

Obtención de agentes antioxidantes a partir del alpeorujo para uso en la industria alimentaria.

Trabajo experimental calificado con Matrícula de Honor

# Índice

Resumen.....	6
1. Introducción .....	7
1.1 Los compuestos fenólicos .....	8
1.2 El alpeorujo .....	10
1.3 Los biosurfactantes .....	11
2. Objetivos .....	12
3. Materiales y métodos .....	13
3.1 Alpeorujo.....	13
3.2 Reactivos y solventes .....	13
3.3 Proceso de desgrasado del alpeorujo .....	14
3.4 Proceso de obtención del extracto fenólico .....	14
3.5 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales .....	16
3.6 Determinación de la actividad antioxidante en el extracto fenólico .....	17
3.6.1 Determinación de la actividad de eliminación de radicales libres (DPPH).....	17
3.6.2 Método del $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	17
3.7 Proceso de producción de biosurfactante .....	18
3.8 Evaluación de la actividad antioxidante en el medio de fermentación .....	20
3.9 Evaluación de la actividad enzimática de la enzima manganeso peroxidase en el medio de fermentación.....	20
3.10 Tensión superficial.....	21
3.11 Análisis estadístico .....	21
4. Resultados y discusión .....	22
4.1 Contenido de aceite en el alpeorujo .....	22
4.2 Rendimiento del proceso de extracción de los compuestos fenólicos .....	22
4.3 Análisis de los compuestos fenólicos totales presentes en los extractos.....	24
4.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos fenólicos .....	25
4.5 Proceso fermentativo.....	27
5. Conclusiones.....	29
6. Referencias bibliográficas .....	30
Anexos .....	33

## Agradecimientos

Quiero hacer especialmente mención a la Dra. Dña. Michel Debiasi Alberton por todo este tiempo dedicado como cotutora, y esfuerzo para enseñarme a manejar en un laboratorio y ayudarme a realizar la mayor parte de mi Trabajo Fin de Grado y a D. Luis Antonio Lourenço, por todos los conocimientos que me ha dado para llevar la parte de fermentación y el tiempo dedicado. Gracias a ellos he podido realizar mi parte experimental.

A la Dra. Dña Deisi Altmajer Vaz por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este tema propuesto y por toda su atención y colaboración que ha tenido como Tutora de este trabajo.

A todos los compañeros del Laboratorio de Tecnología de Emulsiones del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias, ya que la labor se hace más amena y es un placer conocer a gente tan competente en su trabajo.

Por fin, me gustaría agradecer la ayuda financiera concedida por la Junta de Andalucía a través del Proyecto “Desarrollo de estrategias para la valorización de biomasa residual oleosa: producción y caracterización de agentes de superficie altamente biodegradables y con potenciales aplicaciones (P10-TEP-6550)”.

## Resumen

El presente Trabajo Fin de Grado se centra en la valorización del alpeorujó mediante la obtención de compuestos fenólicos y biosurfactantes. Para ello se ha evaluado en primer lugar el uso de diferentes solventes en el proceso de extracción sólido-líquido de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujó. A continuación, los extractos fenólicos obtenidos han sido caracterizados mediante las siguientes medidas: rendimiento del extracto (g de extracto/g de alpeorujó seco), contenido de fenoles totales (mg de fenoles/g de extracto seco) y actividad antioxidante. Para fines de comparación, las mismas determinaciones han sido realizadas con un alpeorujó sometido a un proceso previo de remoción del aceite residual (“alpeorujó desgrasado”). Por último, se han realizados ensayos de producción de biosurfactantes mediante fermentación sumergida en los que el alpeorujó ha sido utilizado como fuente de carbono. Los resultados experimentales ponen en evidencia los elevados valores de actividad antioxidante de los extractos fenólicos, superiores incluso a la del butilhidroxitoulúeno (BHT). De acuerdo con los resultados obtenidos por el método DPPH, la actividad antioxidante de los extractos está correlacionada con la presencia de compuestos fenólicos extraídos a partir del alpeorujó. Excepto para el disolvente acetato de etilo, no se observan diferencias significativas entre los valores de actividad antioxidante de los extractos obtenidos con el alpeorujó graso y el sometido previamente a un proceso de extracción del aceite residual. En lo que se refiere a los ensayos fermentativos, de entre todas las condiciones evaluadas, solamente existen evidencias claras de producción de biosurfactantes mediante *Trametes versicolor* (TS < 30 mN/m) los experimentos realizados con alpeorujó graso en ausencia de agitación. Por último, mediante análisis del caldo de fermentación, se ha verificado la producción de la enzima manganeso peroxidasa, que a su vez actúa degradando los compuestos fenólicos procedentes del alpeorujó y reduciendo su concentración en el caldo de fermentación.

## 1. Introducción

España es el primer productor mundial de aceite oliva, presentando una superficie de olivar de 2.5 millones de hectáreas. Del total de la producción, un 96 % de superficie del olivar son aceitunas que van para la almazara y el 4% restantes se utilizan para aceituna de mesa (MAGRAMA, 2012). Según datos de la Agencia de Información y Control Alimentario (AICA, 2015) España produjo 1.781.500 toneladas de aceite de oliva en la campaña del año 2013/2014. A nivel mundial, según el Consejo Oleícola Internacional (COI), se obtuvieron 3 millones de toneladas de aceite en el periodo de cosecha 2013-2014 (Chowdhury et al., 2015).

En el proceso de producción tradicional del aceite de oliva conocido como “proceso de tres fases”, las almazaras generan grandes cantidades de aguas residuales (alpechín) que son altamente contaminantes. Por esta razón, a principios de los años 90, se ha introducido en el mercado el sistema de extracción de dos fases (Figura 1), en los que el único subproducto generado (el alpeorujo) consiste en la mezcla de orujo y el agua de vegetación de la propia aceituna. Actualmente, el sistema de dos fases se encuentra plenamente implantado en España (lo utilizan el 90% de las almazaras), ya que se consiguen importantes ahorros en cuanto al consumo de agua y energía, además de la disminución del volumen (y toxicidad) de las aguas residuales producidas. Asimismo, el alpeorujo es comúnmente sometido a un segundo proceso de extracción, con la finalidad de eliminar el aceite residual presente en el mismo (Albuquerque et al., 2014). Se estima que cada 1000 kg de olivas, se obtienen 200 kg de aceite y 800 kg de alpeorujo (Albuquerque et al., 2004); de allí la importancia de buscar formas de valorizar este importante subproducto.

El alpeorujo es considerado un subproducto rico en compuestos fenólicos: solamente un 2% de los fenólicos de la oliva son transferidos al aceite (Rodis et al, 2002). No obstante, su contenido de compuestos fenólicos depende del cultivo, de la variedad de aceituna, y de los tratamientos de extracción. Los principales compuestos fenólicos tanto en el alpeorujo, como el alpechín y el orujo, son: los ácidos fenólicos (destacan el ácido cafeico y el ácido vanílico); flavonoides (son los que se encuentran en mayor proporción y destaca la oleuropeina, verbascosida y el hidroxitirosol); y los secoiridoides (están la luteolina, luteolin 7-o-glucósido, y el rutin).

A continuación, teniendo en cuenta la temática del presente TFG, se presentan los aspectos generales relacionados con los compuestos fenólicos y el alpeorujo (tales como: definición, clasificación, composición, entre otros).

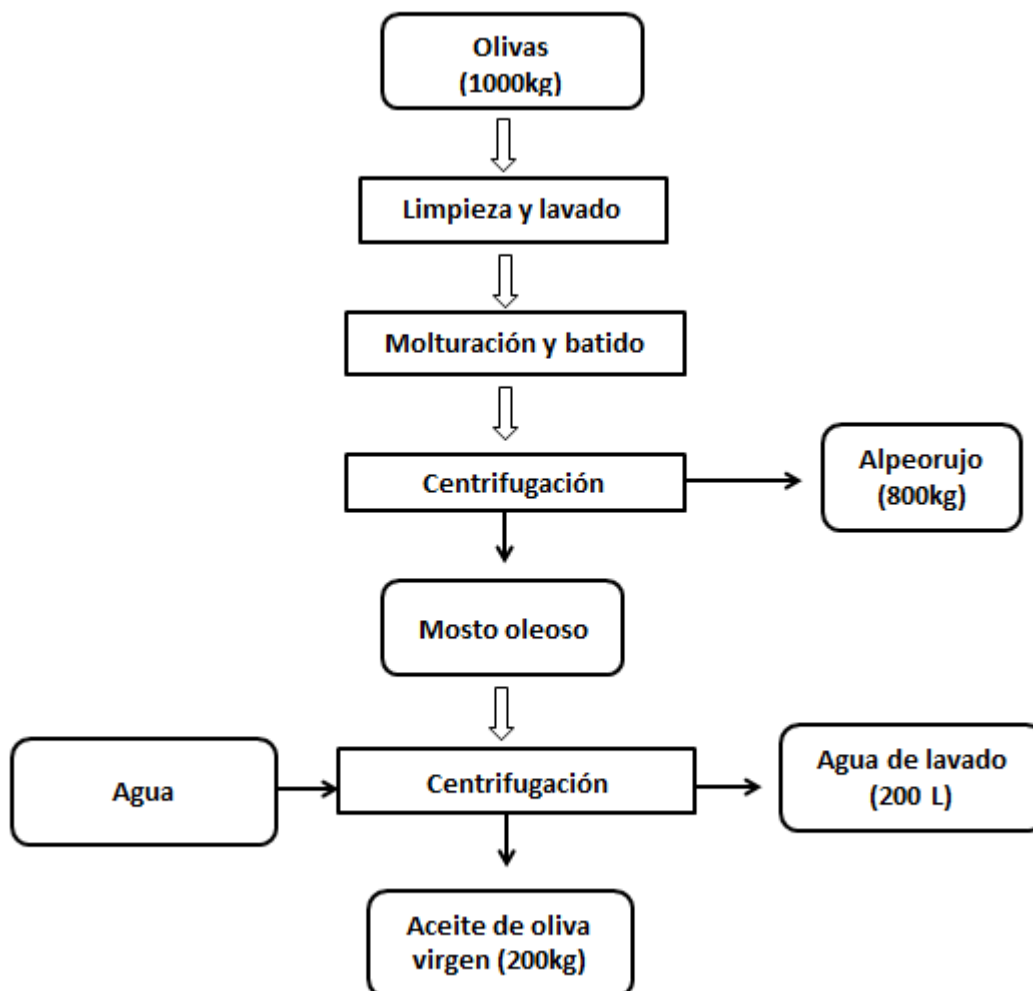


Figura 1 - Diagrama de bloques del proceso de obtención de aceite de oliva de dos fases (Albuquerque et al., 2004).

### 1.1 Los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (CF) son sustancias orgánicas que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo y una cadena lateral funcional. Los compuestos fenólicos pueden ser moléculas simples, como lo son los ácidos fenólicos y los taninos, y estas moléculas simples pueden conjugarse con varias moléculas como azúcares (mono, di, u oligosacáridos), ácidos orgánicos, lípidos o con otros fenoles dando lugar a moléculas más complejas. Son moléculas muy solubles en agua, y aunque su clasificación puede ser compleja, pueden ser agrupados en cuanto al número de átomos de carbono que contiene, según se indica en la Tabla 1. De acuerdo con Crozier et al. (2009), los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos mayoritario (Figura 2).

En la naturaleza, los CF no se encuentran normalmente disponibles en su forma libre, sino que aparecen conjugados con ácidos orgánicos o azúcares unidos a grupos hidroxilo (Bravo, 1998). De entre los azúcares se destacan la ramnosa, la glucosa, la galactosa, arabinosa, xilosa, entre otros.

Tabla 1 - Clasificación de los compuestos fenólicos según Harborne (1989).

Numero de átomos de carbono	Estructura	Clasificación
6	$C_6$	Fenoles simples; benzoquinonas
7	$C_6 - C_1$	Ácidos nezoicos
8	$C_6 - C_2$	Ácidos fenilacéticos; Acetofenonas
9	$C_6 - C_3$	Ácidos hidroxicinámicos Polipropenes; Cumarinas
10	$C_6 - C_4$	Naftoquinonas
13	$C_6 - C_1 - C_6$	Xantonas
14	$C_6 - C_2 - C_6$	Estilbenos; Antraquinonas
15	$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides; Isoflavonoides
18	$(C_6 - C_2)_2$	Lignanos; Neolignanos
30	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Biflavonoides
N	$(C_6)_n$ $(C_6 - C_3)_n$ $(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Catecolmelaninas Ligninas Taninos condensados

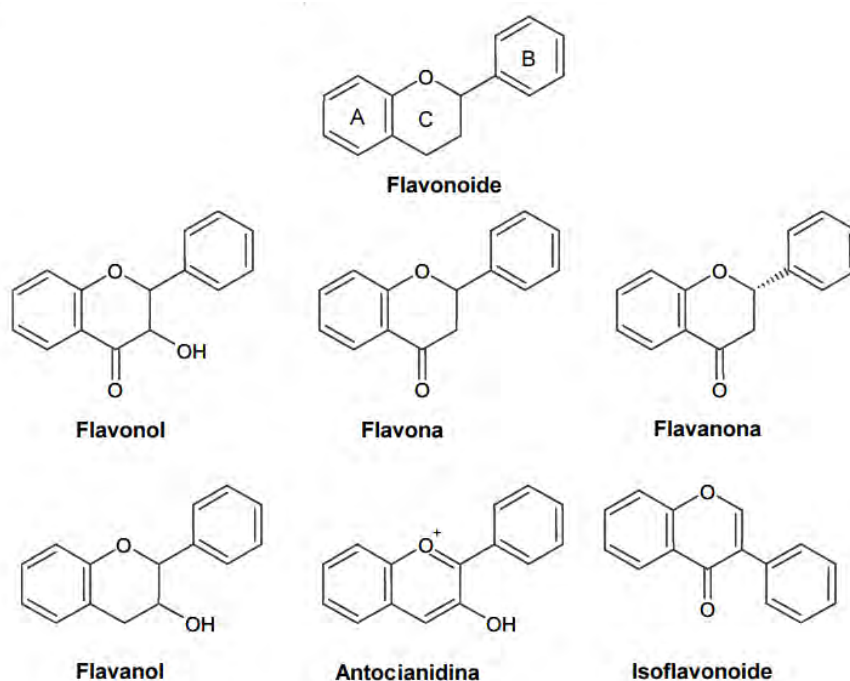


Figura 2 - Estructura química básica de los flavonoides y sus principales subgrupos.

Los CF constituyen un grupo de sustancias ampliamente repartidas por el reino vegetal, tal y como confirman las más de 8,000 estructuras identificadas en la actualidad. Están muy presentes en frutas y verduras, ejerciendo un papel importante sobre las propiedades organolépticas de los mismos. Asimismo, otras funciones importantes de los CF son las siguientes: son los responsables del color brillante de muchas frutas y verduras, actúan sobre los radicales libres que se produce en presencia de luz UV, contacto con el O<sub>2</sub>, con metales, previniendo su deterioro (Dermeche et al., 2013).

Debido al gran número de actividades biológicas que desarrollan, también aportan efectos beneficiosos para la salud, tales como: acción antioxidante, antiinflamatoria, cardioprotectora, anti-cancerígena, neuroprotectora, entre otras. De entre los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos, se destaca la captación de radicales libres, inhibición de la actividad enzimática, impacto en el ciclo celular.

## **1.2 El alpeorujo**

El alpeorujo es el principal subproducto generado en el proceso de obtención de aceite de oliva mediante el sistema de extracción de dos fases. El alpeorujo es un residuo semi-sólido constituido por el mesocarpio, huesos y piel de la oliva, además del agua de vegetación y una cierta cantidad de aceite residual. La materia orgánica presente se compone básicamente de lignina, hemicelulosa y celulosa, y representan el 39%, 30% y 23% del total de la materia orgánica de este residuo (tesis). Otros componentes de la materia orgánica son las grasas (11%), proteínas (7%), carbohidratos solubles (12%, en base seca) y CF (1.4%, en base seca) (Morillo et al, 2009).

El alpeorujo es un subproducto muy rico en compuestos fenólicos, tales como el hidroxitiroso, tirosol y oleuropeína (Fernández Bolaños et al., 2002). Paradójicamente, la riqueza en compuestos fenólicos del alpeorujo es una de las principales causas de su poder contaminante. En este sentido, varios estudios están siendo llevados a cabo con el intuito de recuperar dichos compuestos (Obied et al, 2005; Fernández Bolaños et al, 2002).

Las técnicas de obtención de los extractos fenólicos ricos en compuestos antioxidantes pueden ser agrupadas en dos grandes grupos: extracción con disolventes orgánicos y extracción en fase sólida (SPE). El tipo del disolvente empleado se constituye en uno de los principales factores que afectan la eficacia de dichos procesos. Además, debido a la elevada solubilidad en agua, los solventes orgánicos no se utilizan puros, sino mezclados en agua. De acuerdo con Escribano-Bailón et al. (2003), en general, mezclas hidroalcohólicas del 70-80% permiten una buena extracción de los derivados hidroxicinámicos, flavonas, flavonoles y catequinas a partir de muestras de fruta y legumbres. Otros factores que influyen en el proceso son: la temperatura, el número de pasos de extracción y el volumen de disolvente, el tamaño de partícula y su forma, entre otros.

Los métodos tradicionales para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos se basan en técnicas espectrofotométricas (como es caso del método de Folin-Ciocalteu), y técnicas cromatográficas. Asimismo, en la actualidad se están investigando otros sistemas de extracción, tales como son la extracción supercrítica y el



uso de microondas. Entre los diferentes solventes usados en la extracción de los CF del alpeorajo, se destacan: metanol (Obied et al., 2005), etanol (Amro et al., 2002), acetona (Hammerstone et al., 1999), acetato de etilo (Lesage-Meensen et al., 2001), n-butanol (Capasso et al., 1992) y n-propanol (Vazquez Roncero et al., 1974).

### **1.3 Los biosurfactantes**

El término “biosurfactante” es comúnmente empleado para referirse a los agentes de superficie producidos por microorganismos (Banat et al., 2010), aunque algunos autores también incluyen en esta clasificación los surfactantes de origen vegetal y animal (Al-Wahaibi et al., 2014).

La característica principal de la estructura molecular de los biosurfactantes es su naturaleza anfifílica, es decir, la coexistencia de una porción hidrófila (constituida por mono-, oligo- polisacáridos, aminoácidos, péptidos, carboxilatos o grupos fosfatos) y una porción hidrófoba, constituida por (hidroxi)-ácidos grasos o alcoholes grasos (Lang y Wullbrandt, 1999). En base a sus estructuras químicas, los biosurfactantes son clasificados como glicopolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, fosfolípidos, ácidos grasos, surfactantes poliméricos y particulados (Desai y Banat, 1997).

Los biosurfactantes presentan una serie de ventajas cuando son comparados a los tensioactivos sintéticos, tales como: gran variedad de estructuras químicas, elevada biodegradabilidad y baja toxicidad, estabilidad frente a condiciones extremas de operación (pH, temperatura, concentración de sales), excelentes propiedades interfaciales, entre otras (Desai y Banat, 1997). Por otra parte, sus elevados costes de producción vienen limitando su producción a gran escala. Por esta razón, el uso de fuentes residuales es de gran interés en la actualidad.

En lo que se refiere a las propiedades de los biosurfactantes, se destacan las siguientes: actividad superficial, humectación, espumación, emulsificación, solubilización, detergencia, entre otras. En cuanto a las aplicaciones de los biosurfactantes, estos son especialmente adecuados para aplicaciones relacionadas con las áreas de alimentos, farmacia y medioambiental.

## 2. Objetivos

Los principales objetivos del presente Trabajo Fin de Grado son los siguientes:

- Estudiar el proceso de extracción de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujo mediante el uso de diferentes solventes;
- Evaluar la concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos;
- Comparar la concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante del denominado “alpeorujo graso”, usado tal cual se recibe de la almazara, con los del “alpeorujo desgrasado”, al que se le ha extraído el aceite residual con n-hexano;
- Estudiar la producción de biosurfactantes a partir del alpeorujo mediante *Trametes versicolor* CECT 20817, así como la presencia de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del caldo de fermentación.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Alpeorujos

El alpeorujos utilizado en el presente trabajo ha sido gentilmente suministrado por la Oleícola El Tejar Nuestra Señora De Araceli SCL (Córdoba, España). Las principales características de dicho subproducto se indican en la Tabla 2. El alpeorujos ha sido sometido a un tratamiento previo de secado en estufa a 60°C hasta peso constante, y ha sido denominado en este trabajo como “alpeorujos graso” (AG), ya que contiene una cierta cantidad residual de aceite.

Tabla 2- Composición del “alpeorujos graso” suministrado por la Cooperativa El Tejar.

Humedad (%)		64,37 ± 0,67
Proteína total (%)		7,1 ± 0,4
Análisis elemental (%)	C	48,15
	N	1,18
	H	7,14

#### 3.2 Reactivos y solventes

En la Tabla 3 se resumen los principales reactivos y solventes utilizados en este trabajo, así como su pureza y procedencia.

Tabla 3 - Principales reactivos y solventes utilizados.

Reactivo/disolvente	Pureza/concentración	Casa comercial
n-Hexano	95%	Panreac
Acetato de etilo	99,7%	Panreac
Metanol	99,8%	AB –SCAN
Etanol absoluto	---	Panreac
Ácido nítrico	82%	Panreac
Solución de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> saturada	99,5	Panreac
Reactivo de Folin Ciocalteu	2M	Panreac
Cloroformo (CHCl <sub>3</sub> )	99%	Panreac
Ácido linoleico	60 - 74%	Siga Aldrich
Tween-80	---	Siga Aldrich
B-caroteno	97,0%	Sigma
Ácido gálico	> 97,5	Sigma
Disolución de agua oxigenada	0,01 M 30%	Panreac
DPPH	---	Sigma Aldrich
Nitrato de amonio	99%	Panreac
Potasio di-hidrato fosfato	99%	Panreac
Magnesio sulfato	99%	Panreac

Cont. Tabla 3

Reactivo/disolvente	Pureza/concentración	Casa comercial
Cloruro de potasio	99,5%	Panreac
Hierro II Sulfato	98%	Panreac
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	> 99,5 %	Panreac
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	99%	Panreac
Extracto de levadura	---	Cultimed
Peptona	---	Cultimed
Agar de dextrosa de patata	---	Kasvi
Lactato de sodio	99%	Sigma-Aldrich
Manganeso II sulfato (1- hidrato)	> 90 %	Panreac
Tampón succinato de sodio	98%	Fluka
Albumina de huevo	62 - 88 %	Sigma
Rojo fenol	---	Sigma- Aldrich
NaOH	---	Panreac

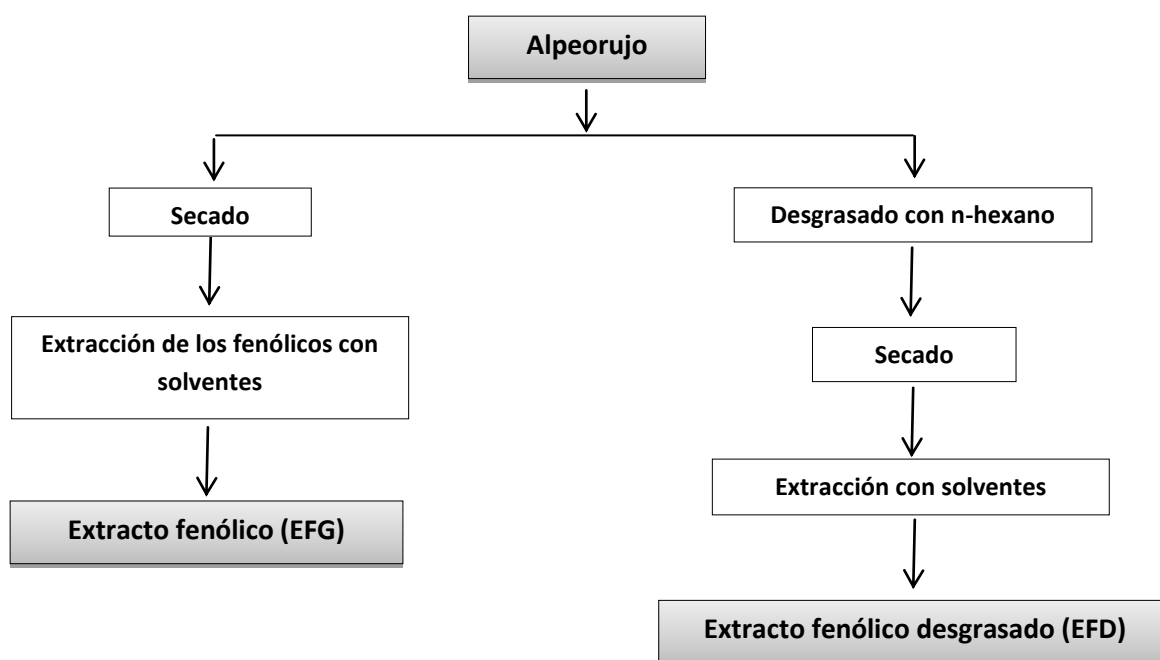
### 3.3 Proceso de desgrasado del alpeorujó

La fracción lipídica presente en el alpeorujó ha sido extraída mediante contacto con n-hexano. Para ello, se ha añadido 25 g de alpeorujó previamente seco en estufa y 75 ml de hexano (proporción 1:3 p/v) a un Erlenmeyer; y la mezcla resultante ha sido agitada a 130 rpm en un agitador orbital durante 1h. A continuación, utilizando papel de filtro no. 4, la mezcla ha sido filtrada y sometida a un proceso de evaporación del disolvente en rotavapor. Los sólidos retenidos en el filtro, denominado "alpeorujó desgrasado seco", han sido mantenidos a temperatura ambiente durante 24 horas. El contenido de aceite del alpeorujó obtenido tras la evaporación del disolvente ha sido determinado por gravimetría tras su mantenimiento a temperatura ambiente durante 24 horas.

