. El tipo de adsorbente que mejor resultados obtiene es el carbón activo.

Ecuación modelo:

$$\% \text{ Reducción acético} = 11,87 + 3,50A - 7,31B + 7,76C - 9,72D$$

5.4.3 Influencia de los factores estudiados sobre la concentración de ácido fórmico

La reducción que se consigue de ácido fórmico de acuerdo con la ecuación modelo multifactorial donde se reflejan las influencias más significativas es más importante con el aumento de temperatura y de concentración de catalizador utilizada. Por otra parte tiene una influencia negativa sobre su disminución el tiempo. En relación al adsorbente utilizado se obtienen mejores resultados con el carbón activo.

Ecuación modelo:

$$\% \text{ Reducción fórmico} = 34,53 + 14,77A - 2,19B + 9,30C - 6,80D + 7,27AB$$

En la Figura 21. Gráfica de la interacción entre A y B (temperatura y tiempo) en la reducción de fórmico. se muestra la interacción de la temperatura y el tiempo que resulta ser la más significativa dentro de los efectos combinados de los distintos factores.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

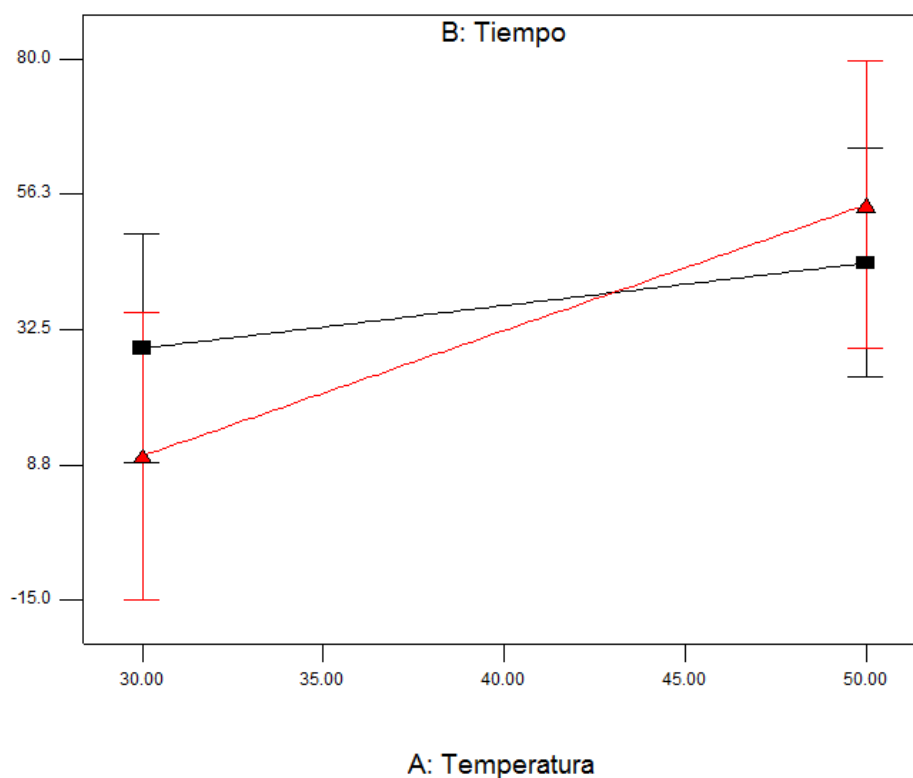


Figura 21. Gráfica de la interacción entre A y B (temperatura y tiempo) en la reducción de fórmico.

5.4.4 Influencia de los factores estudiados sobre la concentración de polifenoles totales

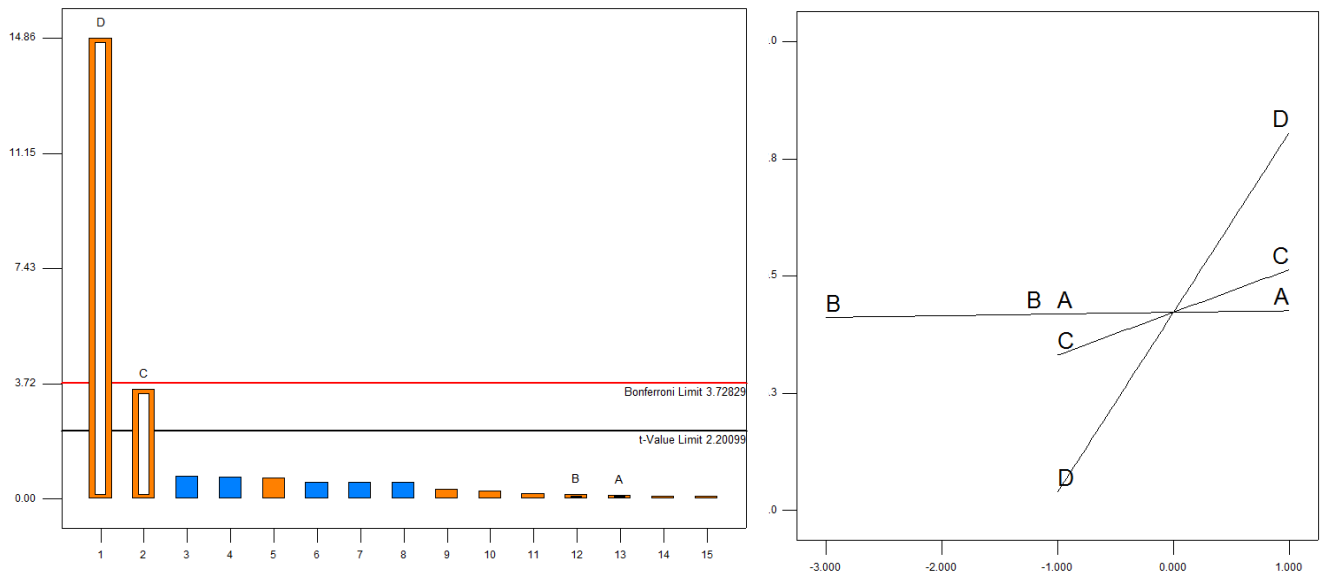
Para evaluar la influencia de los factores ensayados sobre la concentración de polifenoles totales se ha calculado el porcentaje de disminución de la concentración de éstos como respuesta. En el gráfico de Pareto que se presenta a continuación se muestra cómo sólo la influencia del tipo de adsorbente y su concentración son estadísticamente significativas al superar los test estadísticos tanto de la «t de Student» y «Bonferroni».