### 3.4 Proceso de obtención del extracto fenólico

En la Figura 3 se resumen los principales pasos seguidos para la obtención del extracto fenólico. Tal y como se indica, se han obtenido dos extractos: (i) a partir del alpeorujó original,

suministrado por la cooperativa (EFG), y (ii) extracto fenólico desgrasado (EFD) obtenido a partir del alpeorujo sometido a un proceso de extracción de la fracción lipídica.



**Figura 3 – Esquema de los procedimientos seguidos para la obtención del extracto fenólico graso (EFG) y desgrasado (EFD).**

Independientemente de los tratamientos aplicados al alpeorujo, se ha adoptado el siguiente procedimiento experimental:

- (a) Primeramente, 5 g de alpeorujo seco y 25 ml de solvente (1:5 p/v, Tabla 4) han sido introducidos en un matraz enlermeyer de 100 ml;
- (b) A continuación, se ha llevado a cabo la extracción de los compuestos fenólicos, manteniendo el contenido del erlenmeyer a temperatura ambiente durante 1 h bajo agitación (130 rpm, en un agitador orbital);
- (c) A continuación, la mezcla resultante ha sido filtrada en papel de filtro no 4, siendo el filtrado colectado en un matraz redondo de 250 ml. El residuo sólido recogido en el papel filtro ha sido descartado;
- (d) Para finalizar, en un rotavapor, se ha evaporado el disolvente (o mezcla de disolventes) presentes en el filtrado. El producto así obtenido ha sido denominado extracto fenólico.

**Tabla 4 - Solventes empleados para la extracción de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujo.**

Solvente/mesclas	Proporción	Preparación
Acetato de etilo	100%	Uso directo (sin tratamiento previo).
Metanol	100%	Uso directo (sin tratamiento previo).
Etanol absoluto	100%	Uso directo (sin tratamiento previo).
Mezcla de metanol / agua destilada	1:1 v/v	Mezcla de 40ml de metanol y 40 ml de agua destilada
Mezcla metanol / agua destilada (pH 2)	1:1 v/v	Mezcla de 40ml de metanol y 40 ml de agua destilada. El metanol ha sido previamente acidificado a pH 2 con ácido nítrico 0.1M
Mezcla etanol / agua destilada	1:1 v/v	Mezcla de 40 ml de etanol absoluto y 40 ml de agua destilada.
Mezcla etanol / agua destilada (pH 2)	1:1 v/v	Mezcla de 40 ml de etanol absoluto y 40 ml de agua destilada. El etanol ha sido previamente acidificado a pH 2 con ácido nítrico 0.1M

Una vez obtenidos los extractos fenólicos, estos han sido conservados a 4°C para la posterior determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante.

### 3.5 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales presentes en el extracto fenólico, así como en el caldo de fermentación (“sobrenadante libre de células”), se ha empleado el método de Folin-Ciocalteu descrito por Anagnostopoulou et al. (2006).

Para ello, se preparó una solución a partir del extracto fenólico (denominada “Dilución 1”), diluyéndose 10 mg del extracto fenólico (ver apartado 3.4) con 10 ml de agua destilada (1:1 p/v). A continuación, 0.5 ml de la Dilución 1 se le añadió 5ml de agua destilada; 0,25 ml del reactivo Folin-Ciocalteu y 1 ml de la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado. La mezcla resultante fue mantenida durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, se determinó la absorbancia de muestra a 725 nm usando el espectrofotómetro de la casa Cary 100 Bio (UV- Visible Spectrophotometer).

La concentración de fenólicos totales fue calculada a partir de una recta patrón construida con diferentes concentraciones de ácido gálico, siguiéndose el procedimiento anteriormente descrito. El contenido de fenoles totales en la muestra fue expresado en términos de miligramos de ácido gálico por gramo de extracto seco.

Para la determinación del contenido de fenoles en el medio de fermentación, se siguió el mismo procedimiento, sustituyendo las soluciones del extracto por el sobrenadante de la centrifugación.

### **3.6 Determinación de la actividad antioxidante en el extracto fenólico**

La actividad antioxidante del extracto fenólico ha sido evaluada mediante dos métodos: (a) método del DPPH y (b) método descrito por Matook Saif Mokbel et al. (2006).

#### **3.6.1 Determinación de la actividad de eliminación de radicales libres (DPPH)**

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos fenólicos mediante el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) se ha seguido el siguiente procedimiento experimental:

- Inicialmente, se preparó una solución del DPPH del 0.004% m/v, añadiendo 4.0 mg de DPPH en 100 ml de metanol.
- A continuación, se añadió 1 ml de la Dilución 1 (descrita en el apartado 3.5) y 2ml de DPPH del 0.004%
- La mezcla resultante se dejó reposar durante treinta minutos en oscuridad y, finalmente se mide la absorbancia a 517nm.
- Los resultados de actividad enzimática fueron expresados en porcentaje de inhibición (I, %), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I (\%) = \frac{Absm - Absb}{AbsDPPH} \times 100$$

Donde: Absm es la absorbancia de la muestra; Absb es la absorbancia del blanco y AbsDPPH es la absorbancia del control negativo.

Para fines de control, se realiza un blanco sustituyendo la muestra por metanol, añadiéndose 1 ml de Dilución 1 y 2 ml de metanol (sin DPPH). El control negativo se obtiene añadiéndose 1 ml de metanol y 2ml de DPPH del 0.004% (sin la adición de la Dilución 1). Finalmente, para el control positivo, se añaden 0.5 ml de BHT (en lugar de la muestra) y 1 ml de DPPH del 0.004%.

#### **3.6.2 Método del $\beta$ -caroteno/ácido linoleico**

La evaluación de actividad antioxidante de los extractos fenólicos también ha sido realizada mediante el método del  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Para ello, primeramente, se ha preparado una emulsión siguiéndose los siguientes pasos:

- (a) 3.0 mg de  $\beta$ -caroteno, 1.0 mililitro de cloroformo, tres gotas de ácido linoleico (45 mg) y 6 gotas de Tween-80 (250 mg) han sido añadidos a un matraz esférico;
- (b) La mezcla resultante ha sido evaporada en rotavapor durante 4 minutos a 50°C;
- (c) A continuación, se añadieron (a la vez que se agita), 6.0 ml de agua destilada al matraz.
- (d) Para finalizar, el contenido del matraz esférico ha sido traspasado a un matraz aforado de 100ml, y se ha enrasado con una disolución de agua oxigenada 0.01 M.

Una vez obtenida la emulsión, se han tomado 0.2 ml de la Dilución 1 (descrita en el apartado 3.5) y se han mezclado con 4 ml de la referida emulsión. Las diluciones así preparadas han sido mantenidas en baño maría a 50°C, y a intervalos de tiempo predefinidos, se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 470 nm ( $Abs_{470nm}$ ). Los intervalos de tiempo considerados fueron: 0, 1, 2 y 3 h, cuando se ha verificado visualmente la pérdida del color del  $\beta$ -caroteno. Un control negativo ha sido realizado con una disolución preparada a partir de 0.2 ml de agua destilada y 4 ml de emulsión; y como control positivo, se ha empleado la disolución formada por 0.2 ml de BHT mg/ml y 4 ml de emulsión.

La actividad antioxidante ha sido evaluada mediante la siguiente expresión:

$$AA = \left(1 - \frac{Abs_{mt0} - Abs_{mt}}{Abs_{ct0} - Abs_{ct}}\right) \times 100$$

Siendo  $Abs_{mt0}$  y  $Abs_{ct0}$  los valores de absorbancia de la muestra y del control negativo a tiempo cero, respectivamente, y  $Abs_{mt}$  y  $Abs_{ct}$ , los valores de absorbancia de la muestra y la absorbancia del control negativo a las 3h respectivamente.

### 3.7 Proceso de producción de biosurfactante

En este trabajo se ha evaluado la posibilidad de utilizar el alpeorajo desgrasado (y con contenido fenólico reducido, AD) como fuente de carbono para la producción de biosurfactantes mediante *Trametes versicolor* CECT 20817 (Colección Española de Cultivos Tipo). Adicionalmente, para fines de comparación, los mismos ensayos han sido realizados con el alpeorajo graso (AG), tal y como ha sido suministrado por la Cooperativa. En ambos casos, el efecto de la agitación en el proceso ha sido evaluado a dos niveles: 0 y 150 rpm. Ensayos control han sido realizados, según se indica en la Tabla 5. En todos los casos, la duración de los ensayos ha sido de 10 días.

Los ensayos de producción de biosurfactante han sido realizados a 25°C en sistema discontinuo (Erlenmeyers de 250 mL de capacidad), usando el medio de cultivo indicado en la Tabla 6.



**Tabla 5 - Condiciones adoptadas en los ensayos fermentativos.**

Experimento	Alpeorujo	Inoculo	Agitación (rpm)	Numero de replicas
1	AG	3 plugs de 3,5 cm cada	0	3: R1, R2 y R3
2	AD	3 plugs de 3,5 cm cada	0	3: R1, R2 y R3
3	AG	3 plugs de 3,5 cm cada	150	3: R1, R2 y R3
4	AD	3 plugs de 3,5 cm cada	150	3: R1, R2 y R3
Control 1	AD	0	0	1: R1
Control 2	AG	0	0	1: R1
Control 3	---	3 plugs de 3,5 cm cada	0	1: R1

**Tabla 6 - Composición del medio de cultivo empleado en los tests de producción de biosurfactantes.**

Componente	Concentración (g/L)
NH <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	0,724
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0
KCl	0,5
Extracto de levadura	0,5
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,001
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,0028
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,033
Peptona	10
Alpeorujo	2

Para preparar el medio de cultivo utilizado en la fermentación, siguió el siguiente procedimiento:

- Una vez pesados los componentes indicados en la Tabla 6 e introducidos a un matraz, se añade agua destilada y se agita hasta la completa disolución;
- A continuación, se traspasa 100 ml de dicho medio a matraces Erlenmeyers y se tapan los mismos con algodón. Los erlenmeyers se llevan a autoclave y se mantienen a 121°C durante 15 minutos.
- Los erlenmeyers son dejados enfriar en campana de flujo laminar bajo luz UV.

Una vez que los erlenmeyers con los medios de cultivo están atemperados se realiza la siembra a partir de placas Petri colonizadas con el hongo (ver Anexo 1), tomando los siguientes cuidados: antes de sembrar hay que sacar la placa con el inóculo para dejar que se atempere, y

cuando se siembra siempre lavar las manos con alcohol y trabajar bajo flujo laminar y cerca del mechero. Se inoculan en cada Enlermeyer tres plugs del hongo *Trametes versicolor* CECT 20817.

Una vez transcurridos diez días de fermentación, se mide el pH del caldo de fermentación, y se centrifuga el caldo durante 20 minutos, a 9000rpm y 4°C. La fracción sólida obtenida es utilizada para la determinación de concentración celular (secado en estufa a 60°C hasta peso constante), mientras que en el sobrenadante libre de células es utilizado para la medida de la tensión superficial (TS), concentración de compuestos fenólicos totales, y actividad antioxidante.

### **3.8 Evaluación de la actividad antioxidante en el medio de fermentación**

Para la evaluación de la actividad antioxidante del medio de fermentación se siguió el mismo proceso descrito en el apartado 3.6.1, sustituyéndose las soluciones del extracto de alpeorujos por el sobrenadante libre de células.

### **3.9 Evaluación de la actividad enzimática de la enzima manganeso peroxidase en el medio de fermentación**

La determinación de la actividad enzimática de la enzima manganeso peroxidase ha sido realizada de acuerdo con las indicaciones de Gil et al. (2012). Para ello, se han mezclados en un tubo de ensayo 1000 µL del sobrenadante libre de células (descrito en el apartado 3.7); 200 µL de lactato de sodio (250 mM), 400 µL de albumina de huevo (0,5% m/v); 100 µL de disolución MnSO<sub>4</sub> (2 mM); 200 µL fenol rojo (1 g/L) y 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM) en tampón succinato (pH 4). La reacción que se inicia con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se lleva a cabo durante 5 minutos a 30 °C. Transcurridos este tiempo, la misma es interrumpida la adición de 80 µL de NaOH 2 N. La absorbancia de las muestras se realiza al inicio (aproximadamente a los 10 segundos) y al final de la reacción (5 minutos) a 610nm. Una unidad de U se define como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 µmol de Mn<sup>2+</sup> a Mn<sup>3+</sup> en un minuto. Para mayores detalles, se presenta en la Tabla 7 cómo se han preparado las distintas disoluciones utilizadas en esta determinación.

**Tabla 7 – Procedimiento adoptado para la preparación de las disoluciones utilizadas en la medida de actividad enzimática.**

<b>Lactato de sodio 250 mM</b>	Disolver 2,8015 g de lactato de sodio en 100 ml de agua destilada.
<b>Sulfato de manganeso 2 mM</b>	Disolver 0,3380 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$ en 1000ml de agua destilada.
<b>Tampón succinato de sodio 20 mM (pH 4,0)</b>	Disolver 10 ml de la solución 0,2 M de NaOH y 25 ml de la solución 0,2 M de ácido succínico (23,6 g en 1 litro) y ajustar el volumen final de la disolución a 100ml con agua destilada.

### **3.10 Tensión superficial**

La tensión superficial (TS) del caldo de fermentación libre de células, así como sus diluciones 1:10 (TS-1) y 1:100 (TS-2), ha sido determinada a 25°C mediante el método de la lámina de Whilhemmy en un tensiómetro Kruss K-11. Todas las medidas han sido realizadas automáticamente un mínimo de 30 veces, y su media y desviación estándar calculadas por el propio equipo. Asimismo, se ha procedido la determinación de la tensión superficial de dos fermentaciones llevadas a cabo en condiciones idénticas (“replicas verdaderas”).

### **3.11 Análisis estadístico**

Los valores medios y la desviación estándar de las diferentes medidas realizadas (extracto fenólico, concentración de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad enzimática), han sido determinadas, y sus valores han utilizados en el test de Tukey para comparación de medias.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Contenido de aceite en el alpeorujo

En la Tabla 8 se resumen los valores medios de porcentaje de aceite en el alpeorujo. Como se indica, del total del alpeorujo del que se parte,  $4,46 \pm 0,15$  % corresponden a aceite.

**Tabla 8 - Contenido de aceite en el alpeorujo (base másica).**

Replica 1	Replica 2	Replica 3	Valor medio (%)	Desviación estándar (SD, %)
4,46	4,61	4,31	4,46	0,15

### 4.2 Rendimiento del proceso de extracción de los compuestos fenólicos

El proceso de extracción de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujo ha sido llevado a cabo a temperatura ambiente mediante contacto con diferentes disolventes (proporción 1:5 p/v alpeorujo/disolvente). La duración de dicho proceso ha sido de 1 hora. Dichas condiciones han sido fijadas con base en los resultados del trabajo de Lafka et al. (2011).

En la Tabla 9 se recogen los valores medios de rendimiento expresados en términos del porcentaje másico de extracto fenólico (R) respecto al alpeorujo graso (gramos de extracto por gramo de alpeorujo seco), así como sus desviaciones estándar (SD). Los datos completos se encuentran en el Anexo 2.

**Tabla 9 – Valores de rendimiento de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujo graso, expresados en términos de porcentaje másico de extracto fenólico (gramos de extracto/gramo de alpeorujo seco)**

Solvente	R <sub>AG</sub> (%)				
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Valor medio	SD
Acetato de etilo	5,71	6,16	4,58	5,50	0,50
Metanol	13,98	13,51	11,32	12,90	1,40
Metanol/agua	26,47	26,34	29,64	27,50	1,90
Metanol/agua pH2	22,14	26,02	22,33	23,50	2,20
Etanol	4,95	4,99	3,73	4,60	0,70
Etanol/agua	21,35	20,44	21,91	21,20	0,70
Etanol/agua pH 2	24,77	23,50	20,07	22,80	2,40

Tal y como se aprecia en la Tabla 9, para el caso del alpeorujo suministrado por Cooperativa y sometido exclusivamente a un proceso previo de secado, los valores medios de rendimiento (R<sub>AG</sub>) varían entre 4.6 y 27.5%, aproximadamente. Por otra parte, el porcentaje de

extracto fenólico obtenido con los diferentes disolventes y sus mezclas, decrece en el siguiente orden: Metanol/agua > Metanol/agua pH 2 > Etanol/agua pH 2 > Etanol/agua > Metanol > Acetato de etilo > Etanol. Asimismo, cabe notar que:

- (i) Independientemente del disolvente usado, los mayores valores de  $R_{AG}$  se obtienen mezclando disolventes orgánicos con agua;
- (ii) Aunque los datos indican que el etanol conduce a menores valores de  $R_{AG}$ , en la práctica habría que considerar aspectos de seguridad del etanol frente al del metanol.

En la Tabla 10 se presentan los valores medios de rendimiento del extracto fenólico desgrasado ( $R_{AD}$ ), así como sus desviaciones estándar (SD).

**Tabla 10 – Valores de rendimiento de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujo desgrasado, expresados en términos de porcentaje másico de extracto fenólico (gramos de extracto/gramo de alpeorujo seco)**

Solvente	$R_{AD}$ (%)				
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Valor medio	SD
Acetato de etilo	2,69	3,72	3,05	3,20	0,50
Metanol	15,59	16,34	15,04	15,70	0,70
Metanol/agua	26,08	27,20	---	26,60	0,80
Metanol/agua pH 2	24,80	21,20	17,79	21,30	3,50
Etanol	3,72	3,36	4,53	3,90	0,60
Etanol/agua	21,78	18,25	19,47	19,80	1,80
Etanol/agua pH 2	25,98	22,42	31,56	27,00	6,50

Los valores de eficiencia de extracción de los fenólicos presentes en el alpeorujo desgrasado son similares a los obtenidos con el alpeorujo graso, aunque ligeramente inferiores. Los mayores valores de  $R_{AG}$  se consiguen con mezclas etanol/agua pH 2 y metanol/agua. Además, el análisis estadístico de los datos indica que existen diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre ambas eficiencias de extracción.

Los resultados de este trabajo concuerdan en gran medida con lo ya publicado en literatura, en los cuales se comprueba que la adición de agua a solventes mejora la extracción de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujo. Lafka et al. (2011) también reportó la obtención de mejores resultados al usar metanol como disolvente, pero por otra parte, por cuestiones legales (Directivas 88/344/CEE y 94/52/CEE), el etanol se convierte en un candidato idóneo para substituir el metanol, ya que el metanol no se considera un disolvente de extracción apto de utilización en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes.

En lo que se refiere al proceso de extracción de compuestos fenólicos presentes en el alpeorujo, cabe destacar el trabajo realizado por Suarez Recio et al. (2009). Para maximizar la extracción de los polifenoles presentes en el alpeorujo, las muestras han sido centrifugadas a

21600 g a 15°C durante 10 minutos. De esta operación se han obtenido dos fracciones: (a) la fracción líquida, denominada “agua de vegetación” y (b) el residuo sólido. Los compuestos fenólicos presentes en cada fracción han sido sometidos a diferentes procedimientos de extracción.

### 4.3 Análisis de los compuestos fenólicos totales presentes en los extractos

La determinación del contenido fenólico total de los extractos fue realizada mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC) que se basa en la reducción del reactivo FC a óxidos azules de molibdeno y wolframio por acción de los compuestos fenólicos.

En la Tabla 11 se resumen los valores medios de concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto fenólico graso (EFG) y sus correspondientes desviaciones estándar (SD). La concentración de fenólicos ( $C_F$ ), se expresa en términos de miligramos de ácido gálico por gramo de extracto seco. Los valores de concentración de fenólicos en el EFG varían de 1,56 a 55,52 mg ácido gálico / g extracto fenólico. Los mayores valores han sido obtenidos con las mezclas de disolventes metanol/agua a pH 2 y etanol/agua a pH 2. Mediante test de comparación de medias, se observa que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los resultados obtenidos con metanol/agua a pH 2 y etanol/agua a pH 2. De igual modo, tampoco se han verificado diferencias significativas entre los valores de concentración de fenólicos al variar el pH de las distintas mezclas de disolventes; de este modo, se concluye que el efecto del pH en el proceso es despreciable.

**Tabla 11- Valores de la concentración de compuestos fenólicos totales en el extracto fenólico obtenido a partir del alpeorujó graso (EFG).**

Solvente	$C_F$ ( mg ácido gálico / g extracto fenólico)				
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Valor medio	SD
Acetato de etilo	2,44	--	1,14	1,56	0,77
Etanol	8,06	8,89	10,59	9,18	1,29
Metanol	41,54	51,24	42,20	45,00	5,42
Metanol/agua	47,46	48,54	47,67	47,89	0,58
Etanol/agua	49,79	49,54	49,93	49,75	0,20
Etanol/agua pH 2	56,49	51,40	48,73	52,20	3,94
Metanol/agua pH 2	52,17	61,09	53,30	55,52	4,85

En la Tabla 12 se muestran los valores medios de concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto fenólico desgrasado y sus desviaciones estándar. Los valores de concentración de compuestos fenólicos en el EFD son ligeramente superiores a los determinados en el extracto del alpeorujó graso. Por otra parte, excepto para los ensayos realizados con la mezcla metanol/agua, no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los resultados de EFG y EFD.

**Tabla 12 – Valores de la concentración de fenoles en el extracto fenólico del alpeorujo desgrasado (EFD).**

Solvente	C <sub>F</sub> ( mg ácido gálico / g extracto fenólico)				
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Valor médio	SD
Acetato de etilo	6,67	5,98	5,89	6,18	0,43
Etanol	16,03	16,40	18,69	17,04	1,44
Metanol	33,73	32,99	33,10	33,27	0,4
Metanol/agua pH 2	51,74	50,23	52,60	51,52	1,20
Etanol/agua pH 2	51,57	52,24	51,59	51,80	0,38
Etanol/agua	61,29	56,79	57,24	58,44	2,48
Metanol/agua	68,41	54,01	53,43	58,62	8,49

Los resultados presentados en la Tabla 12 concuerdan en gran medida con los datos reportados en literatura. Por ejemplo, Lafka et al. (2011) estudiaron el extracción de los compuestos fenólicos presentes el alpeorujo (con  $4,3 \pm 0,8$  % de lípidos) mediante el uso de los siguientes solventes: metanol, etanol, mezcla 1:1 v/v de etanol/agua, n-propanol, iso-propanol and acetato de etilo. De acuerdo con los autores, los mejores resultados han sido obtenidos con metanol ( $1,29 \pm 0,23$ %, expresados en términos de equivalentes de ácido cafeico), etanol ( $1,23 \pm 0,21$ %) e etanol-agua ( $1,19 \pm 0,32$  %). Por otra parte, la mayor cantidad de compuestos fenólicos ( $1,2$  % de compuestos fenólicos totales, m/m) ha sido obtenida a pH inferiores a 3.

#### 4.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos fenólicos

En el presente estudio la actividad antioxidante de los extractos fenólicos ha sido evaluada por dos métodos distintos: (a) método del radical libre 2,2- difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), y (b) método basado en la descoloración del  $\beta$ -caroteno. El primer método se basa en el cambio de color (de morado a amarillo) que ocurre cuando el radical DPPH se inhibe por la acción de antioxidantes. En el segundo, la descoloración del  $\beta$ -caroteno se debe al ataque del  $\beta$ -caroteno por los radicales libres producidos durante la oxidación del ácido linoleico; en presencia de antioxidante, habrá menor descoloración, lo que se podrá ser determinado por espectrometría (Ramalakshmi et al., 2008). En ambos casos, para fines de comparación, se ha empleado el BHT (butil hidroxitolueno) como compuesto antioxidante de referencia, ya que presenta un gran potencial inhibidor.

En la Tabla 13 se resumen los resultados de porcentaje de inhibición según en el método del radical libre DPPH (datos completos están disponibles en el Anexo2). Tal y como se aprecia, excepto para el caso de los extractos fenólicos obtenidos a partir del acetato de etilo, la capacidad de secuestro del radical libre DPPH de los extractos es superior a la del BHT. Por otra parte, se ha verificado la existencia de una correlación ( $67,70$  %) entre los datos de concentración de fenoles y el porcentaje de inhibición del DPPH, lo que indica que los compuestos fenólicos son los responsables por el secuestro del radical libre DPPH.

**Tabla 13 - Actividad captadora del radical DPPH de los diferentes extractos fenólicos (media  $\pm$  desviación estándar).**

Extracto fenólico obtenido a partir de:	Porcentaje de inhibición (I, %)	
	Alpeorujó graso	Alpeorujó desgrasado
Acetato de etilo	17,17 $\pm$ 2,33	42,44 $\pm$ 1,62
Metanol	89,49 $\pm$ 1,23	93,29 $\pm$ 0,08
Etanol	61,96 $\pm$ 0,09	79,22 $\pm$ 0,18
Metanol/agua	90,97 $\pm$ 0,65	93,30 $\pm$ 4,12
Etanol/agua	90,49 $\pm$ 0,24	89,81 $\pm$ 0,45
Metanol/água pH 2	84,04 $\pm$ 0,36	89,81 $\pm$ 0,18
Etanol/água pH 2	75,55 $\pm$ 3,86	90,29 $\pm$ 0,56
BHT	60,49 $\pm$ 1,89	

En la Tabla 14 se resumen los valores de actividad antioxidante de los extractos EFG y EFD analizados según en método que se basa en el test del  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico. En líneas generales se observa que:

- Los valores de actividad antioxidante en los extractos EFG y EFD son bajos comparados con los del BHT;
- Los mejores resultados de actividad antioxidante se obtienen con *mezclas de disolventes orgánicos y agua*, excepto en el caso de la actividad antioxidante EFG obtenido a partir del acetato de etilo (que presenta un valor de actividad superior a la obtenida con metanol/agua pH 2);
- Aunque la mayor actividad ha sido verificada en el EFG producido con la mezcla metanol/agua (40% del valor observado con el BHT), no existen diferencias significativas respecto a los resultados alcanzados con etanol/agua en el EFD.

Los valores de actividad antioxidante obtenidos en este trabajo han sido comparados a los resultados relatados por diferentes autores. Visioli et al. (1999) reporta la presencia de potentes componentes antioxidantes en el alpechín, al igual que Lafka et al. (2011), con el alpeorujó. Lafka et al. (2011) llegan a concluir que el extracto fenólico obtenido con etanol presenta una mayor capacidad antioxidante que el propio BHT, tal y como observado en el presente trabajo (Método BHT).



**Tabla 14 – Actividad antioxidante (%) de los extractos fenólicos EFG y EFD según el test del  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico.**

Solventes	EFG		EFD	
	Valor medio	SD	Valor medio	SD
BHT	93,2	1,5	93,2	1,5
Etanol/ agua	37,4	9,9	26,0	6,5
Metanol/ agua	22,9	0,9	20,7	10,7
Etanol/agua pH 2	16,5	0,8	20,3	6,9
Metanol/agua pH 2	15,6	1,1	19,6	1,4
Metanol	15,8	7,1	5,6	2,6
Etanol	10,3	1,8	2,8	0,6
Acetato de etilo	3,4	0,4	0	0

#### 4.5 Proceso fermentativo

En la Tabla 15 se resumen los resultados de los ensayos de producción de biosurfactantes a partir de alpeorujos grasos (AG) y alpeorujos desgrasados (AD), en cuanto al pH y tensión superficial del caldo de fermentación (TS), concentración celular (X), concentración de compuestos fenólicos totales ( $C_F$ ) y actividad antioxidante (I, %, según método DPPH). Los datos completos se encuentran disponibles en el Anexo 3.

**Tabla 15 - Resultados de los ensayos de producción de biosurfactantes (media  $\pm$  desviación estándar).**

Factores		Respuestas				
Agitación (rpm)	Alpeorujos	pH	X (g/L)	TS (mN/m)	$C_F$ (mg/ml)	I (%)
0	AG	7,2 $\pm$ 0,3	18,4 $\pm$ 0,7	29,1 $\pm$ 1	2,30 $\pm$ 0,32	83,04 $\pm$ 1,09
0	AD	7,0 $\pm$ 0,1	12,4 $\pm$ 3,3	42,8 $\pm$ 4,4	0,77 $\pm$ 0,01	84,28 $\pm$ 0,94
150	AG	7,0 $\pm$ 0,1	16,5 $\pm$ 0,8	48,8 $\pm$ 0,4	0,93 $\pm$ 0,05	87,15 $\pm$ 18,18
150	AD	7,0 $\pm$ 0,0	11,1 $\pm$ 0,8	58,1 $\pm$ 2,4	0,37 $\pm$ 0,00	78,60 $\pm$ 2,62
Controles	DSI	6,97	43,8	50,1 $\pm$ 0,2	1,07 $\pm$ 0,07	85,44 $\pm$ 0,84
	ISI	7,02	14,4	42,3 $\pm$ 0,1	1,90 $\pm$ 0,10	83,04 $\pm$ 1,09
	I	7,12	---	49,1 $\pm$ 0,2	0,45 $\pm$ 0,11	77,09 $\pm$ 4,25

Tal y como se aprecia, los valores de tensión superficial obtenidos en este trabajo varían entre 28,3 y 61.1 mN/m, siendo los menores valores de TS (< 30 mN/m) observados en experimentos realizados en ausencia de agitación, partiéndose del alpeorujos grasos. Teniendo en cuenta que uno de los criterios más importantes que determinan la presencia de biosurfactantes en el caldo de fermentación es la obtención de valores de tensión superficial

inferiores a los 40 mN/m, solamente podríamos afirmar que existen biosurfactantes en el caldo de fermentación en los ensayos realizados con alpeorujos grasos y en ausencia de agitación. Por otra parte, en las demás condiciones evaluadas, no podríamos descartar la posibilidad de que existan cantidades ínfimas de biosurfactante (por encima de la concentración micelar crítica) en el caldo de fermentación. Adicionalmente, cabe destacar que, en los experimentos en que hubo mayor crecimiento del hongo (AG y ausencia de agitación) son los que tuvieron los menores valores de tensión superficial y las mayores concentraciones de compuestos fenólicos.

Los datos experimentales sugieren que, en los ensayos realizados con AG hubo una fracción importante de los compuestos fenólicos que han sido degradados por el hongo cuando el sistema está bajo agitación. Así mismo, a pesar de su biodegradación, los valores de actividad antioxidantes son prácticamente iguales a los obtenidos en ausencia de agitación. De este modo, no hay evidencias claras en cuanto a una correlación entre compuestos fenólicos en el caldo y actividad antioxidante. Finalmente, decir que no se observan variaciones importantes en el pH del caldo de fermentación en las diferentes fermentaciones realizadas.

En la Tabla 16 se muestran los datos de actividad enzimática para los distintos experimentos realizados. Tal y como se puede ver, para un mismo sustrato, los mayores valores de actividad enzimática coinciden con concentraciones bajas de compuestos fenólicos en el medio de fermentación.

En literatura, hasta la presente fecha, no existen trabajos publicados en revistas indexadas que reporten la producción de biosurfactantes a partir de alpeorujos mediante *T. versicolor*. Por otra parte, numerosos trabajos relatan la producción de la enzima manganeso peroxidasa por el referido hongo (Paice et al., 1993; Schlosser et al., 1997; Swamy et al., 1999).

**Tabla 16 - Correlación entre los resultados de actividad enzimática (Ae) y concentración de compuestos fenólicos (CF) en los caldos de fermentación (los valores se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar).**

Caldo de fermentación	C <sub>F</sub> (mg/L)	Ae (U/mL)
AG (0 rpm)	2,3 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 3,1
AG (150 rpm)	0,9 $\pm$ 0,1	40,4 $\pm$ 13,5
AD (0 rpm)	0,8 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 3,7
AD (150 rpm)	0,4 $\pm$ 0,0	27,2 $\pm$ 4,6

En síntesis, los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la adecuación del alpeorujos como materia prima para la obtención de productos de gran interés industrial, como son los antioxidantes de origen natural, los biosurfactantes y las enzimas (MnP). Por otra parte, nuevos ensayos deben ser realizados con la finalidad de identificar las variables que afectan dichos procesos y sus rangos óptimos.

## 5. Conclusiones

En el presente TFG se ha verificado la obtención a partir del alpeorujo de productos de gran interés industrial, como son los antioxidantes de origen natural y los biosurfactantes, con potenciales usos en la industria de alimentos. Asimismo, se ha confirmado la producción de la enzima manganeso peroxidasa durante el proceso de fermentación del alpeorujo mediante *Trametes versicolor* CECT 20817.

A continuación se enumeran las principales conclusiones de este estudio.

- Los mayores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos del alpeorujo se ha obtenido con las mezclas metanol/agua y etanol/agua, sin embargo, por cuestiones legales asociadas a la industria de alimentos, se descarta la posibilidad del uso del metanol;
- Excepto cuando se usa acetato de etilo como solvente, los valores de rendimiento de extracción, concentración de compuestos fenólicos y actividad oxidante del alpeorujo denominado “graso” son similares a los del alpeorujo al que se ha extraído previamente el aceite residual (“alpeorujo desgrasado”);
- Según el método DPPH, excepto para el acetato de etilo, la actividad antioxidante de los extractos fenólicos obtenidos es superior al del butil hidroxitolueno (BHT);
- Los datos de tensión superficial evidencian la producción de biosurfactantes mediante *Trametes versicolor* CECT 20817 en los ensayos de fermentación realizados con alpeorujo graso y en ausencia de agitación. Por otra parte, no se ha verificado una correlación entre concentración de los compuestos fenólicos presentes en el caldo de fermentación y actividad antioxidante. Asimismo, la concentración de los compuestos fenólicos en el medio de cultivo guarda relación con la presencia de la enzima manganeso peroxidasa.

## 6. Referencias bibliográficas

- AICA, Agencia de Información y Control Alimentarios (2015). Información de mercados en el sector oleícola. Retrieved 13/06/2015, 2015, from [http://aplicaciones.magrama.es/pwAgenciaAO/InfMercadosAceite.aa?dato\\_de=PR ODUCCION&opcion\\_seleccionada=4120&control\\_acceso=5&idioma=ESP](http://aplicaciones.magrama.es/pwAgenciaAO/InfMercadosAceite.aa?dato_de=PR ODUCCION&opcion_seleccionada=4120&control_acceso=5&idioma=ESP)
- Alburquerque, J., Gonzalez, J., Garcia, D., & Cegarra, J. (JAN 2004). Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91: 195–200.
- Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Shibulal, B. (2014). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114: 324-333.
- Amro, B, Aburjau, T., Al-Khakil, S. (2002). Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia*, 73(6): 456-461.
- Anagnostopoulou, M., Kefalas, P., Papageorgiou, V., Assimopoulou, A., & Boskou, D. (JAN 2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 94: 19-25.
- Banat, I.M. , Franzetti, A, Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2): 427-444
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11): 317-333.
- Capasso, R., Cristinzio, G.; Evidente, A., Scognamiglio, F. (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste Waters. *Phytochemistry*, 31(12): 4125-4128.
- Chowdhury, A., Konstantinou, F., Damati, A., Akrotos, C., Vlastos, D., Tekerlekopoulou, A., et al. (APR 15 2015). Is physicochemical evaluation enough to characterize olive mill waste compost as soil amendment? The case of genotoxicity and cytotoxicity evaluation. *Journal of Cleaner Production*, 93: 94-102.
- Crozier, A., Jaganathm I.B., Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural products Reports*, 26(8): 965-1096.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48: 1532-1552.
- Desai, J.D., Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 47-64.
- Directiva 88/344/CEE del Consejo de 13 de junio de 1998 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes.

Directiva 94/52/CEE, por la que se modifica la Directiva 88/344/CEE.

Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenol extraction from foods. In: Methods in polyphenols analysis, 1-16. Edited by Santos-Buelga, C. y Williamsos, G. Editorial RS-C.

Fernández Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillen, R., Jimenez, A. (2002). Production in large quantities of highly-purified Hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two phase olive oil processing or alpeorujo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23): 6804-6811.

Francesco Visioli, Annalisa Romani, Nadia Mulinacci, Simona Zarini, Davide Conte, Franco F. Vincieri, Claudio Galli. (1999). Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *J Agric Food Chem*, 47(8): 3397-3401.

Gil, L. M; Manjarre-Pinzón, K.; Piñeros-Castro, Y.; Rodríguez-Sandoval, E. (2012). Influence the addition of nitrogen source on production of ligninases. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(1): 173-181.

Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Rucker, R., Schmitz, H.H. (1991). Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2): 490-496.

Harbone, J.B. (1989). *Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics*. Ed. Chapman and Hall. London.

IARC (2015). Agents classified by the IARC monographs, 7/6/2015, from [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/vol1\\_112.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/vol1_112.php)

Lafka, T., Lazou, A., Sinanoglou, V., & Lazos, E. (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food chemistry*, 125(1): 92-98.

Lama Muñoz, A. (10 de marzo de 2011). Obtención y caracterización de compuesto y fracciones bioactivas a partir de alperujo tratado térmicamente. estudio de un poderoso antioxidante natural (3,4-dihidroxifenilglicol, DHFG): Propiedades y purificación industrial. Unpublished Universidad de Sevilla. (9788469478387)

Lesage-Meensen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J.C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J. L., Asther, M., Labat, M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75(4), 501-507.

MAGRAMA, 2012

Matook Saif Mokbel, Fumio Hashinaga. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food chemistry*, 94: 529-534.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (22/11/2012). *Proyecto piloto de mirat documento teórico sector: Aceite de oliva y oleaginosas*. Retrieved 5/06/2015 [http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/responsabilidad-mediambiental/mirat\\_tcm7-232639.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/responsabilidad-mediambiental/mirat_tcm7-232639.pdf)

- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Romos-Cor,enzana, A., Russel, N.J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill watses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1): 25-39.
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stockmann, R. (2005). Bio-activity and analysis of biphenols recovered from olive oil mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4): 823-837.
- Paice, M.G., Reid, I.D., Bourbonnais, R., Archibald, F.S., Jurasek, L. (1993). Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (1): 260-265.
- Ramalakshmi, K., Kubra, I., & Rao, L. (2008). Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Research International*, 41(1): 96-103.
- Rodis, P.S., Karathanos, V.T., Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3): 596-601.
- Schlosser, D., Grey, R., Fritsche, W. (1997). Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47 (4): 412-418
- Suárez M, Romero MP, Ramo T, Macià A, Motilva MJ. (2009). Methods for preparing phenolic extracts from olive caker for potential applications as food oxidants. *J Agric Food Chem.*, 57(4): 1463-72.
- Suarez Recio, M. (2010). Obtención de extractos fenólicos a partir de subproductos de la oliva y aplicación en el desarrollo de una ceite de oliva enriquecido. Tesis Doctoral. Universtat de Lleida. Department de Tecnologia dels Aliments.
- Swamy, J., Ramsay, J.A. (1999). Effects of Mn<sup>2+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations on laccase and manganese peroxidase production and amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51 (3): 391-396.
- Vázquez Roncero, A., Maestro, D.R., Gracian, C.E. (1974). Cambios en los polifenoles de las aceitunas durante la maduración. *Aceites y grasas*, 22: 366-370.
- Waterman, P.G., Mole, S. (1984). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications. Freat Britain.

## Anexos

### **Anexo 1: Procedimiento de preparación del medio de cultivo utilizado para el inóculo**

Para la preparación de las placas, 42 g de agar de dextrosa de patata (potato dextrose agar) han sido disueltos en un litro de agua destilada, y posteriormente el medio ha sido autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Bajo condiciones de asepsia, se han introducido alrededor de 15 ml del medio de cultivo a cada una de las placas Petri, y se han dejado enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se siembra un plug del hongo *Trametes versicolor* CECT 20817 en el centro de la placa y se mantiene a 25°C en la oscuridad. Una vez que el hongo haya colonizado toda la placa (unos 8 días aproximadamente), este se mantiene en nevera a 4°C hasta su utilización.

## Anexo 2: Resultados relativos a la obtención del componentes fenólicos en el alpeorujo

Tabla 17 - Datos de rendimiento de la extracción de los compuestos fenólicos y de la concentración de fenólicos en el extracto.

Solvente	Repli- cas	Rendimiento de la extracción			Concentración de fenólicos	
		masa extracto (g)	masa alpeorujo (g)	Redimiento (%)	Abs	CF (mg/g)
Acetato G	R1	0.29	5.06	5.71	0.03	2.44
	R2	0.31	5.11	6.16	0.01	1.14
	R3	0.23	5.07	4.58	0.01	1.08
Metanol G	R1	0.70	5.00	13.98	0.41	41.54
	R2	0.69	5.11	13.51	0.48	51.24
	R3	0.57	5.01	11.32	0.41	42.2
Met/H2O G	R1	1.34	5.05	26.47	0.45	47.46
	R2	1.32	5.00	26.34	0.46	48.54
	R3	1.50	5.06	29.64	0.45	47.67
Met/H2O pH 2 G	R1	1.12	5.05	22.14	0.48	52.17
	R2	1.3	5.01	26.02	0.55	61.09
	R3	1.13	5.04	22.33	0.49	53.3
Etanol G	R1	0.26	5.27	4.95	0.18	8.06
	R2	0.25	5.05	4.99	0.18	8.89
	R3	0.18	4.93	3.73	0.19	10.59
Solvente	Repli- cas	Rendimiento de la extracción			Concentración de fenólicos	
		masa extracto (g)	masa alpeorujo (g)	Redimiento (%)	Abs	CF (mg/g)
Et/H2O G	R1	1.07	5.03	21.35	0.47	49.79
	R2	1.03	5.02	20.44	0.47	49.54
	R3	1.12	5.11	21.91	0.47	49.93
Et/H2O pH 2 G	R1	1.25	5.03	24.77	0.51	56.49
	R2	1.18	5.02	23.50	0.48	51.40
	R3	1.02	5.07	20.07	0.46	48.73
Acetato D	R1	0.14	5.06	2.69	0.07	6.67
	R2	0.19	5.06	3.72	0.06	5.98
	R3	0.15	5.05	3.05	0.06	5.89
Metanol D	R1	0.79	5.07	15.59	0.36	33.73
	R2	0.84	5.13	16.34	0.35	32.99
	R3	0.75	5.01	15.04	0.35	33.10



Cont. Tabla 17

Solvente	Repli- cas	Rendimiento de la extracción			Concentración de fenólicos	
		masa extracto (g)	masa alpeorujo (g)	Redimiento (%)	Abs	CF (mg/g)
Met/H2O D	R1	1.31	5.02	26.08	0.60	68.41
	R2	1.37	5.04	27.20	0.50	54.01
	R3	---	---	---	0.49	53.43
Met/H2O pH 2 D	R1	1.25	5.04	24.80	0.48	51.74
	R2	1.07	5.05	21.20	0.47	50.23
	R3	0.94	5.31	17.79	0.49	52.60
Etanol D	R1	0.19	5.08	3.72	0.23	16.03
	R2	0.17	5.02	3.36	0.23	16.4
	R3	0.24	5.21	4.53	0.25	18.69
Et/H2O D	R1	1.10	5.04	21.78	0.55	61.29
	R2	0.94	5.15	18.25	0.52	56.79
	R3	0.98	5.03	19.47	0.52	57.24
Et/H2O pH 2 D	R1	1.30	5.01	25.98	0.48	51.57
	R2	1.12	5.02	22.42	0.48	52.24
	R3	1.58	5.02	31.56	0.48	51.59

**Tabla 18 –Datos de la actividad antioxidante de los extractos fenólicos con el método del  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico y de DPPH.**

Solvente		Actividad antioxidante ( $\beta$ -caroteno/ac. linoleico)					I, % (DPPH)
		Abs 0h	Abs 1h	Abs 2h	Abs 3h	I (%)	
Control -	R1	3.23	2.27	1.91	1.70	0.00	
	R2	3.25	2.33	1.92	1.72	0.00	
BHT	R1	3.29	3.21	3.19	3.17	92.18	62,33
	R2	3.29	3.21	3.20	3.20	94.27	60,59
	R3	---	---	---	---	---	58,56
Acetato G	R1	3.23	2.92	2.67	1.96	17.09	20,48
	R2	3.25	2.67	2.20	1.96	15.94	17,17
Metanol G	R1	3.26	2.71	2.17	1.87	9.09	90,37
	R2	3.26	2.77	2.23	1.91	11.57	88,62
MeOH + H2O G	R1	3.26	2.83	2.54	2.20	30.40	91,62
	R2	3.26	2.85	2.72	2.42	44.47	90,70
MeOH + H2O pH 2 G	R1	3.26	2.56	2.33	1.96	14.86	83,88
	R2	3.26	2.54	2.33	1.98	16.37	84,20
Etanol G	R1	3.26	2.85	2.01	1.79	3.73	61,16
	R2	3.26	2.95	2.01	1.78	3.15	61,29
EtOH + H2O G	R1	3.26	2.90	2.39	2.05	20.78	90,73
	R2	3.27	2.81	2.26	1.90	10.78	90,25
EtOH + H2O pH 2 G	R1	3.27	2.83	2.51	2.10	23.56	78,28
	R2	3.26	2.85	2.43	2.08	22.25	72,82
Acetato D	R1	3.26	2.25	1.87	1.71	0.00	44,74
	R2	3.24	2.34	1.89	1.70	0.00	42,44
Metanol D	R1	3.24	2.69	2.16	1.83	7.47	93,23
	R2	3.26	2.66	2.10	1.79	3.73	93,35
MeOH + H2O D	R1	3.25	2.84	2.32	1.93	13.13	87,22
	R2	3.25	2.93	2.52	2.15	28.21	93,05
MeOH + H2O pH 2 D	R1	3.24	2.88	2.41	2.03	20.61	90,01
	R2	3.24	2.87	2.38	2.00	18.57	89,61
Etanol D	R1	3.24	2.63	2.05	1.75	2.34	79,07
	R2	3.23	2.64	2.08	1.75	3.18	78,82
EtOH + H2O D	R1	3.24	2.92	2.56	2.18	30.64	90,13
	R2	3.24	2.87	2.42	2.04	21.46	89,49
EtOH + H2O pH 2 D	R1	3.23	2.83	2.34	1.94	15.46	90,68
	R2	3.23	2.87	2.46	2.09	25.21	89,90

### Anexo 3: Resultados relativos a las fermentaciones

Tabla 19 – Resultados de los ensayos de producción de biosurfactantes.