Tanto en la ecuación modelo como gráficamente, lo que se muestra a continuación, se observa la influencia positiva del nivel de adsorbente utilizado como la diferencia entre el uso de resina y de carbón activo, siendo para este último el factor más eficiente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ecuación modelo:

$$\% \text{ Reducción polifenoles} = 38,62 + 0,30A + 0,32B + 8,11C + 34,10D$$



Figuras 22 y 23. De izquierda a derecha, gráficas de Pareto y de perturbación dónde se muestra la repercusión del factor D frente a los demás.

6. CONCLUSIONES

- La hoja de olivo, puede ponerse en valor dentro del contexto de una biorrefinería.
- La etapa de hidrólisis de hemicelulosas suele tener asociado el mayor contenido en compuestos tóxicos para las etapas posteriores y es necesario su detoxificación.
- La adsorción puede ser una tecnología apropiada para la reducción de estos inhibidores si se consigue una buena regeneración para reducir costes.
- En lo particular se debe seguir trabajando en distintas opciones probando otros adsorbentes y otras condiciones como por ejemplo el pH del hidrolizado antes de la entrada a la depuración.
- El contenido en compuestos antioxidantes se debería separar e intentar revalorizarlos para su uso como compuestos bioactivos.
- El comportamiento en general del carbón activo frente a la mayoría de las respuestas evaluadas ha sido mejor que la resina, en relación a los demás factores estudiados depende de la respuesta analizada.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bellido Díez, Carolina, Gerardo González Benito, and M^a Teresa García Cubero. 2013. *OBTENCIÓN DE BIOETANOL 2G A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO. FERMENTACIÓN CONJUNTA DE LOS PENTA Y HEXA CARBOHIDRATOS CON Pichia Stipitis*.
- Chandel, Anuj K, Silvio Silvério, and Om V Singh. 2011. "Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production."
- Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, and Junta de Andalucía. 2015. "Aforo de Olivar En Andalucía Junta de Andalucía." : 18.
- Damien, Alain. 2010. *La Biomasa : Fundamentos, Tecnologías Y Aplicaciones*. A. Madrid Vicente.
- Ferré, Joan. 2002. "El Diseño Factorial Completo 2 2." : 1–10. <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/disfact.pdf>.
- García, Eva, Isabel Fernández, and Ana Fuentes. 2015. "Determinación de Polifenoles Totales Por El Método de Folin- Ciocalteu." *Universitat politécnica de Valencia* 1: 2–8.
- Gracia, C. 2004. "Bioetanol." *Biocombustibles: ¿Energía o alimento?:* 77–103. http://www.ub.edu/ecologia/carlos.gracia/PublicacionesPDF/Capítulo_4_Bioetanol.pdf.
- IDAE, and Rico. Javier. 2007. 2 "Manuales de Energías Renovables" *Energía de La Biomasa*. Madrid: Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía. http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_10374_Energia_de_la_biomasa_07_28e17c9c.pdf (October 11, 2017).
- Jönsson, Leif J, Björn Aliksson, and Nils-Olof Nilvebrant. 2013. "Bioconversion of Lignocellulose: Inhibitors and Detoxification." *Biotechnology for Biofuels* 6(1): 16. <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-6-16>.
- Larsson, Simona, Anders Reimann, Nils-Olof Nilvebrant, and Leif J. Jönsson. 1999. "Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77(1–3): 91–104.
- Lin, Yan, and Shuzo Tanaka. 2006. "Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects." *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(6): 627–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16331454> (October 19, 2017).
- Mondaray Laguna, Javier, Dña. M^a Inmaculada Romero Pulido, and D. Juan Carlos López Linares. 2016. "CONVERSIÓN BIOQUÍMICA DE LAS HOJAS DE ALMAZARA PARA PRODUCCIÓN DE ETANOL COMBUSTIBLE: PRETRATAMIENTO DE DESLIGNIFICACIÓN." : 102.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Palmqvist, Eva, and Bärbel Hahn-Hägerdal. 2000a. "Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. I: Inhibition and Detoxification." *Bioresource Technology* 74(1): 17–24.
- . 2000b. "Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. II: Inhibitors and Mechanisms of Inhibition." *Bioresource Technology* 74(1): 25–33.
- Pandey, Ashok., Christian. Larroche, Steven. Cricke, and Claude-Gilles. Dussap. 2011. *Biofuels : Alternative Feedstocks and Conversion Processes*. Academic Press.
- Romero-García, J. M. et al. 2014. "Biorefinery Based on Olive Biomass. State of the Art and Future Trends." *Bioresource Technology* 159: 421–32.