Factores		Respuestas					
Agitación (rpm)	Alpeorujo		pH	X (g/L)	TS (mN/m)	TS <sup>-1</sup> (mN/m)	TS <sup>-2</sup> (mN/m)
0	AG	R1	7,20	17,4	30,2 ± 0,1	52,4 ± 0,6	-
		R2	7,53	33,8	28,3 ± 0,1	31,3 ± 0,3	70,9 ± 0,2
		R3	7,00	18,4	28,7 ± 0,1	52,8 ± 0,4	-
0	AD	R1	6,92	10,1	37,8 ± 0,2	-	-
		R2	7,04	25,5	46,1 ± 0,3	-	-
		R3	6,93	14,7	44,4 ± 0,3	-	-
150	AG	R1	7,16	16,1	49,1 ± 0,2	-	-
		R2	6,94	17,4	45,7 ± 0,2	-	-
		R3	6,95	16,0	48,5 ± 0,1	-	-
150	AD	R1	7,01	11,7	61,1 ± 0,2	-	-
		R2	7,03	22,1	57,2 ± 0,1	-	-
		R3	6,95	10,5	56,0 ± 0,1	-	-
Controles	DSI	R1	6,97	43,8	50,1 ± 0,2	-	-
	ISI	R1	7,02	14,4	42,3 ± 0,1	53,3 ± 0,2	-
	I	R1	7,12	0	49,1 ± 0,2	65,5 ± 0,2	-

Dónde: DSI, corresponde a los ensayos de fermentación realizados con alpeorujo desgrasado, sin extracto fenólico y en ausencia de inóculo; ISI, ensayo realizado con alpeorujo integral y en ausencia de inóculo y I, ensayos realizado solamente con inóculo (ausencia de alpeorujo).

**Tabla 20 – Resultados de los compuestos fenólicos en los ensayos de producción de biosurfactantes**

Factores		Respuestas					
		Réplicas	Fenólicos	Antioxidante	Actividad enzimática		
Agitación (rpm)	Alpeorujos		CF (mg/ml)	I (%)	15 S	5 MIN	U/MI
0	AG	R1	2,53	66,14	1.23	1.28	3.97
		R2	2,07	68,18	1.08	1.17	8.34
0	AD	R1	0,78	82,24	0.37	0.57	18.82
		R2	0,77	83,57	0.69	0.89	19.1
		R3	---	---	0.30	0.43	12.47
150	AG	R1	0,89	100,00	0.48	1.01	49.99
		R2	0,96	74,29	0.36	0.69	30.89
150	AD	R1	0,37	80,67	0.37	0.57	18.82
		R2	0,37	76,54	0.69	0.89	19.10
		R3	---	---	0.30	0.43	12.47
Controles	DSI	R1	1,01	84,84	0.36	0.56	19.30
		R2	1,12	86,03	---	---	---
	ISI	R1	1,83	83,73	0.50	0.83	30.99
		R2	1,97	82,19	---	---	---
	I	R1	0,52	80,09	0.26	0.48	19.89
		R2	0,38	74,08	---	---	---
Control negativo		R1	---	34,26	---	---	---
		R2	---	33,97	---	---	---
BHT		R1	---	62,33	---	---	---
		R2	---	60,59	---	---	---
		R3	---	58,56	---	---	---

# **VALORACIÓN QUÍMICO AGRÍCOLA DE LOS RESIDUOS DEL CAFÉ: PRIMEROS ENSAYOS EN SUELO- PLANTA**

Trabajo experimental calificado con  
Sobresaliente

## Índice

<b>1. Ficha con los datos personales</b>	1
<b>2. Resumen del TFG</b>	2
<b>3. Introducción/Revisión bibliográfica</b>	3
3.1. Generalidades sobre el café	3
3.2. Residuos del café: tipos de residuos	3
3.3. Usos industriales de los residuos	4
3.4. Empleo de los posos de café en agricultura	5
3.5. Problemática de los suelos mediterráneos	6
<b>4. Objetivos</b>	7
<b>5. Material y métodos</b>	8
5.1. Suelos empleados	8
5.2. Café	9
5.3. Planta	9
5.4. Diseño experimental	10
5.5. Preparación de la muestra de suelo	10
5.6. Preparación de los posos de café	11
5.7. Ensayo en microcosmos edáficos	11
5.8. Análisis físicos, químicos y físico-químicos del suelo	13
5.9. Determinaciones en planta	15
5.10. Análisis morfológicos de la estructura del suelo	16
5.11. Esquema metodológico	17
<b>6. Resultados</b>	18
6.1. Características de los suelos, de los posos de café y de las mezclas suelo-posos de café previos al cultivo/incubación	18
6.2. Cantidades de agua añadidas para el riego de las plantas y el mantenimiento de los niveles de humedad en el suelo	19
6.3. Evolución de las mezclas suelos-posos de café por cultivo/incubación, con y sin planta	20
6.4. Evolución de las plantas de lechuga durante el ensayo de cultivo	27
<b>7. Discusión</b>	32
7.1. Influencia de los posos de café en las propiedades físicas del suelo	32
7.2. Influencia de los posos de café en las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo	33
7.3. Influencia de los posos de café sobre el crecimiento y capacidad antioxidante de la planta	37
<b>8. Conclusiones</b>	38
<b>9. Bibliografía</b>	39

## 2. Resumen del TFG

La infusión de café es una de las bebidas más populares del mundo, lo que conduce a la necesidad de una gran producción mundial; sólo en España se consumen 188.940 toneladas de café al año. El procesado del café y la generación de la infusión dan lugar a grandes cantidades de residuos entre los que destacan los posos (PDC). Los PDC contienen cafeína, taninos, ácido clorogénico, fenoles y pueden ser una amenaza para el medio ambiente debido a su carácter tóxico. La aplicación de los PDC como enmienda orgánica de suelos supone una alternativa interesante a este problema ambiental, ya que además los suelos mediterráneos son deficitarios en materia orgánica. En el presente estudio se pretende analizar en qué medida la adición de PDC a suelos agrícolas mediterráneos contribuye a modificar favorablemente sus cualidades agronómicas para la producción de alimentos. El ensayo *in vitro* planteado, consiste en la adición de diferentes dosis de PDC (0, 2.5 y 10%) a dos tipos diferentes de suelos (suelo de Vega y suelo Rojo). Dos modalidades de ensayo han sido probadas: cultivo (con *Lactuca Sativa* var longifolia: lechuga) e incubación (sin planta). En las mezclas suelo-PDC, se han analizado las propiedades físicas (densidad aparente, capacidad de retención de agua, estructura), químicas y fisicoquímicas (pH, CE, contenido en N, C.O., relación C/N, P asimilable, K asimilable, carbonato cálcico equivalente y elementos traza). En planta se han estudiado peso fresco, peso seco y la capacidad antioxidante. Como resultado se ha observado, que la adición de PDC aumenta la cantidad de C.O, N, P, N y algunos micronutrientes, produce una disminución en la densidad aparente y un aumento de la capacidad de retención de agua. Como efecto negativo, la adición de PDC produce una disminución del crecimiento de las plantas y de la presencia en ellas de compuestos con capacidad antioxidante. En suma, la adición de PDC mejora la fertilidad química y física del suelo, pero afecta negativamente al crecimiento de las plantas ensayadas (lechugas) y puede tener algunos inconvenientes medioambientales como el aumento de la salinidad o el incremento de los contenidos de metales pesados.

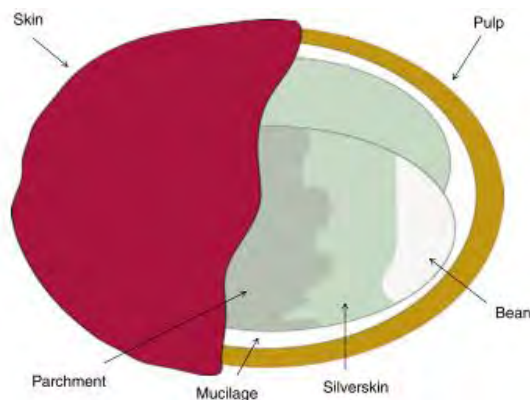
### 3. Introducción/Revisión bibliográfica

#### 3.1. Generalidades sobre el café

Se denomina café a la bebida que se obtiene de los frutos y semillas de la planta de café o cafeto. Los frutos maduros se recolectan manualmente, se someten a un secado natural al sol y se muelen para eliminar las capas superficiales de mucílago. El tueste del grano es un proceso vital del que dependerá la futura calidad del café. Las transformaciones que el café experimenta con este proceso determinan aroma, cuerpo, sabor, grado de acidez, etc. El tueste se hace a una temperatura de 200°C, lo que provoca que el grano pierda humedad (pérdida de peso 16-18%), aumente el volumen, cambie el color y se desprendan compuestos aromáticos volátiles, dando lugar a la formación del “café natural” (Belitz, 2009). A nivel mundial se consumen grandes cantidades de café. Así, en los hogares españoles, el consumo de café ascendió a 82.800 toneladas en 2013, con un valor de 1097.8 millones de euros; el consumo total (incluyendo la hostelería, restauración e instituciones) fue de 188.940 toneladas (Mercasa, 2014). Como consecuencia, también se producen grandes cantidades de posos de café (PDC). La producción anual de PDC en España se sitúa en torno a las 270000 toneladas, de las cuales un 58% se producen en hostelería y restauración, un 19% en industrias de café soluble y un 23% en los hogares. De esta forma, aunque se pueda pensar que la valorización de los PDC podría ser difícil debido a su dispersión espacial, prácticamente el 77% se produce en centros en los cuales se podría hacer una recogida selectiva si se aplicasen los incentivos adecuados. De este modo, unas 51000 toneladas se producen en empresas elaboradoras de café soluble, lo que significa que se puede realizar una recogida a gran escala, con la consiguiente producción elevada de los derivados funcionales que se determinen. Por otro lado, alrededor de 157000 toneladas se producirían en los locales de hostelería y restauración, en los cuales también es posible la recogida selectiva.

#### 3.2. Residuos del café: tipos de residuos

El fruto del café (Figura 1) posee una serie de estructuras tisulares que originan los productos, subproductos y residuos del mismo (Murthy & Madhava Naidu, 2012). Dependiendo del procesado de los granos de café (húmedo o seco, tostado e infusión de los residuos sólidos), se obtienen cuatro tipos de residuos (Figura 2): la pulpa, la cáscara, piel de plata y los PDC.



**Figura 1.** Capas de un fruto de café.



-*La pulpa*: es el primer subproducto obtenido durante el procesado y representa el 29% del peso seco de todo el grano. La pulpa es obtenida tras el procesado húmedo y de cada dos toneladas de café se obtienen una tonelada de pulpa. Los componentes orgánicos presentes en la pulpa incluyen taninos (1.8-8.56%), sustancias pépticas (6.5%), azúcares reductores (12.4%), azúcares no reductores (2.0%), cafeína (1.3%), ácido clorogénico (2.6%) y ácido cafeico (1.6%).

-*Cáscara*: es obtenida cuando el café es tratado por el procesado seco. La cáscara representa el 12% del grano. Sobre 0.18 ton son obtenidas por cada tonelada de grano de café. Las cáscara del café se compone de un 15% humedad, 5.4% ceniza, 7.0% proteína, 0.3% lípidos, y 72.3% de carbohidratos.

-*Cascarilla*: es un subproducto procedente del tostado. Tiene un alto contenido en fibra soluble (86%) y tiene alta capacidad antioxidante, debido a su alta concentración de compuestos fenólicos. Está formado fundamentalmente por celulosa y hemicelulosa.

-*PDC*: casi el 50% de la producción mundial de café es destinada a la preparación de café soluble. Una tonelada de café genera alrededor de 650 kg de PDC y se obtienen 2 kg de PDC húmedos por cada kg de éstos. Es rica en azúcares conteniendo manosa y galactosa con una fracción significativa de proteínas (Mussatto et al., 2011). La composición química varía de una planta a otra y entre las diferentes partes de la misma planta. También varía entre plantas de diferentes áreas geográficas, localidades, años, clima y condiciones del suelo.



**Figura 2.** Principales tipos de residuos del café.

### 3.3. Usos industriales de los residuos

Los restos de café tienen diversos usos industriales entre los que se encuentra la producción de bioproductos como biogás, alimento para ganado y gusanos, etanol, vinagre, proteínas unicelulares, enzimas, biopesticidas, pro bióticos, biodiesel, sustrato para el crecimiento de hongos...etc. (Murthy & Madhava Naidu, 2012)

-*Producción de hongos*: debido al contenido proteico y de humedad de los restos de café, éstos han sido usados como sustrato para cultivar algunas especies de hongos, entre las cuales, podemos destacar, la *Flammulina velutipes*.

-*Ácido cítrico y ácido giberélico*: las cáscaras del café han sido usadas como sustrato para la producción de estos ácidos por *Aspergillus niger* mediante fermentación.

-*Enzimas y metabolitos secundarios*: la pulpa y la cáscara del café son dos subproductos usados para la producción de enzimas como pectinasa, tanasa y cafeinasa, y la producción de amilasa, proteasa y xylanasa mediante *A.oryzae*, *Penicillium sp*, *A. niger* y *N. crassa*. También han sido usados para la producción de fructooligosacáridos y  $\beta$ - frutofuranósidos.

-*Etanol*: tanto las cáscaras de café como los PDC han sido usados como sustratos de microorganismos para la producción de etanol.

-*Biogás*: La cascarilla del café cultivada con el termófilo *Mycotyoha* permite la biometanización.

-*Compost*: La pulpa de café es una buena fuente de humus y carga orgánica.

-*Colorantes*: Ha sido demostrado que los PDC son un absorbente barato y asequible para la eliminación de colorantes catiónicos en el tratamiento de aguas residuales.

-*Productos alimenticios y compuestos aromáticos*: La pulpa del café fresca puede ser fácilmente procesada para dar lugar a otros productos alimenticios como mermelada, zumo, jalea...

-*Otros usos menos frecuentes*: los PDC pueden ser utilizados para reforzar nanocompuestos (Lee, Park, Jeong, & Song, 2015), como un material alternativo para remplazar los catalizadores a base de metal usado como electrodo en las células de combustible (Ramasahayam, Azam, & Viswanathan, 2015), e incluso como absorbente de metales pesados que contaminan agua y suelo (Kim et al., 2014).

### **3.4. Empleo de los PDC en agricultura**

#### **3.4.1. Formas de uso y cantidades adicionadas**

En la bibliografía se encuentran pocos trabajos relativos a la influencia de los PDC en el suelo y en la planta cuando se emplean como enmienda orgánica. Se trata de trabajos en su mayoría realizados *in vitro*, en macetas (microcosmos edáficos) y en pocos casos en suelo real. En algunos de estos trabajos se emplean los PDC mezclados con otros residuos del café y con otros residuos orgánicos. También se utilizan los PDC compostados, ya que según los autores compostados esta técnica de transformación y maduración de los restos orgánicos mejora sustancialmente la calidad de los PDC como enmiendas orgánicas. A continuación, se exponen los principales métodos y resultados de la bibliografía consultada.

#### *-Residuos de café frescos*

Kasongo et al., (2011), realizaron un experimento para ver la influencia de los residuos de café en el suelo. Recolectaron pulpas y cáscaras de café, las mezclaron, las dejaron secar al aire y sin realizarle ningún tratamiento las aplicaron al suelo. Las cantidades adicionadas fueron 5, 10 y 20 t/ha.

Kasongo et al., (2013), realizaron un experimento similar al anterior, pero en este estudio se centraron en ver la influencia de los residuos de café (pulpa y cáscaras de café), en las características nutricionales de la planta, sobre todo en la absorción de componentes minerales por la misma. Para ello realizaron un estudio de invernadero. Se aplicó pulpa y cáscara de café al suelo sin ningún pre tratamiento. El experimento se llevó a cabo en macetas. Se adicionaron 1.6, 3.2 y 6.4 g de estos residuos de café por kg de suelo, cantidades que corresponden a 5, 10 y 20 t/ha respectivamente.

Cruz et al., (2012), usaron restos de café frescos, pero no una mezcla de varios tipos, sino que usaron los PDC recolectados de varias cafeterías que servían café spresso. Se obtuvieron 30 kg de café y se homogeneizaron en un mezclador cónico de 100 L. Se prepararon cinco mezclas: 2.5%, 5%, 10%, 15%, y 20%. Un total de 50 kg fue necesario para cada mezcla, y fue adecuadamente homogeneizado y distribuido en macetas de 1L. Este estudio tenía como objetivo ver la influencia de los PDC en el contenido en carotenoides y clorofila de las lechugas. Estos experimentos fueron llevados a cabo en invernaderos, con adecuada ventilación, temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C) y luz natural. Un proceso parecido se llevó a cabo por los mismos autores para ver el efecto de los PDC (tanto frescos como compostados) en la mejora de los compuestos bioactivos y su capacidad antioxidante. Recolectaron, como en el trabajo anterior, PDC frescos de varias cafeterías y realizaron las mismas mezclas y las distribuyeron en macetas de plástico de 1L. En otro estudio del año 2014, realizado por los mismos autores del anterior ensayo, se observó la influencia de los PDC en el contenido mineral de las lechugas.

Estos cuatro estudios comentados con anterioridad se llevaron a cabo en macetas. Sin embargo, Yamane et al., (2014), vieron los efectos que tenían los residuos de café frescos en el crecimiento de varias plantas en parcelas de cultivo. Se sembraron varios cultivares durante tres temporadas de cultivo y se vio el efecto de los residuos de café en el crecimiento de estas plantas. Se usaron tres concentraciones distintas de residuos de café: control ( $0 \text{ kg/m}^2$ ), baja ( $1 \text{ kg/m}^2$ ) y alta ( $10 \text{ kg/m}^2$ ).

#### *-Residuos de café compostados*

Cruz et al., (2014), realizaron un ensayo con residuos de café compostados para ver la repercusión de estos sobre la absorción de minerales por la planta, en concreto de una lechuga. Se realizaron cinco mezclas: 5%, 10%, 15%, 20% y 30%. Los residuos de café fueron compostados con anterioridad durante seis meses y se compostaron con hierba fresca, paja y serrín. El mismo proceso se llevó a cabo por los mismos autores para la determinación de la influencia de los PDC en la mejora de los componentes bioactivos de estos y su capacidad antioxidante.

#### *-Residuos de café mezclados con otros materiales orgánicos*

En el estudio realizado por Yamane et al., (2013), se aplicó estiércol de caballo con los residuos de café para analizar la efectividad de esta mezcla en la enmienda de suelo. Tanto los restos de café como el estiércol de caballo fueron aplicados en tres niveles en cada parcela: control ( $0 \text{ kg/m}^2$ ), bajo ( $1 \text{ kg/m}^2$ ) y alto ( $10 \text{ kg/m}^2$ ).

### **3.5. Problemática de los suelos mediterráneos**

El suelo se considera como un recurso natural no renovable a escala humana y es un bien a proteger, pues de él depende la supervivencia de la humanidad. En Andalucía los suelos agrícolas dedicados a cultivos de cereal, olivar, viñedo, o cultivos de frutales están muy degradados (Durán et al., 2009). La calidad del fruto es función de la calidad del suelo. Las prácticas agrícolas no han tenido en cuenta la conservación del suelo, potenciando la producción con el uso excesivo de plaguicidas y fertilizantes. Esta situación ha acelerado los procesos erosivos y de contaminación. Los suelos agrícolas, sin cubierta vegetal durante la

gran parte del año, apenas incorporan materia orgánica que posibilite el mantenimiento de una buena estructura del suelo (Bronick and Lal, 2005). De la estructura depende la porosidad y de ésta, una mejor infiltración y retención de agua o la cesión de nutrientes. La materia orgánica del suelo proporciona energía, sustratos y diversidad biológica necesarios para sustentar las funciones del suelo, y es considerada como uno de los más importantes componentes edáficos, que contribuye de manera fundamental a su calidad y fertilidad. Urge por tanto mejorar la fertilidad de los suelos agrícolas mediante el uso de enmiendas orgánicas, que ayuden a recuperar la pérdida de materia orgánica y aumentar la calidad del suelo (Pérez-Lomas et al., 2010). Así, uno de los destinos relacionados con la revalorización de los subproductos del café sería la transformación de los PDC en abono orgánico mediante el compostaje (Nogueira et al., 1999). Este subproducto generado en grandes cantidades en cafeterías y restaurantes no se suele reutilizar.

#### **4. Objetivos**

El objetivo general de este trabajo es comprobar los efectos de la adición de posos de café (PDC) al suelo, en un experimento *in vitro*, con cultivo de plantas o en suelo sin cultivar, sobre las propiedades físicas y químicas del propio suelo y sobre el crecimiento de plantas empleadas en alimentación humana. Este objetivo se desglosa en varios objetivos parciales:

1. Valorar los efectos de la adición de distintas dosis de PDC sobre las propiedades del suelo y de la planta.
2. Valorar los efectos del tiempo de cultivo (con planta) y de incubación (sin planta), sobre las propiedades del suelo y de la planta, en suelos adicionados con PDC.
3. Valorar los efectos de los PDC sobre el suelo y la planta, en distintos tipos de suelo.
4. Intentar establecer dosis y formas de manejo, para optimizar la adición de PDC a distintos tipos de suelo.

## 5. Material y métodos

### 5.1. Suelos empleados

-*Suelo de Vega* (Figura 3): fue tomado en la Vega de Granada, en las cercanías del pueblo de Pinos Puente. Se trata de un Inceptisol (Soil Taxonomy), de textura Arcillosa, de gran espesor con cultivos de maíz y alfalfa. En la actualidad se encuentra en régimen de agricultura orgánica, evitándose los abonos inorgánicos durante 10 años.



**Figura 3.** Superficie y perfil del suelo de la Vega.

-*Suelo Rojo* (Figura 4): situado en las inmediaciones del pueblo del Padul, cuyo uso es el cultivo de cereales. Se trata de un Alfisol (Soil Taxonomy) de elevado espesor con texturas muy cambiantes en profundidad, pero en la zona muestreada es de tipo arcilloso-francoarcilloso.



**Figura 4.** Superficie y perfil del suelo Rojo.



## 5.2. Café

Para la obtención de los PDC se partió de café en grano suministrado por Cafés Cumbal (Figura 5). El café en grano utilizado corresponde al tipo de café PREMIUM TUESTE NATURAL el cual es 100% Arábica procedente de Centro América y África Occidental.



**Figura 5.** Presentación comercial del café empleado y aspecto de los granos.

## 5.3. Planta

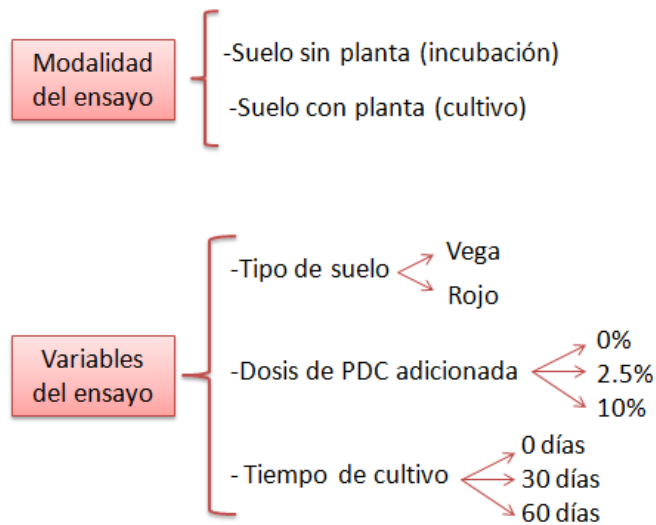
El experimento con planta fue llevado a cabo con la variedad de lechuga *L.sativa* var longifolia (Little Gem Duende) (Figura 6). Pertenece a la familia Astraceae y pueden ser plantas anuales o bianuales, lampiñas, con tallos ramificados y algunas variedades pueden llegar hasta 1 m de altura. Esta planta desarrolla hojas grandes y erguidas. Las plantas de lechuga fueron adquiridas en los viveros SALIPLANT.



**Figura 6.** *Lactuca Sativa* var longifolia (Little Gem Duende). La planta corresponde al ensayo V-0, a los 45 días.

#### 5.4. Diseño experimental

El ensayo se realizó teniendo en cuenta las siguientes condiciones:



El ensayo se realizó por triplicado. Teniendo en cuenta las dos modalidades y las variables de ensayo, el número de muestras fue de 54 microcosmos cultivados con lechuga y 54 microcosmos sin cultivo (incubados).

#### 5.5. Preparación de la muestra de suelo

La muestra de suelo para el experimento se tomó de lo que se denomina la *capa arable* (primeros 20 cm).

Las muestras de suelo fueron llevadas al laboratorio y extendidas en una lámina de unos 2 cm de espesor para su secado al aire (Figura 7). Transcurridas dos semanas, los suelos fueron disgregados con un rodillo de madera y tamizados a 2 mm para seleccionar la fracción “tierra fina”. Esta fracción tierra fina (menor de 2 mm), es la que se emplea para la elaboración de los microcosmos edáficos.

La fracción grava real se calculó limpiando la fracción del rechazo del tamiz de 2 mm bajo un chorro de agua, eliminado de esa manera los agregados de suelo muy compactos.



**Fotografía 7.** Suelo de Vega extendido para su secado al aire.

## 5.6. Preparación de los posos de café

La preparación comprende tres etapas:

### 1) Molienda

La molienda tuvo lugar en un molino de café propio de las cafeterías. Una vez molido el café se tamizó el café a 1 mm. El rechazo se volvió a moler

### 2) Preparación de la infusión

Se adicionó 50g de café por cada litro de agua destilada. Este proceso se llevó a cabo en una cafetera convencional de filtro.

### 3) Secado de los PDC

Se secaron los posos al aire durante el tiempo suficiente hasta estabilizar su humedad.

## 5.7. Ensayo en microcosmos edáficos

Las mezclas de suelo-PDC empleadas en el ensayo fueron 0, 2.5 y 10% de café (w:w). La cantidad de suelo y de PDC añadido fueron las siguientes para cada caso, teniendo en cuenta que en cada maceta contenía 400 g de mezcla:

- 0%: 400 g de suelo.
- 2.5%: 9.5 g de PDC + 390.5 g de suelo.
- 10%: 36 g de PDC + 364 g de suelo.

Las mezclas fueron volteadas durante 5 min en un agitador mecánico.

Los recipientes empleados para la creación de los microcosmos edáficos fueron macetas de PVC, comerciales, de las siguientes características: diámetro superior 11cm, diámetro de la base 7.5cm, altura 8.5 cm, número de orificios de la base 19, capacidad 300 ml. La base de la maceta fue sellada con dos mallas de fibra de vidrio giradas 45 grados entre sí, para evitar pérdidas de material de suelo. Las macetas fueron colocadas sobre un plato (11cm de diámetro) para evitar fugas de solución de suelo por contacto con la superficie del soporte (Figura 8). En el caso del ensayo sin planta las macetas fueron cubiertas con otro plato (14 cm de diámetro) para evitar la entrada de luz pero no de aire.

La siembra de la planta se realizó introduciendo el cepellón con una mínima cantidad de turba, tal como viene del vivero (Figura 9).

El cultivo (con planta) y la incubación (sin planta) fueron llevados a cabo en una cámara de cultivo del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo condiciones ambientales controladas (Figura 10): humedad relativa del 60-80%, temperatura 22/18 °C (día/noche) y un fotoperiodo de 12/12 horas.

La humedad de cada microcosmos edáfico se mantuvo entre la capacidad de campo y punto de marchitamiento permanente. Las macetas fueron regadas tres veces en semana, calculando las pérdidas de agua con respecto al valor de la capacidad de campo mediante pesada.





**Figura 8.** Preparación de los microcosmos edáficos.



**Figura 9.** Lechugas en el momento de la siembra: tiempo 0 del ensayo.



**Fotografía 10.** Microcosmos edáficos en la cámara climática. En la mitad superior de la foto se observan los microcosmos con planta; en la parte inferior, los microcosmos sin planta, cubiertos con una tapadera para evitar la entrada de luz.

## 5.8. Análisis físicos, químicos y físico-químicos del suelo

Los métodos de análisis empleados para el estudio de los suelos, corresponden a los oficiales de España, publicados por Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1994) y en algún caso a los publicados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA, Page et al., 1982).

### 5.8.1. Análisis previos

Se realizaron sobre los suelos sin adicionar, las mezclas de suelo con PDC y los PDC, todos ellos sin incubar en la cámara climática. Los análisis fueron:

#### *-Humedad*

La humedad se determinó previa pesada en húmedo y posterior pesada tras 24 horas a una temperatura de 105 °C en el caso del suelo y de 75 °C en el caso de los PDC, ambos en estufa.

#### *-Densidad aparente*

Para el cálculo de la densidad aparente, en campo y en laboratorio se utilizó el Método de Bourger. En el campo consiste en introducir en el suelo, con ayuda de un martillo de nylon, un cilindro de volumen conocido (223.4 cm<sup>3</sup>). El cilindro se extrae con ayuda de un instrumento cortante (Figura 11). El volumen de muestra incluido en el cilindro se pesa posteriormente. En el laboratorio, el método consiste en llenar el mismo cilindro con la muestra, golpear sobre un taco de madera para compactar y pesar posteriormente el volumen de muestra incluida en el cilindro.



**Figura 11.** Toma de muestras en campo para el cálculo de la densidad aparente.

#### *-Granulometría*

Se realizó la granulometría del café molido, PDC y suelo.

La granulometría del café molido y de los PDC se realizó por tamizado empleando los siguientes tamaños de luz de malla: 1000, 500, 250 y 200 $\mu$ m.

La granulometría del suelo se calculó mediante tamizado y sedimentación (método de Bouyoucos).

#### *-Retención de agua*

Se determinaron los valores de capacidad de campo (agua retenida a -33kPa) y punto de marchitamiento permanente (agua retenida a -1500 kPa) mediante el método de la membrana de Richards (1945) (Figura 12). Con estos valores, con la densidad aparente y con el contenido de grava, se calculó el agua utilizable para las plantas. A partir de todos estos datos se determinó la cantidad de agua necesaria para que la humedad de los microcosmos se mantuviera dentro de estos límites. Por debajo de la capacidad de campo para evitar las lixiviaciones y por encima del punto de marchitamiento permanente para evitar el secado irreversible de la planta por falta de agua



**Figura12.** Membrana de Richards con las mezclas de suelo-PDC colocadas dentro de anillos.

#### *-pH*

En suspensiones de suelo:agua. En el caso del suelo y mezclas suelo-PDC, la proporción suelo:agua destilada fue de 1:2.5 (w:w) y en el caso de los PDC, dada su elevada capacidad de retención de agua se hizo en proporción 1:5(w:w). El pH se determinó en un pHmetro marca Crison.

#### *-Conductividad eléctrica*

Procedimiento descrito por el USDA (United States Department of Agriculture). Se midió la CE a 25 grados en el extracto de una mezcla suelo-agua a proporción 1:5 (w:w). La CE se determinó con un conductímetro marca Crison.

### 5.8.2. Análisis tras el cultivo/incubación.

-*pH y conductividad eléctrica*, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente.

#### -*Carbono orgánico*

Método de Tyurin: oxidación del carbono orgánico con dicromato potásico por vía húmeda.

#### -*Nitrógeno*

Método de combustión en horno LECO (Truspec CN).

#### -*Fósforo asimilable*

Método de Olsen-Watanabe: extracción del P con bicarbonato sódico y determinación mediante colorimetría mediante desarrollo de color azul (complejo fosfomolibdico). El color se midió a una longitud de onda de 825 nm en un colorímetro marca Thermo Scientific.

#### -*Potasio asimilable*

El potasio asimilable se extrajo en columnas de percolación, empleando una solución extractora de acetato amónico 1N y de pH 7. El K asimilable se cuantificó por fotometría de llama en un fotómetro JENWAY.

#### -*Cu, Fe y Zn asimilable*

Los elementos traza se extrajeron con DTPA a pH... de acuerdo con el método de Lindsay y Norvell (1978). Los elementos se determinaron con ayuda de absorción atómica (Perkin-Elmer, modelo 1100B)

#### -*Carbonato cálcico equivalente*

Mediante volumetría de gases usando el método del Calcímetro de Bernard.

## **5.9. Determinaciones en planta**

### 5.9.1. Peso seco y fresco

La planta se extrajo de la maceta en los distintos tiempos de incubación, las raíces se limpiaron bajo chorro de agua y toda la planta se pesó eliminando mediante papel adsorbente el exceso de agua (peso fresco). Posteriormente se secó en una estufa a 60 °C y se volvió a pesar (peso seco).

### 5.9.2. Capacidad antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante (ABTS) la muestra se conservó congelada. Para poder llevar a cabo la medida, se realizó una digestión gastrointestinal *In vitro* (GAR), de forma que se liberen de una forma "fisiológica" aquellas especies antioxidantes que puedan ejercer su actividad en el cuerpo humano. La técnica empleada fue la utilizada por Miller, Schricker, Rasmussen y Van Camper (1981), modificada, incluyendo una etapa previa de

digestión oral (Rufián-Henares y Delgado-Andrade, 2009). Una vez terminada la digestión gastrointestinal *in vitro*, se separaron las fracciones solubles e insolubles.

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó con las dos fracciones obtenidas tras la digestión. La fracción soluble se empleó como tal para llevar a cabo la determinación de capacidad antioxidante con las diluciones adecuadas. Sin embargo, la fracción insoluble se liofilizó y se analizó siguiendo el método QUENCHER (Gokmen et al., 2009) que consiste en la agitación de la muestra sólida junto con los reactivos utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante. Todas las muestras fueron realizadas por duplicado para asegurar una mayor veracidad de los resultados obtenidos.

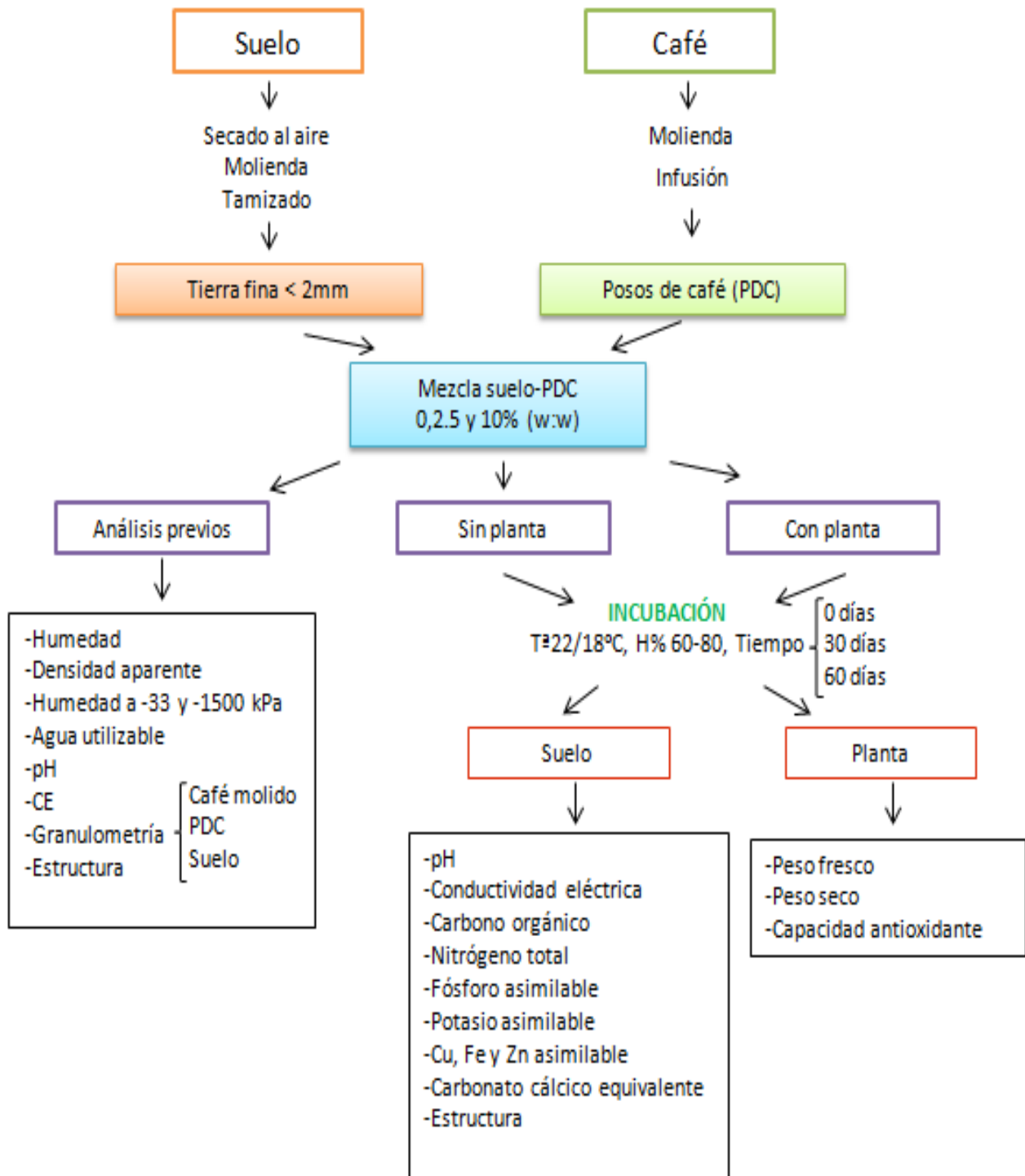
El método ABTS muestra la actividad antiradicalaria de la muestra y se llevó a cabo como se describe por Rufián-Henares y Delgado-Andrade (2009) con ligeras modificaciones. El ABTS<sup>+</sup> fue producido por la reacción de 7 mM de solución ABTS con persulfato potásico 2,45 mM y dejando la mezcla en reposo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 h antes de su uso. La solución ABTS<sup>+</sup> de trabajo (estable durante 2 días) se diluyó con una mezcla de etanol: agua (50:50) para una absorbancia de  $0,70 \pm 0,02$  a 730 nm. Se introducen 20 ml de muestra en cada pocillo y el inyector adiciona 280 ml de la solución de ABTS. Se utilizó la lectura a los 20 minutos para realizar los cálculos. Se utilizó una recta de calibración de trolox (0,15 a 1,15 mM). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox por g de muestra.

#### **5.10. Análisis morfológicos de la estructura del suelo**

El estudio se realizó en los peds menores de 2mm, con ayuda de un estereomicroscopio Olympus SZX12.



5.11. Esquema metodológico



## 6. Resultados

### 6.1. Características de los suelos, de los posos de café y de las mezclas suelo-posos de café previos al cultivo/incubación

De los resultados analíticos obtenidos en las mezclas de suelo-PDC, previos al experimento de cultivo (con planta) o la incubación (sin planta), en cámara climática (Tabla 1), se pueden comentar algunas cuestiones de interés.

**Tabla 1.** Resultados analíticos del ensayo de mezclas de suelos-PDC previo al cultivo/incubación

Muestra*	Grava	Arena	Limo	Arcilla	DA	H %	H %	Au	pH	CE <sub>25</sub>	
	H %	%	%	%	g/ml	-33 kPa	-1500 kPa	mm/cm	H <sub>2</sub> O	dS/cm	
V-0-0	4,06	2	12.1	29.9	58.0	1,2	26,4	15,6	1,3	8,2	1,3
V-2,5-0	-	-	-	-	-	1,15	28,9	17,59	1,3	7,9	1,5
V-10-0	-	-	-	-	-	1,09	32	22,8	1	7,6	1,6
R-0-0	3,07	6	38.8	18.0	43.2	1,27	20,03	11,7	1,09	7,2	0,6
R-2,5-0	-	-	-	-	-	1,24	22,2	12,6	1,2	7,1	0,6
R-10-0	-	-	-	-	-	1,17	27,5	16,9	1,24	6,5	0,7
Posos	54,33	-	-	-	-	0,49	118,34	110,39	0,39	5,8	4,6

\*Muestra= Suelo (V: Vega de Granada, R: Suelo Rojo) + Dosis de PDC adicionada (0, 2.5 y 10%) + Tiempo de incubación (0, 30 y 60 días). Los valores corresponden a la media de tres repeticiones. Arena: 2000-50µm; limo: 50-2µm; arcilla:<2µm. DA: densidad aparente. H: humedad. Au: agua utilizable. CE<sub>25</sub>: conductividad eléctrica a 25 °C.

Destaca la elevada humedad de los PDC secados al aire, que es unas diez veces mayor que la de los suelos secados al aire.

La granulometría de ambos suelos difiere: en el suelo de Vega los porcentajes de partículas finas (limo y arcilla) suponen casi el 90%, por el contrario, en el suelo Rojo los porcentaje de materiales finos son poco más del 60%. De acuerdo con esta granulometría, la clase estructural del suelo de Vega es arcillosa, y la del suelo Rojo se encuentra entre arcillosa y franco-arcillosa. La densidad aparente de estos suelos es de aproximadamente 1.2, algo mayor en el suelo rojo, más compacto. La densidad del café es de 0.49 y las mezclas de suelo-PDC lógicamente disminuyen su densidad conforme aumenta la proporción de PDC.

El % de humedad a la capacidad de campo (-33 kPa), es mayor en el suelo de Vega que en el suelo Rojo. Lo mismo ocurre con el agua retenida en el punto de marchitamiento permanente (-1500 kPa). Los PDC presentan unas muy elevadas humedades en ambos potenciales. Las mezclas lógicamente incrementan sus contenidos de humedad a los dos potenciales estudiados, conforme aumentan las proporciones de PDC. El agua útil para las plantas, calculada a partir de las humedades anteriores, tiene un comportamiento diferente entre

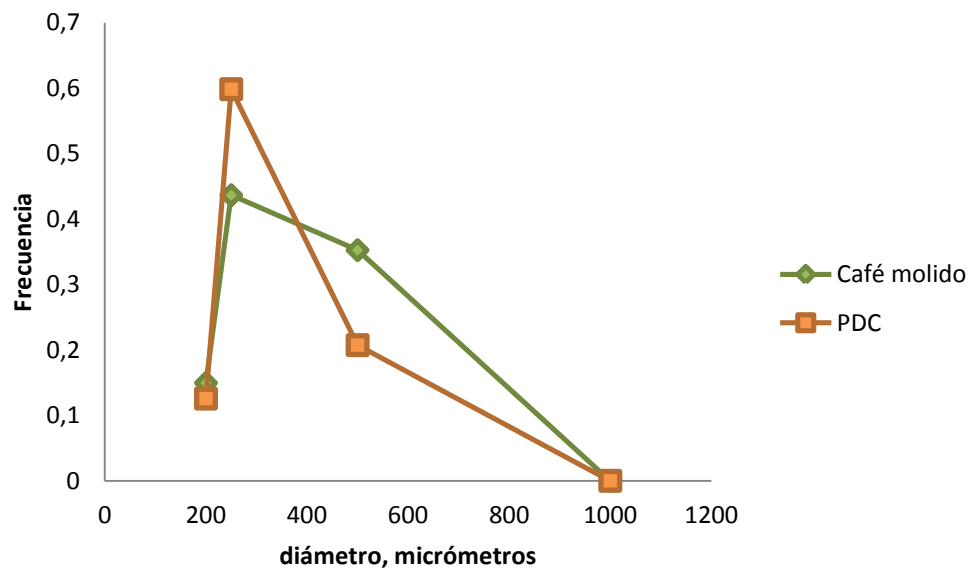
ambos suelos: disminuye cuando aumenta la cantidad de PDC adicionada, en el suelo de Vega y muestra un comportamiento contrario en el suelo Rojo.

El pH del suelo de Vega es de 8.2, claramente correspondiente a un suelo carbonatado, el del suelo Rojo es de 7.2, ya que no contiene prácticamente carbonatos. El café presenta un pH ligeramente ácido y el pH de las mezclas lógicamente van disminuyendo conforme aumenta la cantidad de PDC.

El comportamiento contrario ocurre con la CE, que es mayor en el caso de los PDC que en los suelos y por tanto, las mezclas incrementan su salinidad proporcionalmente a las cantidades adicionadas.

### Granulometría del café molido y PDC

La gráfica de distribución de tamaño de partículas del café molido y de los PDC (Figura 13) revela que la granulometría es algo diferente entre ambos. En el caso del café molido, el 35% de las partículas tienen un diámetro comprendido entre 500 y 1000  $\mu\text{m}$ ; el 44% entre 250 y 500  $\mu\text{m}$ ; el 15% entre 200 y 250  $\mu\text{m}$ ; y el resto (6%), tiene menos de 200  $\mu\text{m}$ . En los PDC, el 21% de las partículas se encuentra entre 500 y 1000  $\mu\text{m}$ ; el 60% entre 500 y 250  $\mu\text{m}$ ; el 12% entre 200 y 250  $\mu\text{m}$  y el resto (7 %), menos de 200  $\mu\text{m}$ . Por tanto, el café molido cuando se transforma en PDC, sufre un proceso de disminución de tamaño de partícula.



**Figura 13.** Distribución de tamaño de partícula del café molido y de los PDC.

### **6.2. Cantidades de agua añadidas para el riego de las plantas y el mantenimiento de los niveles de humedad en el suelo**

En la tabla 2 se recogen las cantidades de agua añadidas por día a los microcosmos edáficos para el mantenimiento de la humedad del suelo dentro de los márgenes establecidos en la metodología.



Las cantidades de agua añadidas se diferencian claramente en las dos modalidades del ensayo: incubación (sin planta) y cultivo (con planta). Las cantidades añadidas cuando se cultiva la planta son superiores en todos los casos a las del ensayo sin planta. También se aprecia que cuando más tiempo transcurre, en el caso del experimento sin planta, las cantidades añadidas por día parecen ser algo menores. Cuando se cultiva con planta, ocurre lo contrario, y las cantidades adicionadas como media a los 60 días son superiores a las correspondientes a 30 días.

En el ensayo con planta, las cantidades de agua requeridas cuando no se adicionan PDC son algo mayores que para las mezclas suelo-PDC. No se aprecia una diferencia clara entre las cantidades de agua adicionada en función de las cantidades de PDC añadidas.

**Tabla 2.** Cantidades de agua adicionadas por día de experimento

Muestra *	H <sub>2</sub> O por día (ml)	
	Sin planta	Con planta
V-0-30	5,25	14,47
V-0-60	3,99	17,70
V-2,5-30	5,60	11,97
V-2,5-60	4,18	16,55
V-10-30	6,21	10,51
V-10-60	4,65	14,95
R-0-30	4,81	12,35
R-0-60	3,79	14,60
R-2,5-30	5,26	11,06
R-2,5-60	4,58	12,74
R-10-30	6,09	10,72
R-10-60	5,30	13,19

\*Muestra= Suelo (V: Vega de Granada, R: Suelo Rojo glacis) + Dosis de PDC adicionada (0, 2.5 y 10%) + Tiempo de incubación (0, 30 y 60 días). Los valores corresponden a la media de tres repeticiones.

### **6.3. Evolución de las mezclas suelos-posos de café por cultivo/incubación, con y sin planta**

En las Tablas 2 y 3, se recogen los datos analíticos correspondientes a las mezclas suelo-PDC en los distintos tiempos de cultivo (con planta) o de incubación (sin planta). De estos datos se puede comentar lo siguiente:

#### *-pH*

La adición de PDC disminuye el pH del suelo proporcionalmente a las cantidades añadidas. La evolución de este parámetro con el tiempo de cultivo/incubación es muy similar en ambos suelos (Vega y Rojo): se produce un aumento del pH en los primeros 30 días y posteriormente una estabilización hasta los 60 días. No obstante, en el caso de ambos suelos sin adicionar y con planta, también se aprecia ese incremento, pero posteriormente el pH desciende levemente; esta última tendencia es algo más destacada en el suelo Rojo.

#### *-Conductividad eléctrica ( $CE_{25}$ )*

La adición de PDC incrementa la conductividad eléctrica del suelo proporcionalmente a las cantidades añadidas. En todos los casos adicionados con PDC, el comportamiento es muy similar: con el tiempo de cultivo/incubación, la CE tiende a disminuir hasta los 30 días y a partir de ahí se mantiene o se eleva levemente hasta los 60 días. En los suelos sin adicionar, el comportamiento es algo más irregular: se aprecia un descenso hasta los 30 días y a partir de ese tiempo, sube o baja dependiendo del caso. En el suelo rojo incubado sin adicionar PDC, se observa un comportamiento anómalo: la CE aumenta linealmente con el tiempo.

#### *-Carbono Orgánico (C.O)*

Las enmiendas con PDC aumentan los contenidos de C.O. proporcionalmente a las cantidades añadidas. Cuando los suelos no se adicionan, o se adicionan con pequeñas cantidades de PDC (2.5%), la evolución con el tiempo de ambos suelos es muy similar, tanto en cultivo como en incubación: con bajas adiciones de PDC (2.5%), el C.O. disminuye muy levemente entre 0 y 60 días, por el contrario, sin adiciones de PDC, el C.O. aumenta muy ligeramente. Con 10% de PDC añadido, el comportamiento entre ambos suelos difiere: con el tiempo de cultivo/incubación el C.O. se incrementa significativamente en el suelo de Vega y por el contrario disminuye, también significativamente, en el suelo Rojo.

#### *-Nitrógeno (N)*

Las cantidades de N. total en el suelo se incrementan con la adición de PDC y lo hacen de manera proporcional a las cantidades añadidas. Cuando no se adiciona PDC las cantidades de N se modifican muy levemente con el tiempo de cultivo/incubación. Cuando se adiciona PDC el comportamiento del N se parece al del C.O., antes descrito. Así, de 0 a 60 días se aprecia un incremento en el Suelo de Vega, y una tendencia hacia valores más bajos en el suelo Rojo.

#### *-Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)*

La C/N del suelo aumenta proporcionalmente a las cantidades de PDC añadidas. En los suelos sin adicionar, esta relación se mantiene estable durante el tiempo de cultivo/incubación, lo que se justifica teniendo en cuenta la evolución del C.O y del N, de forma independiente, antes descritas. En los suelos adicionados con 2.5% de PDC el comportamiento es siempre el mismo: disminuye entre 0 y 60 días y al final del ensayo sus valores se igualan a los del suelo sin adicionar. Cuando se adicionan cantidades de 10% de PDC, el comportamiento difiere entre ambos suelos: en el suelo de Vega aumenta a los 30 días y se estabiliza posteriormente, mientras que en el suelo Rojo disminuye levemente desde el inicio del experimento.

#### *-Fósforo asimilable (P asim.)*

El P asimilable se incrementa proporcionalmente con la adiciones de PDC. El comportamiento del P es muy similar en todos los casos ensayados. Hasta los 30 días se aprecia un descenso y a partir de ahí se mantiene estable o se incrementa levemente en algunos casos.

#### *-Potasio asimilable (K asim.)*

El K asimilable se incrementa con la adición de PDC proporcionalmente a la cantidad añadida. La tendencia general es a una disminución del K asim. con el tiempo de cultivo/incubación,

siendo algo más perceptible ese descenso en el caso del cultivo. Uno de los ensayos no encaja con la norma y es el del suelo Rojo adicionado con 10% de PDC, cultivado y con planta, donde se aprecia un ascenso significativo del K asim. entre los 30 y 60 días.

#### *-Carbonato cálcico equivalente*

La adición de PDC disminuye las cantidades de carbonato cálcico equivalente en las mezclas de suelo-PDC; al contener el suelo de Vega un porcentaje elevado de carbonato cálcico equivalente (39%, Tabla 2), la disminución proporcional de carbonato cálcico equivalente es menor que en el suelo rojo. La evolución de los carbonatos en las mezclas suelo-PDC ensayadas, cultivadas o incubadas, no sigue el mismo patrón en todos los casos. Se aprecian incrementos o disminuciones leves de los contenidos, que varían entre los tipos de suelos ensayados y también dentro del mismo tipo de suelo en función de la modalidad de cultivo o incubación. Por ejemplo: en el caso del suelo de Vega sin planta cuando no se adiciona PDC, se aprecia un incremento leve de los carbonatos con la incubación; cuando se adiciona 2.5% de PDC, los carbonatos aumentan hasta los 30 días, pero disminuyen entre 30 y 60 días y si se adiciona 10% de café, se produce una disminución muy leve entre 0 y 30 días y una disminución más apreciable entre 30 y 60 días.

#### *-Elementos traza*

##### *Cobre asimilable (Cu asim.)*

La adición de PDC incrementa proporcionalmente los niveles de Cu asimilable. El comportamiento del Cu asimilable es similar en todos los casos ensayados, con una disminución leve hasta los 30 días y una estabilización a partir de ese tiempo. Difiere algo, el comportamiento del Cu en el suelo Rojo sin adicionar, incubado y cultivado, donde se aprecia un aumento desde el tiempo 0 hasta los 60 días.

##### *Hierro asimilable (Fe asim.)*

La adición de PDC disminuye los niveles de Fe asimilable proporcionalmente a la cantidad adicionada. El comportamiento del Fe asimilable difiere claramente entre los dos tipos de suelo ensayados. En el suelo de Vega aumenta hasta los 30 días y posteriormente disminuye, tanto en el cultivo, como en la incubación. En el suelo Rojo incubado los contenidos de Fe asimilable se incrementan levemente desde el tiempo 0 hasta los 60 días. Cuando el suelo Rojo se cultiva se encuentran diferencias entre las distintas condiciones de ensayo: con 10% de PDC se aprecia una leve disminución hasta los 30 días y un incremento entre 30 y 60 días; en el suelo adicionado con 2.5% los valores se mantienen prácticamente constantes durante todo el experimento y en el suelo sin adicionar los contenidos de hierro se incrementan levemente a lo largo de todo el ensayo.

##### *Cinc asimilable (Zn asim.)*

La adición de PDC incrementa proporcionalmente los niveles de Zn asimilable. El comportamiento del Zn difiere algo entre ambos suelos. En el Suelo de Vega incubado, las cantidades de Zn asimilable disminuyen levemente con el tiempo de incubación en todos los casos. Por el contrario, en este mismo suelo cuando se cultiva la lechuga y se adiciona PDC, los niveles de Cinc asimilable se incrementan levemente con el tiempo de cultivo. En este mismo suelo, sin adicionar, el Cinc disminuye levemente hasta los 30 días y aumenta levemente hasta los 60 días, alcanzando los valores iniciales. En el Suelo Rojo adicionado con PDC, el

comportamiento del Zn es muy similar en el cultivo y en la incubación: se percibe una disminución lenta hasta los 30 días y una estabilización hasta los 60 días. En el suelo Rojo cuando no se adiciona PDC, el Cinc sube ligeramente entre 0 y 60 días.

*-Estructura del suelo*

La figura 22 es una composición de varios agregados estructurales donde se manifiesta la influencia de la adición de PDC a los suelos en la estructura. Se constata por vía óptica la incorporación de las partículas de PDC a los agregados de suelo, infiltrado en las superficies intrapedales; se trata de un claro proceso de melanización. Esta incorporación parece levemente mayor en el suelo de Vega que en el suelo Rojo.

**Tabla 2** .Resultados analíticos del ensayo de mezclas de suelos-PDC sin planta.

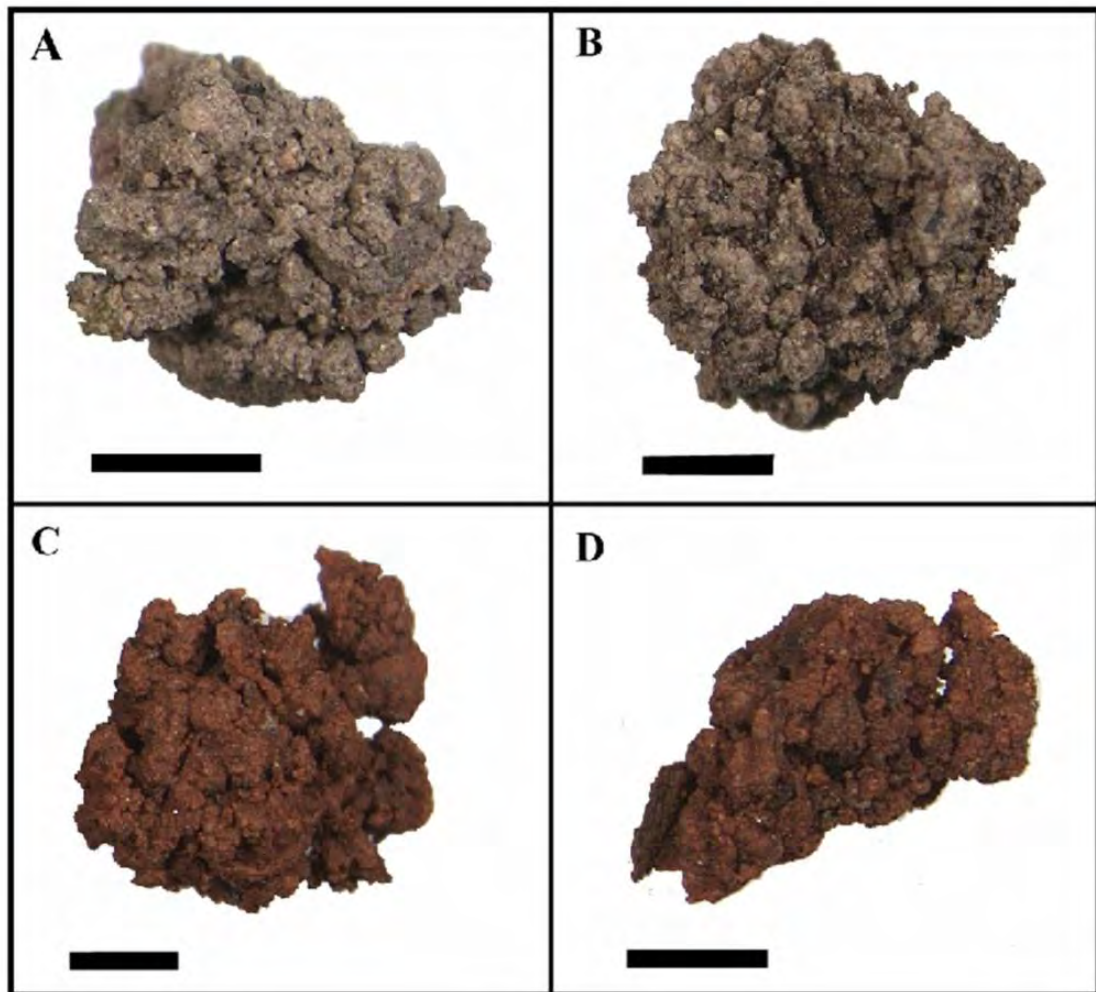
Muestra*	pH	CE dS/m	C.O. %	N %	C/N	K asim ppm	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> %	P asim ppm	Cu asim ppm	Zn asim ppm	Fe asim ppm
V-0-0	8,2	1,2	1,36	0,105	13	453	39	69	4,58	0,89	6,86
V-0-30	8,2	0,9	1,39	0,094	15	447	39,3	46	4,33	0,82	11,38
V-0-60	8,2	1	1,4	0,09	16	459	40,2	47	3,7	0,71	6,65
V-2.5-0	7,9	1,4	2,96	0,138	21	482	37,6	79	4,95	0,96	6,15
V-2.5-30	8,3	0,6	2,57	0,139	18	512	39	50	4,29	0,90	10,54
V-2.5-60	8,4	0,6	2,37	0,159	15	509	38,3	47	4,24	0,83	7,91
V-10-0	7,6	1,5	3,6	0,286	13	688	35,5	87	5,47	1,20	3,46
V-10-30	8	0,8	5,66	0,275	21	635	38	56	4,4	1,10	8,41
V-10-60	8,1	0,9	5,51	0,282	20	639	36	51	4,22	0,99	7,02
R-0-0	7,2	0,5	1,16	0,113	10	248	1,6	51	3,78	1,97	4,27
R-0-30	7,4	0,6	1,03	0,087	12	250	0,8	36	4,09	2,12	5,67
R-0-60	7,5	0,9	1,19	0,108	11	248	0,6	46	4,48	2,32	5,62
R-2.5-0	7,1	0,6	2,31	0,148	16	324	0,9	55	5,08	2,60	5,39
R-2.5-30	7,4	0,2	2,49	0,157	16	282	1,1	43	4,8	2,42	6,57
R-2.5-60	7,5	0,3	1,87	0,155	12	289	0,6	46	4,28	2,18	6,85
R-10-0	6,5	0,6	6,61	0,314	21	482	0,8	64	6,74	3,38	6,46
R-10-30	6,8	0,3	5,36	0,274	20	405	1	46	4,60	2,37	7,88
R-10-60	6,7	0,3	5,54	0,291	19	423	1,1	51	4,69	2,16	8,45
Posos	5,76	4,5	59,38	1,867	32	3072	0	228	47,63	14,87	8,21

\*Muestra= Suelo (V: Vega de Granada, R: Suelo Rojo glacis) + Dosis de PDC adicionada (0, 2.5 y 10%) + Tiempo de incubación (0, 30 y 60 días). Asim: asimilable. Los valores corresponden a la media de tres repeticiones.

**Tabla 3.** Resultados analíticos del ensayo de mezclas de suelos-PDC con planta.

Muestra*	pH	CE dS/m	C.O. %	N %	C/N	K asim ppm	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> %	P asim ppm	Cu asim ppm	Zn asim ppm	Fe asim ppm
V-0-0	8,2	1,2	1,36	0,105	13	453	39,0	69	4,58	0,89	6,86
V-0-30	8,5	0,59	1,52	0,140	11	368	41,1	64	3,97	0,79	10,18
V-0-60	8,4	0,39	1,64	0,133	12	301	41,3	64	4,40	0,87	8,62
V-2.5-0	7,9	1,4	2,96	0,138	21	482	37,6	79	4,95	0,96	6,15
V-2.5-30	8,4	0,64	2,88	0,190	15	481	41,9	65	4,40	1,02	10,22
V-2.5-60	8,4	0,58	2,54	0,259	10	446	39,8	62	4,45	1,10	8,39
V-10-0	7,6	1,5	3,6	0,286	13	688	35,5	87	5,47	1,20	3,46
V-10-30	8,0	0,64	5,25	0,324	16	619	36,3	73	4,89	1,27	8,67
V-10-60	8,1	0,58	5,48	0,349	16	446	38,1	79	4,56	1,28	6,59
R-0-0	7,2	0,5	1,16	0,113	10	248	1,6	51	3,78	1,97	4,27
R-0-30	7,8	0,17	1,37	0,109	13	214	0,94	52	4,37	2,26	5,29
R-0-60	7,5	0,20	1,39	0,123	11	189	0,91	49	4,47	2,18	5,05
R-2.5-0	7,1	0,6	2,31	0,148	16	324	0,9	55	5,08	2,60	5,39
R-2.5-30	7,4	0,27	2,31	0,184	13	298	1,0	52	4,54	2,32	5,33
R-2.5-60	7,4	0,26	1,39	0,155	9	282	1,5	51	4,51	2,26	5,04
R-10-0	6,5	0,6	6,61	0,314	21	482	0,8	64	6,74	3,38	6,46
R-10-30	6,8	0,32	4,12	0,309	13	324	1,1	55	4,76	2,47	6,21
R-10-60	6,6	0,36	4,19	0,275	15	381	0,9	53	4,91	2,56	7,19
Posos	5,8	4,5	59,4	1,867	32	3072	0	228	47,63	14,87	8,21

\*Muestra= Suelo (V: Vega de Granada, R: Suelo Rojo glacia) + Dosis de PDC adicionada (0, 2.5 y 10%) + Tiempo de incubación (0, 30 y 60 días). Asim: asimilable. Los valores corresponden a la media de tres repeticiones.



**Figura 14.** Imágenes estereomicroscópicas de peds. A: Suelo de Vega sin PDC, 60 días de incubación. B: Suelo de Vega con 10% de PDC, 60 días de incubación. C: Suelo Rojo sin PDC, 60 días de incubación. D: Suelo Rojo con 10% de PDC, 60 días de incubación. (La barra de escala corresponde a 1 mm).

#### 6.4. Evolución de las plantas de lechuga durante el ensayo de cultivo

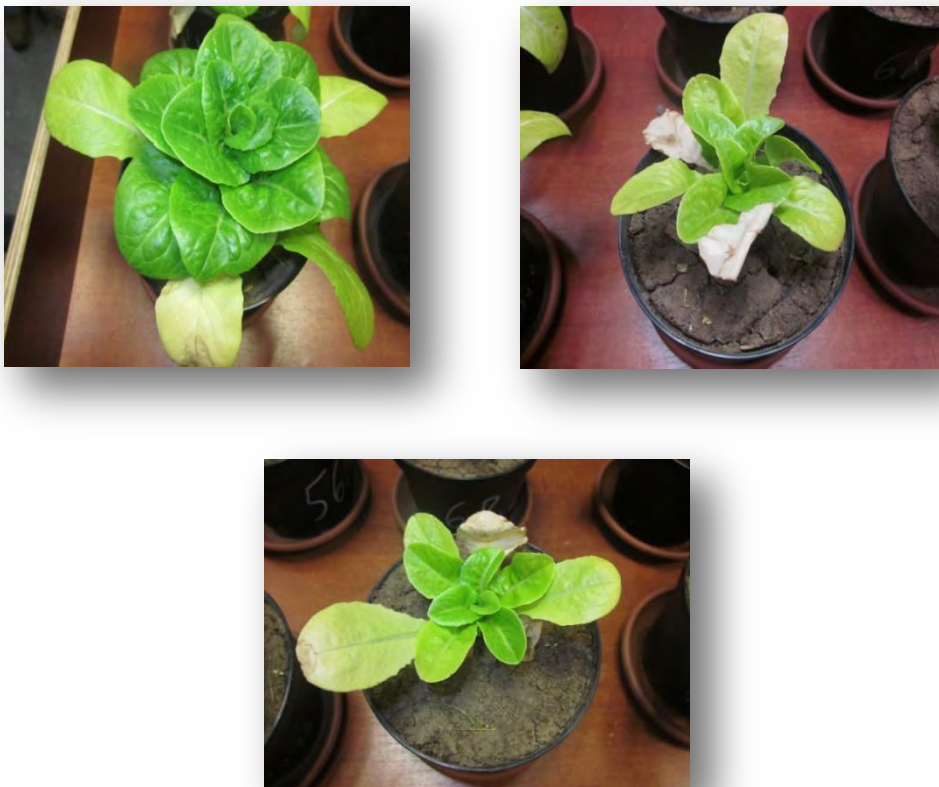
Como primer resultado debemos destacar que la adición de PDC aún en cantidades bajas (2.5%) en ambos suelos, inhibe el crecimiento de las plantas de lechuga (Figura 15 y 16). La inhibición tal y como se deduce de las gráficas de peso fresco y seco (Figuras 17, 18, 19 y 20), parece ser mayor en el suelo Rojo que en el suelo de Vega.

##### 6.4.1. Peso fresco y peso seco

*Peso fresco:* la Figura 17 y 18, recogen la evolución del peso fresco (con agua) de las lechugas en el suelo de Vega y en el suelo Rojo, respectivamente.

En el Suelo de Vega sin adición de café, se aprecia un incremento lineal del peso fresco hasta los 60 días (de 8 a 21 g). Por el contrario, cuando se adiciona PDC, el peso fresco disminuye levemente hasta el fin del experimento, aunque a los 30 días parece iniciarse un ligero incremento hasta los 60 días, algo más destacado en el caso V-2.5.

En el Suelo Rojo sin adicionar, los incrementos son menores que en el caso del Suelo de Vega, alcanzando a los 60 días un peso de 17 g. Cuando se adiciona café el efecto inhibitor es mayor que en el caso del Suelo de Vega. Así mismo, a los 30 días parece iniciarse un ligero remonte hasta los 60.

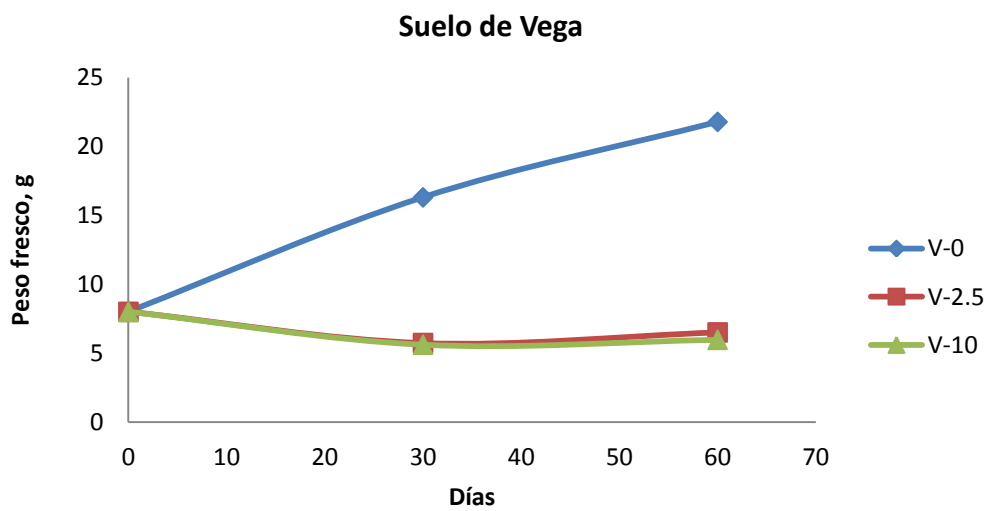


**Figura 15.** De izquierda a derecha y de arriba a abajo: Muestras V-0, V-2.5 y V-10, todas a los 45 días de cultivo.

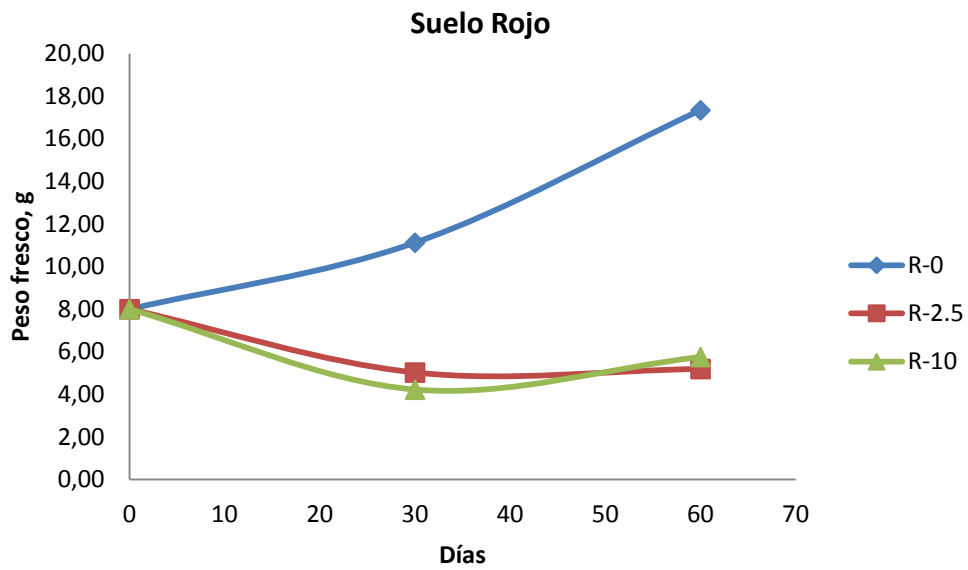




**Figura 16.** De izquierda a derecha y de arriba abajo: Muestras R-0, R-2.5 y R-10, todas a los 45 días de cultivo.

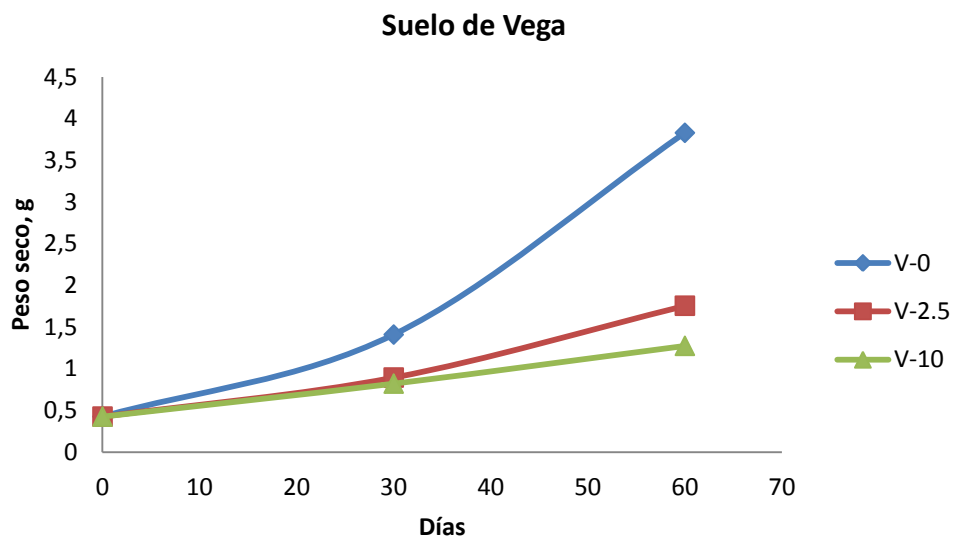


**Figura 17.** Evolución del peso fresco de las lechugas cultivadas en el Suelo de Vega.

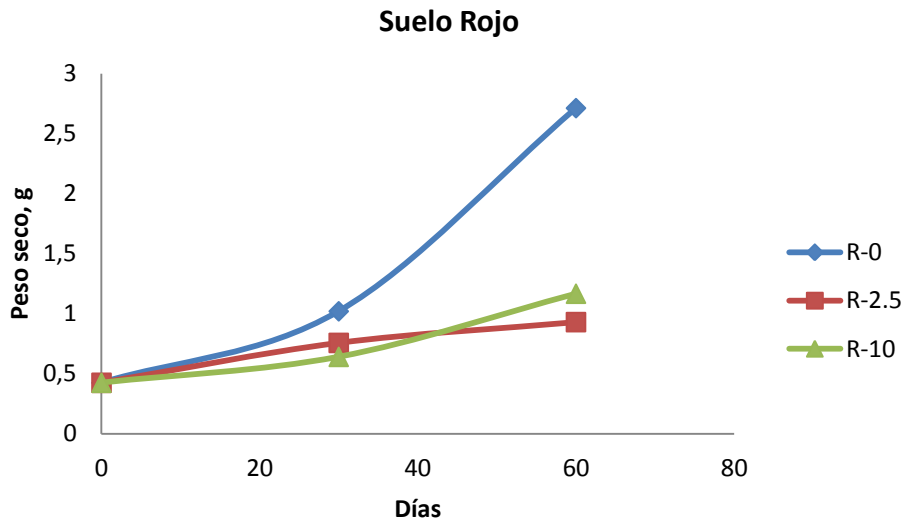


**Figura 18.** Evolución del peso fresco de las lechugas cultivadas en el Suelo Rojo.

*Peso seco:* el peso seco (Figuras 19 y 20) sigue una tendencia parecida en los suelos sin adicionar, tanto en el caso del suelo de la Vega como en el suelo Rojo. En el caso de los suelos adicionados de café, aunque la planta fresca no incrementa su peso, pero si existe una mayor absorción de elementos minerales que se refleja en incrementos pequeños en el peso seco desde 0 a 60 días.



**Figura 19.** Evolución del peso seco de las lechugas cultivadas en el Suelo de Vega.

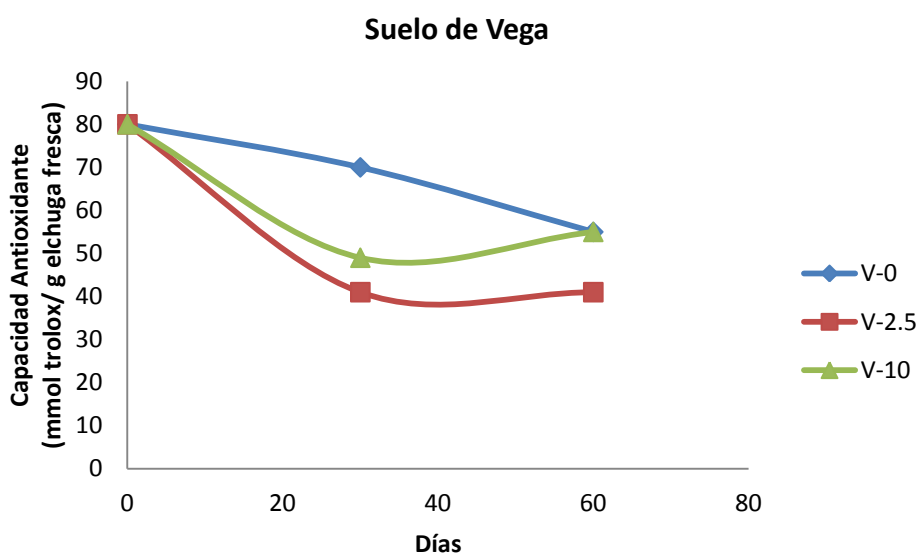


**Figura 20.** Evolución del peso seco de las lechugas cultivadas en el Suelo Rojo.

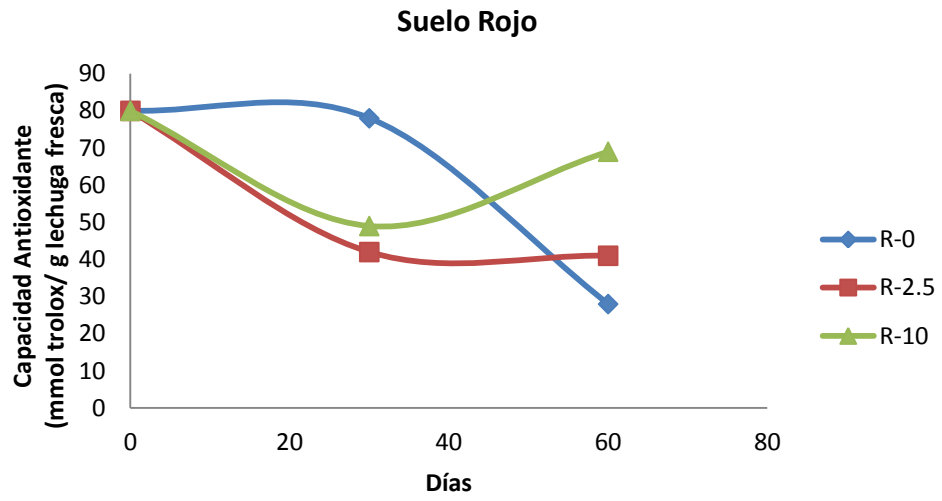
#### 6.4.2. Capacidad antioxidante

En las Figuras 21 y 22, se representa la evolución de la capacidad antioxidante de las plantas de lechuga durante el ensayo de cultivo, en suelo de Vega y en suelo Rojo.

En ambos suelos sin adicionar de PDC, la capacidad antioxidante disminuye con el tiempo de cultivo, siendo esta disminución más acusada en el caso del suelo Rojo. Cuando los suelos se adicionan con PDC, las plantas de lechuga, disminuyen hasta los 30 días de forma brusca su capacidad antioxidante, pero a partir de esa fecha se aprecian en ambos suelos incrementos de dicha capacidad; en el suelo Rojo, a los 60 días, esa capacidad antioxidante, incluso supera a la del suelo sin adicionar, sobre todo cuando la ajiación es de 10% de PDC.



**Figura 21.** Evolución de la capacidad antioxidante de las lechugas cultivadas en el Suelo de Vega



**Figura 22.** Evolución de la capacidad antioxidante de las lechugas cultivadas en el Suelo Rojo

## 7. Discusión

### 7.1. Influencia de los posos de café en las propiedades físicas del suelo

Cuando se mezcla el suelo con PDC se observa una disminución de la densidad aparente de la mezcla, debido a que la densidad de los PDC es menor que la densidad aparente del suelo (Tabla 1). El efecto sobre la densidad aparente de los PDC no está descrito en la bibliografía referente al uso de los PDC como enmienda, pero sí está descrito para otras enmiendas orgánicas (Khaliq y Abbasi, 2015).

La adición de PDC al suelo, aumenta el porcentaje de agua retenida a los distintos potenciales estudiados (-33 y -1500kPa) (Tabla 1). Esto se debe a que los PDC tienen un porcentaje de humedad más alto en ambos potenciales. Por tanto, los PDC incrementan la capacidad de retención de agua a -33 y -1500 kPa del suelo. Esto concuerda con Kasongo et al. (2011), que lo atribuyen a una mejora de la estructura del suelo, como resultado de un aumento del contenido de materia orgánica. Este efecto beneficioso sobre las propiedades físicas también ha sido encontrado por otros autores con otras enmiendas orgánicas (Khaliq y Abbasi, op.cit). No obstante, cuando se calcula el agua utilizable por las plantas, el efecto de los PDC difiere entre los dos tipos de suelo ensayados: la incorporación de PDC supone pequeños incrementos en el agua utilizable en el caso del suelo Rojo, pero pequeñas pérdidas de la misma en el caso del suelo de Vega. Este hecho se puede explicar porque el agua utilizable se calcula a partir del agua retenida a -33 kPa y del agua retenida a -1500 kPa; en el caso del suelo de Vega este balance resulta negativo. En la bibliografía sobre las enmiendas con residuos de café no se hace referencia al dato del agua utilizable por las plantas, sino a la retención de agua.

Con respecto a la influencia de la adición de PDC sobre la estructura del suelo, en la presente memoria sólo se ha realizado una observación visual en un estereomicroscopio (lupa binocular). Con las fotografías de lupa binocular (Figura 14), podemos deducir que las partículas de café interactúan con las partículas sólidas del suelo, y se genera una estructura diferente tanto en el cultivo como en la incubación. Esta interacción hace que los nuevos agregados de suelo en presencia de PDC, contengan en su interior partículas de PDC dispuestas en forma de películas que siguen el patrón de agrietamiento propio del suelo. Esta incorporación de material orgánico al suelo, se puede entender como un proceso beneficioso en la formación de la estructura. Esta afirmación se corroboró durante todo el experimento cuando se manipulaba el material de suelo para su estudio, donde se comprobó que los suelos con adición de PDC, se fragmentaban con menor dificultad en pequeños agregados que los suelos que no habían sido adicionados con PDC. En la bibliografía consultada sobre la adición de PDC al suelo (Kasongo et al., 2011, Kasongo et al., 2013 y Yamane et al., 2014) se corroboran las observaciones de este experimento. Aunque los autores citados hablan de forma general de una mejora de las propiedades físicas del suelo, que se traduce en una mayor capacidad de retención de agua, de aireación, etc.

## 7.2. Influencia de los posos de café en las propiedades químicas y físicoquímicas del suelo

La adición de PDC sobre los suelos ensayados produce una disminución del pH, ya que el pH de los PDC es más ácido que el pH de los suelos (Tabla 1). Esto no coincide con los trabajos de Kasongo et al. (2011), Kasongo et al. (2013) y Morikawa y Saigusa (2008), que observan el efecto contrario, es decir, cuando agregan residuos de café, el pH del suelo aumenta. En el caso de estos autores se debe a que el pH de los residuos es más básico que el pH del suelo. Durante el tiempo de cultivo/incubación, Kasongo et al. (2011) y (2013), observan un incremento del pH, lo que coincide con nuestros resultados (Tabla 3). Sin embargo, Morikawa y Saigusa (2008), observaron que durante el periodo de cultivo disminuyó el pH de los suelos, hecho que no interpretan, porque el objetivo de ese trabajo fue la biofortificación con Fe en el arroz.

Los PDC tienen mayor contenido en sales que los suelos, por tanto, la adición de PDC, incrementa la salinidad de las mezclas suelo-PDC. En la bibliografía sobre adición de PDC no se han encontrado datos al respecto. En el experimento *in vitro*, objeto de esta memoria, la CE en todos los casos sufre un descenso con el cultivo/incubación, principalmente en los primeros 30 días. El incremento de la CE por la adición de PDC y la disminución posterior por cultivo/incubación, tienen importancia desde el punto de vista agronómico-ambiental, como discutiremos a continuación.

Las clasificaciones más antiguas de los suelos establecían el límite de salinidad en una CE de 4  $\text{dS m}^{-1}$ , pero desde hace ya muchos años y a propuesta de la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo, el límite de salinidad se establece en una CE de 2  $\text{dS m}^{-1}$  (Bohn, 1979), ya que muchas plantas se ven afectadas por una salinidad de esa índole. En suelos de baja salinidad (baja CE, 0.5, Tablas 3 y 4), como es el caso del suelo Rojo ensayado, la adición de PDC no supone riesgo ninguno, en lo que se refiere a este factor limitante para las plantas. Por el contrario, en el caso del suelo de Vega, donde la CE es de 1.2  $\text{dS m}^{-1}$  (Tablas 3 y 4) la adición de elevadas cantidades de PDC supone un incremento de hasta 1.5  $\text{dS m}^{-1}$  lo que ya se va acercando peligrosamente al límite para algunas plantas sensibles. Es por ello que las adiciones de PDC a los suelos tienen que tener en cuenta este parámetro. Como se ha comentado anteriormente, a partir de los valores iniciales de CE se produce un descenso de la misma con el paso del tiempo, lo que es muy positivo desde el punto de vista de la utilización de los PDC como enmienda orgánica. Cuando se cultiva la lechuga, en el presente ensayo, el descenso de la CE observado puede ser atribuido a la absorción de iones por las plantas ya que se trata de un sistema cerrado. En el caso de los microcosmos donde no se cultiva planta, este descenso debe ser atribuido a que la transformación de los restos orgánicos por efecto del riego conduce hacia un complejo de cambio con una mayor capacidad de intercambio catiónico que retendría más iones. Este efecto también puede ser aplicable al caso de los microcosmos cultivados. No tenemos soporte experimental sobre el aumento de la capacidad de cambio, pero se encuentra descrito en Kasongo et al., (2013).

La aplicación de PDC a los suelos ensayados incrementa los contenidos de C.O. y N debido al mayor contenido de estos dos elementos en los PDC (Tablas 3 y 4). Durante el tiempo de

cultivo/incubación, los valores se mantienen constantes u oscilan levemente hacia arriba o hacia abajo a excepción del suelo de Vega incubado y cultivado cuando se adiciona 10% de PDC (Tablas 3 y 4). El incremento de C.O. puede constituir el principal interés de los PDC como enmiendas al suelo y por lo que se clasifican como enmiendas orgánicas (Liu y Prince, 2011).

Kasongo et al. (2013), observaron que el contenido de C.O. y N en suelos adicionados con residuos de café, después de tres meses incrementaba y lo atribuyen a una progresiva mineralización de los residuos de café durante el ciclo de crecimiento de la planta. Este efecto también fue observado por Kasongo et al. (2011) y Yamane et al. (2014) y este último sugiere que el incremento significativo del carbono total durante el tiempo de incubación deriva del C orgánico insoluble de los residuos de café y que el incremento de N total en el suelo se debe a la acumulación de N insoluble. En nuestro caso los incrementos de C.O. que se producen en el suelo de Vega cuando se adiciona 10% de PDC, podría explicarse por un incremento de las cantidades oxidables con dicromato potásico (técnica empleada en la determinación de carbono orgánico, capítulo 5, apartado 5.8.2), con el cultivo o la incubación, ya que no existe otro hecho que lo justifique. Si acaso, con el cultivo, algo de la masa radicular, puede arrancarse durante la extracción de la lechuga e incorporarse al suelo, pero esto no es aducible en el caso de la incubación. No hemos encontrado bibliografía que avale esta hipótesis.

Con respecto a la relación C/N, la adición de PDC a los suelos ensayados, en el tiempo 0, incrementa esta relación, ya que los valores de C/N son casi tres veces superiores en el PDC que en el suelo (Tablas 3 y 4). En la bibliografía sobre la adición de residuos de café al suelo, los distintos autores consultados (Kasongo et al., 2011, Kasongo et al., 2013 y Yamane et al., 2014), señalan que con el paso del tiempo la relación C/N va disminuyendo. En nuestro caso, si bien el tiempo de incubación es menor que los reportados en el caso de la bibliografía citada, ya a los 60 días (tiempo máximo ensayado), en la mayoría de los casos se observa también una disminución de la relación C/N. Esto puede explicarse porque la materia orgánica se va mineralizando (pierde C por oxidación con génesis de CO<sub>2</sub>) paulatinamente, mientras que algunas moléculas ricas en N se van acumulando en el suelo. Este proceso, conocido como humificación, está muy estudiado en la Edafología clásico y no necesita de apoyo bibliográfico.

En cuanto a la evolución de la relación C/N con el cultivo/incubación, hay un caso que se sale de la norma, y es el del suelo de Vega cuando se adiciona 10% de café. Se observa que la relación C/N aumenta hasta los 30 días y posteriormente disminuye, aunque a los 60 días sus valores siguen siendo superiores a los del tiempo inicial. No obstante, la tendencia de los datos (Tabla 3 y 4), nos señala que es hacia la disminución y por tanto, suponemos que con el tiempo la C/N disminuirá hasta valores inferiores a los iniciales. En la bibliografía sobre residuos de café no se encuentra una evolución de la C/N parecida a la descrita, por ello solamente se puede emitir una hipótesis. Cuando se estimula la actividad biológica del suelo por riego, los microorganismos consumirían preferentemente la materia orgánica propia del suelo, cuya C/N es de 13 (Tablas 3 y 4). Cuando hayan consumido la parte más mineralizable de la materia orgánica entonces consumirían los residuos del café. De esta manera, en una primera etapa, la C/N se incrementaría y posteriormente disminuiría. Esto no ocurre en el caso del suelo Rojo, porque el contenido en materia orgánica es menor y su C/N también es menor; se trataría de una materia orgánica menos utilizable por los microorganismos del suelo. Así

mismo, la explicación del aumento de carbono orgánico oxidable, aducido en la discusión sobre el C.O., podría ser aplicable en este caso.

El P se ve claramente incrementado con la adición de PDC, dado que estos residuos contienen mayor cantidad de P asimilable que los suelos (Tablas 3 y 4). Este es un punto a favor de la adición de PDC a los suelos de cultivo, ya que el P es un elemento escaso y en los suelos carbonatados, como es el caso de nuestra región, tiene un problema de asimilabilidad ya que tiende a precipitar en forma de carbonato cálcico. Este proceso de inmovilización del P asimilable del suelo, conocido como retrogradación, ha sido ampliamente reportado en la bibliografía y tratado como tema general en libros de consulta (Navarro, 2013).

La evolución del P, con disminuciones desde el tiempo 0 hasta los 30 días en la mayor parte de los casos, es fácil de interpretar en este experimento y se debe a ese proceso de retrogradación antes mencionado. En el caso del cultivo, la pérdida de P asimilable se debe a la absorción de P por la planta. No obstante, cuando se adiciona cantidades elevadas de café 10%, se percibe un leve aumento de ese P a partir de los 30 días, aumento que puede deberse a la alteración de los posos de café que contienen fósforo. Nuestros resultados coinciden con los de la bibliografía (Kasongo et al., 2011), donde en las primeras etapas hay una disminución del P, y posteriormente se produce un incremento que los autores consultados justifican también por la transformación de los residuos del café.

Se observa un incremento del contenido en K asimilable en el suelo cuando se adicionan PDC, lo que se debe a que los PDC tienen más K asimilable que los suelos (Tablas 3 y 4). Este resultado coincide con Kasongo et al. (2011) y Cruz et al. (2013) que también encuentran una relación directamente proporcional entre la cantidad de residuos de café añadidos y el K asimilable en el suelo. Estos autores lo explican de la misma manera. Este incremento del K asimilable es una característica de los PDC importante desde un punto de vista de la fertilidad del suelo.

En el ensayo *in vitro* objeto de esta memoria, con el tiempo de cultivo/incubación, el K asimilable disminuye en el suelo. Esto se contradice con lo encontrado en Kasongo et al. (2011), el cual observa un aumento del K asimilable en el suelo durante el tiempo de cultivo. La disminución de K con el tiempo de cultivo/incubación, encontrada en el presente ensayo, puede ser atribuida en el caso del cultivo, a la absorción de K por las plantas. Lo cual es un hecho indiscutible. Pero también encontramos una disminución de K cuando el suelo se incubaba sin planta, y aquí no se puede aducir la absorción por parte de la planta. Este hecho habría que interpretarlo como una retrogradación del K por entrada en la interlámina de las micelas, con la consiguiente reconstrucción del mineral, tal y como se reporta en la edafología clásica (Birkeland, 1999). En el presente trabajo no se dispone de pruebas experimentales de esta hipótesis.

Tal y como se ha expuesto en el capítulo de los resultados (capítulo 6, apartado 6.3), el comportamiento del contenido de carbonato cálcico equivalente, sigue un patrón irregular en los distintos casos ensayados. En la bibliografía sobre la adición de café al suelo (Kasongo et al. 2011, Kasongo et al., 2013 y Yamane et al., 2014), no se trata el tema de los carbonatos,



porque los PDC no tienen carbonatos ni los suelos ensayados por estos autores tampoco, ya que se trata de suelos tropicales sometidos a una alta pluviometría, donde los carbonatos en la inmensa mayoría de los casos se han eliminado por disolución y lavado. En la presente memoria, se ha corroborado que los PDC no contienen carbonatos (tablas 3 y 4), pero los suelos ensayados sí. Concretamente el suelo de Vega, contienen grandes proporciones de ellos (39 %, Tablas 3 y 4).

En los suelos con carbonatos (microcosmos elaborados a partir del suelo de Vega), la disminución del contenido de carbonatos tras un proceso de estimulación de la actividad biológica como supone la adición de materia orgánica y de agua, es fácilmente explicable y está muy sustentada por la bibliografía clásica. Pero, el incremento de carbonatos, que sucede en el suelo de Vega, cuando no se adiciona o se adiciona 2.5%, es difícil de explicar. No existe un *input* de carbonatos procedente de una fuente externa, ya que incluso el riego de los microcosmos se realizó con agua desionizada. Se han publicado muchos trabajos sobre la formación de carbonatos por bacterias del suelo (Delgado et al., 2008). En este momento no se dispone de datos sobre la actividad biológica desarrollada durante este ensayo, ni tampoco sobre si existe actividad bacteriana que fije el carbono en forma de carbonatos. No obstante, esta sería la única explicación plausible para los incrementos de carbonatos encontrados en esas condiciones del experimento.

Cuando se adiciona PDC, la cantidades de Cu y Zn asimilables aumentan y ello se debe a que los PDC son más ricos en estos dos elementos traza que los suelos adicionados (Tablas 3 y 4). El Cu y Zn, durante el tiempo de incubación/cultivo disminuyen, a excepción del suelo Rojo sin adición de café. En el caso del cultivo, la disminución se puede atribuir a la absorción de Cu y Zn por las plantas, pero en el caso de incubación sin planta esta explicación no es posible. La disminución en ausencia de planta puede atribuirse al incremento paulatino del pH desde el tiempo 0 que se produce en el suelo Rojo sin adición de café porque la asimilabilidad del Zn y del Cu disminuye con el aumento del pH, tal como señala Adriano (2001). Esta interpretación coincide con la de Kasongo et al. (2013). En el caso del suelo Rojo sin adición de café, la evolución positiva del Zn y del Cu asimilable se puede atribuir, por la misma razón aducida anteriormente, a que durante el periodo de incubación/cultivo a partir de los 30 días, el pH tiende a disminuir.

Los contenidos de Fe asimilable en los suelos ensayados disminuyen cuando se adicionan PDC, lo que se debe a que el contenido en Fe asimilable de los PDC es menor que el correspondiente de los suelos (Tablas 3 y 4). El comportamiento del Fe durante el tiempo de cultivo/incubación difiere entre los dos suelos empleados en el experimento, pero en ambos casos, la asimilabilidad del Fe parece seguir un patrón inverso a lo que indica la bibliografía (Adriano, 2001; Kasongo et al., 2013). De acuerdo con estos autores los aumentos del pH suponen disminuciones del Fe asimilable. En nuestro experimento, cuando aumenta el pH aumenta la asimilabilidad de Fe y cuando disminuye lo hace igualmente, salvo en el caso del suelo Rojo con planta y adicionado de 10% de café, donde el comportamiento es perfectamente atribuible al pH. Para justificar este comportamiento irregular del Fe asimilable, podíamos pensar en algún efecto ligado a los óxidos de Fe ( $Fe^{3+}$ ) muy abundantes en los suelos mediterráneos y especialmente en los suelos rojos. Cuando los suelos se riegan en cantidades

cercanas a la capacidad de campo y se adiciona materia orgánica, se puede alterar el equilibrio  $E_h$ -pH, que es el que podría controlar la solubilidad del Fe ( $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ ). Este proceso se describe en libros clásicos de Edafología (Bohn et al. 1979), pero no tenemos datos sobre el potencial redox ( $E_h$ ) durante el experimento.

### **7.3. Influencia de los posos de café sobre el crecimiento y capacidad antioxidante de la planta**

En el presente ensayo se ha observado que la aplicación de PDC sobre el suelo tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la lechuga (Figuras 17 y 18). Esto coincide con Yamane et al. (2004), los cuales observaron que la aplicación de residuos de café limita el crecimiento de la planta cultivada y lo atribuyen a la presencia en éstos de cafeína, taninos o fenoles, los cuales son compuestos tóxicos para las plantas. Por el contrario, Kasongo et al. (2013), demuestran que los residuos de café incrementan la producción de raigrás, lo que atribuyeron al efecto positivo que tienen los residuos sobre la capacidad de retener agua y nutrientes del suelo (N, C.O., P), todo ellos factores que contribuyen a incrementar la producción vegetal.

En agronomía, clásicamente (Urbano, 2001), se conoce que la adición de restos orgánicos con una elevada relación C/N, tiene un efecto inhibitorio sobre las plantas en los tiempos iniciales. Este efecto negativo se atribuye a que estos restos orgánicos estimulan el crecimiento de los microorganismos para su degradación, los cuales necesitan N para ello, y lo toman del suelo preferentemente a las raíces de las plantas, que, por tanto, sufren un déficit de N que impide su crecimiento. Esto podría justificar el inicio de remonte de ese crecimiento que las lechugas tienen aproximadamente a partir de los 30 días (Figura 17 y 18). Aunque esta hipótesis no se encuentra planteada en la bibliografía sobre adición de PDC al suelo, sino que el efecto inhibitorio se atribuye exclusivamente a la presencia de sustancias tóxicas.

Esta inhibición del crecimiento de la lechuga, que se manifiesta claramente en la evolución del peso fresco (Figuras 17 y 18), contrasta con la evolución del peso seco de las mismas lechugas (Figuras 19 y 20) que nos indica que las plantas aumentan su peso seco a lo largo de todo el experimento en cualquiera de las mezclas (0, 2.5 y 10% de PDC). Si bien, el aumento del peso seco cuando no se adiciona PDC es mucho mayor debido al efecto inhibitorio de los PDC antes mencionado. El aumento del peso seco podría justificarse por un estrés hídrico, que obligaría a la planta a acumular sales minerales para mejorar su capacidad de absorción de agua (Urbano, 2001). No obstante, el cultivo de la planta se ha realizado en condiciones controladas de humedad, por lo tanto el estrés hídrico no es una explicación plausible. Otra hipótesis para explicar la acumulación de sales minerales en las planta de lechuga sería tener en cuenta que, según los datos de Rufián-Henares y de la Cueva, (2009) los PDC tienen un alto contenido en sustancias quelantes: polifenoles, melanoidinas..etc. De acuerdo con esto, dichos compuestos facilitarían el transporte de elementos nutrientes a la planta, lo cual podría ayudar a la acumulación de estos en la planta, lo que se traduciría en un aumento del peso seco. Es este un tema de mucho interés desde un punto de vista agronómico, que requiere de más investigación.

En cuanto a la capacidad antioxidante de las lechugas, en el presente ensayo, se observó que con la adición de PDC, se produjo una disminución de la capacidad antioxidante hasta los 30 días, pero con un posterior aumento hasta el final del experimento (Figuras 21 y 22). Este resultado no coincide con lo indicado por Cruz et al., (2014), que observan lo contrario: cuando se aumenta la adición de PDC, de 2.5% a 30%, se incrementa la capacidad antioxidante, lo que atribuyen a que la adición de PDC en el suelo produce un efecto de estrés en la lechuga y como consecuencia la planta responde a este efecto, produciendo una mayor cantidad de compuestos fenólicos y en consecuencia, aumentando su capacidad antioxidante. No se dispone de una hipótesis concreta para explicar el comportamiento de la capacidad antioxidante de la lechuga en este experimento, por lo que debe de ser objeto de futura investigación.

## 8. Conclusiones

Del experimento *in vitro* de adición de posos de café a dos suelos mediterráneos, en condiciones controladas en una cámara climática, con cultivo de lechugas, o en suelo sin cultivar, se han extraído las siguientes conclusiones:

1. La adición de PDC mejora la fertilidad química del suelo: aumenta la cantidad de C.O, N, P, K, y de algunos micronutrientes.
2. La adición de PDC mejora algunas propiedades físicas del suelo, entre las que podemos citar: disminución de la densidad aparente, aumento de la capacidad de retención de agua, y en general, una mejora de la estructura.
3. La adición de PDC al suelo en cantidades de 2.5 y 10% (w:w) inhibe el crecimiento de las plantas. El efecto inhibitorio va desapareciendo con el tiempo, lo que nos indica que es recomendable que la adición de PDC se haga con antelación al cultivo, o bien que estos restos se composten previamente.
4. La adición de PDC tiene un efecto negativo sobre la capacidad antioxidante de las plantas. No obstante, la adición de PDC, hace que a partir de un determinado tiempo se mejore esa capacidad antioxidante y en algún caso se supere la capacidad antioxidante de las lechugas cultivadas en suelos sin PDC. Se corrobora la recomendación de esperar un tiempo para el cultivo desde la adición de PDC, o de compostar ese residuo.
5. Los PDC, como enmienda orgánica, pueden plantear problemas por aumento de la salinidad, y por la presencia de metales pesados. No obstante, las cantidades adicionadas (no excesivas) y la evolución posterior del suelo, corrigen o minimizan estos problemas.
6. Para valorar la actitud de los PDC como enmiendas orgánicas y su problemática medioambiental, es necesario tener en cuenta el tipo de suelo al que se van a aplicar, porque para algunas propiedades, el comportamiento difiere sustancialmente según este parámetro.
7. Se requiere de más investigación sobre las posibilidades de emplear los PDC como enmiendas orgánicas, sobre todo en lo referente a las limitaciones del PDC al crecimiento de las plantas y al efecto de los PDC sobre las propiedades físicas de suelo.

## 9. Bibliografía

1. Adi, A.J. & Noor, Z.M., 2009. Bioresource Technology Waste recycling : Utilization of coffee grounds and kitchen waste in vermicomposting. *Bioresource Technology*, 100(2), pp.1027–1030. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.024>.
2. Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. Food chemistry, 4th revised and extended edition. Ed. Springer. Leipzig, 2009.
3. Birkelan, P.W., 1999. Soils and Geomorphology. Oxford University Press, New York, 430 pp.
4. Bohn, H., McNeal, B., O'Connor, G., 1979. Soil Chemistry. Willey-Interscience. US. 329 pp.
5. Bravo, J. et al., 2012. Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(51), pp.12565–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23214450>.
6. Bronick, C.J., Lal, R. Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 2005, 124, 3 –22.
7. Cruz, R., Gomes, T., et al., 2014. Antioxidant activity and bioactive compounds of lettuce improved by espresso coffee residues. *Food Chemistry*, 145, pp.95–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24128454>.
8. Cruz, R. et al., 2012. Carotenoids of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown on soil enriched with spent coffee grounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(2), pp.1535–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314378>.
9. Cruz, R., Morais, S., et al., 2014. Improvement of vegetables elemental quality by espresso coffee residues. *Food chemistry*, 148, pp.294–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24262560>.
10. Delgado, G., Delgado, R., Párraga, J., Rivadeneyra, M.A., Aranda, V., 2008. Precipitation of carbonates and phosphates by bacteria in extract solutions from a semi-arid saline soil. Influence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentrations and Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> mola ratio in biomineralization. *Geomicrobiology Journal*. **25**:1-13.
11. Djati, H. & Hunter, K.A., 2010. Bioresource Technology Particle concentration effect : Adsorption of divalent metal ions on coffee grounds. *Bioresource Technology*, 101(5), pp.1482–1486. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.094>.
12. Durán, V.H., Rodríguez, C.R., Arroyo, L., Martínez, A., Francia, J.R., Cárceles, B., Soil Conservation Measures in Rainfed Olive Orchards in South-Eastern Spain: Impacts of Plant Strips on Soil Water Dynamics. *Pedosphere*, 2009, 19, 453-464.
13. Esquivel, P. & Jiménez, V.M., 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products ☆. *FRIN*, 46(2), pp.488–495. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>.
14. Fenoll, J., Vela, N., et al., 2014. Assessment of agro-industrial and composted organic wastes for reducing the potential leaching of triazine herbicide residues through the soil. *The Science of the total environment*, 493, pp.124–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937498>.
15. Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S. & Rufián-Henares, J. a., 2015. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), pp.12–18. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643814007348>.

16. Kasongo, R.K. et al., 2011. Coffee waste as an alternative fertilizer with soil improving properties for sandy soils in humid tropical environments. *Soil Use and Management*, 27(1), pp.94–102. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1475-2743.2010.00315.x>.
17. Kasongo, R.K. et al., 2013. Response of Italian ryegrass ( *Lolium multiflorum* Lam.) to coffee waste application on a humid tropical sandy soil. *Soil Use and Management*, 29(1), pp.22–29. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/sum.12006>.
18. Kim, M.-S. et al., 2014. The effectiveness of spent coffee grounds and its biochar on the amelioration of heavy metals-contaminated water and soil using chemical and biological assessments. *Journal of environmental management*, 146, pp.124–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242543>.
19. Lee, H.K. et al., 2015. Green nanocomposites filled with spent coffee grounds. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23), p.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.42043>.
20. Lindsay, W.L. and W.A. Norvell. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 42:421-428.
21. Liu, K. & Price, G.W., 2011. Evaluation of three composting systems for the management of spent coffee grounds. *Bioresource technology*, 102(17), pp.7966–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704514>.
22. Machado, E.M.S. et al., 2010. Cultivation of fungal strains using coffee industry residues as alternative growth substrates. *Journal of Biotechnology*, 150, pp.401–401. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165610014331>.
23. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1994. Métodos oficiales de análisis, Volumen 3. Secretaría General de Alimentación, Madrid.
24. Mercasa. La alimentación en España 2014. Accedido el 30 de Julio de 2015 desde [http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion\\_2014/pdfs/pag\\_040-050\\_consumo\\_alimentario.pdf](http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion_2014/pdfs/pag_040-050_consumo_alimentario.pdf)
25. Morikawa, C.K. & Saigusa, M., 2008. Recycling coffee and tea wastes to increase plant available Fe in alkaline soils. *Plant and Soil*, 304(1-2), pp.249–255. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-008-9544-1>.
26. Morikawa, C.K. & Saigusa, M., 2011. Recycling coffee grounds and tea leaf wastes to improve the yield and mineral content of grains of paddy rice. *Journal of the science of food and agriculture*, 91(11), pp.2108–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547921>.
27. Murthy, P.S. & Madhava Naidu, M., 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, pp.45–58. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921344912000894>.
28. Mussatto, S.I., Carneiro, L.M., et al., 2011. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), pp.368–374. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710006119>.
29. Mussatto, S.I., Machado, E.M.S., et al., 2011. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), pp.661–672. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-011-0565-z>.
30. Navarro, G., Navarro, S., 2013. Química Agrícola: química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas. Ediciones MundiPrensa. 492 pp.
31. Nogueira, W., Nogueira, F., Devens, D. Temperature and pH control in composting of coffee and agricultural wastes. *Water Sci. Technol.* 1999, 40:113–119.

32. Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.) 1982, *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, second ed. Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI, USA, pp. 902–947.
33. Pérez-Lomas, A.L., Delgado, G., Párraga, J., Delgado, R., Almendros, G., Aranda, V. Evolution of organic matter fractions after application of co-compost of sewage sludge with pruning waste to four Mediterranean agricultural soils. A soil microcosm experiment. *Waste Manag.* 2010, 30, 1957-1965.
34. Pujol, D. et al., 2013. The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops and Products*, 50, pp.423–429. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669013003932>.
35. Ramasahayam, S.K., Azam, S. & Viswanathan, T., 2015. Phosphorous, nitrogen co-doped carbon from spent coffee grounds for fuel cell applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(18), p.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.41948>.
36. Rufián-Henares, J. a & de la Cueva, S.P., 2009. Antimicrobial activity of coffee melanoidins- a study of their metal-chelating properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(2), pp.432–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19123814>.
37. Urbano, P., 2001. *Tratado de Fitotecnia General*. Ediciones MundiPrensa. Madrid. 895 pp.
38. Yamane, K. et al., 2014. Field Evaluation of Coffee Grounds Application for Crop Growth Enhancement , Weed Control , and Soil Improvement. , 17(January 2013), pp.93–102.

***SISTEMAS BIOLÓGICOS DE  
CONSERVACIÓN: BACTERIOCINAS Y  
SUS APLICACIONES EN  
ALIMENTACIÓN***

Trabajo Bibliográfico calificado con  
Sobresaliente

## ÍNDICE

1.	Introducción .....	4
1.1.	Conservación de Alimentos.....	4
1.1.1.	Orígenes de los procesos de conservación de alimentos (Panorama Histórico) ..	4
1.2.	Bacterias ácido lácticas .....	5
1.3.	Las bacteriocinas .....	6
2.	Objetivo.....	6
3.	Desarrollo .....	6
3.1.	Clasificación de las bacteriocinas .....	6
3.2.	Estructura y función de las bacteriocinas .....	8
3.3.	Mecanismo de acción de las bacteriocinas.....	10
3.4.	Microorganismos dianas de las bacteriocinas .....	12
3.5.	Factores que pueden afectar a la efectividad del tratamiento.....	14
3.5.1.	Relativos a los microorganismos.....	14
3.5.2.	Relacionados con las condiciones de tratamientos .....	14
3.6.	Efectos sobre los alimentos.....	15
3.6.1.	Sobre las propiedades sensoriales de los alimentos.....	15
3.6.2.	Sobre las propiedades nutricionales de los alimentos.....	15
3.7.	Resistencia a bacteriocinas .....	16
3.7.1.	Resistencia debido a la mímica de la inmunidad .....	17
3.7.2.	Resistencia debido a la degradación de la bacteriocina .....	17
3.7.3.	Resistencia asociada a condiciones de crecimiento.....	17
3.7.4.	Resistencia debida a cambios en la célula bacteriana .....	18
3.7.5.	Otros locus genéticos implicados en la resistencia .....	18
4.	Bacteriocinas más utilizadas .....	19
4.1.	Nisina.....	19
4.2.	Pediocina .....	19
4.3.	Plantaricinas E/F y J/K .....	20
4.4.	Divergicina A.....	20
4.5.	Helveticina J.....	20
5.	Producción y purificación de bacteriocinas .....	20



6.	Aplicaciones en la industria alimentaria .....	22
6.1.	Lácteos .....	24
6.2.	Productos cárnicos .....	27
6.3.	Pescado .....	28
6.4.	Frutas y verduras.....	29
7.	Conclusiones.....	29
8.	Bibliografía .....	30

## RESUMEN

Las bacteriocinas son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes cepas bacterianas. Debido al creciente interés, sobre la obtención de microorganismos benéficos productores de sustancias antagonistas para su aplicación en la industria alimentaria como sistemas biológicos de conservación de alimentos el objetivo de esta revisión es dar una visión general del conocimiento que se tiene sobre las bacteriocinas, su modo de acción y aplicación. Para ello se ha recurrido a la búsqueda bibliográfica en bases de datos como Pubmed, Scopus o Scielo y en diferentes libros.

## 1. Introducción

Los procedimientos que se pueden llevar a cabo para la conservación de alimentos son muy variados. De forma general podemos diferenciar entre dos tipos de métodos: los físico-químicos, entre los que encontramos procedimientos basados en la disminución de pH; en la reducción del agua disponible; en la variación del potencial de óxido-reducción; con la utilización de frío o calor; e incluso utilizando varios de estos principios. En segundo lugar encontraríamos los métodos biológicos, como pueden ser las fermentaciones (glicólisis, fermentación alcohólica, fermentación láctica...) o las recientes bacteriocinas que son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes cepas bacterianas, bacterias ácido lácticas que se caracterizan por su capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, especialmente aquellos genéticamente relacionados. Existe un interés creciente sobre la obtención de microorganismos beneficiosos productores de sustancias antagonista para su aplicación en la industria alimentaria, en la producción animal, en la prevención y control de enfermedades infecciosas bacterianas y recientemente en el campo acuícola (Monroy Dosta y col., 2009).

### 1.1. Conservación de Alimentos

#### 1.1.1. Orígenes de los procesos de conservación de alimentos (Panorama Histórico)

Todos nuestros alimentos derivan de la plantas o de los animales, son por lo tanto de origen biológico y a causa de ello se produce el desarrollo de una serie de transformaciones (reacciones químicas, bioquímicas y procesos microbianos) que modifican sus características originales y producen su deterioro.

La conservación de alimentos a gran escala más antigua que se conoce se practicó en el antiguo Egipto, dónde se utilizó para la provisión de cantidades suficientes de grano seco como

seguro para el fallo de las avenidas del Nilo. Se almacenaban grandes cantidades de grano en silos cerrados, donde permanecería varios años sin deteriorarse.

Los romanos también fueron capaces de conservar numerosos alimentos. Entre los hechos más interesantes de la época de Pompeyo se pueden nombrar las confituras de frutas conservadas en miel, el vino y varios tipos de salsas fermentadas y embotelladas.

La conservación comercial de alimentos se estableció a principios del siglo XIX, tras una serie de descubrimientos que permitieron sentar las bases científicas y técnicas para dicha conservación: el proceso comercial de la conservación de alimentos por esterilización, Nicolás Appert 1810 (Casp & Abril, 2003).

## 1.2. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (LAB) están constituidas por un grupo de bacterias Gram positivas unidas por sus características morfológicas, metabólicas y fisiológicas (Axelsson, 2004). En general, se tratan de bacterias Gram-positivas, cocos o bacilos, no esporulados, microaerofílicos, catalasa negativo, ácido-tolerantes y productoras de ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos. El término LAB está asociado íntimamente con las bacterias presentes en las mucosas de animales y humanos (Riley & Wert, 2002). Las LAB son conocidas por la producción de diversos compuestos antimicrobianos, como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y bacteriocinas (Aymerich y col., 2000). Las bacteriocinas se definen como proteínas caracterizadas por tener un efecto antagónico frente a bacterias patógenas, hongos y algunos parásitos (Sablon y col., 2000). La efectividad de estos compuestos depende de su potencial (capacidad de inhibir bacterias Gram positivas, Gram negativas o ambas), de la concentración y de su nivel de estabilidad (Monroy Dosta y col., 2009; Rodríguez y col., 2002). En la actualidad se han descrito más de 300 bacteriocinas diferentes para los géneros *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.* y *Enterococcus spp.*; los cuales han sido ampliamente estudiados en aplicaciones industriales, biomédicas y farmacéuticas (Papagianni, 2003; Cetinkaya y col., 2003; De Vuyst & Vandamme, 1994). Dentro de los diferentes grupos de bacterias ácido lácticas, el género de mayor importancia y que presenta más especies es el de *Lactobacillus*; de igual forma es el género más heterogéneo (Axelsson, 2004). De forma general, este género se ha subdividido en tres grupos dependiendo de la presencia o no de las enzimas claves para la fermentación de azúcar, de forma homo ó heterofermentativa, la fructosa-1,6-difosfato, la aldolasa y/o la fosfoetolasa, respectivamente. Además de otras pruebas clásicas como la configuración del ácido láctico producido, la hidrólisis de la arginina y el crecimiento a ciertas temperaturas (Hoover & Chen, 2005).

### 1.3. Las bacteriocinas

Las bacteriocinas son definidas como péptidos sintetizados por microorganismos que presentan propiedades antimicrobianas, letales o inhibidoras, frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con los microorganismos que las producen (Papagianni, 2003; Cotter y col., 2005; McAuliffe y col., 2001). Su función principal es la competencia y defensa del microorganismo productor contra otros microorganismos, se ha comprobado que pueden actuar sobre bacterias patógenas, especialmente en Gram positivas (Cleveland y col., 2001), además se caracterizan por presentar una amplia estabilidad frente a factores físico-químicos como: pH, temperatura y agentes químicos que permiten su actividad bajo diferentes condiciones de evaluación (Hill, 2010). Gracias a sus características químicas y sus propiedades antimicrobianas, las bacteriocinas pueden ser consideradas como conservantes naturales, lo que refleja su gran potencial para utilizarse en diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área de la industria alimentaria y farmacéutica (McAuliffe y col., 2001; Cotter y col., 2013).

De forma general, las bacteriocinas son producidas por bacterias ácido lácticas principalmente por los géneros: *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (Cetinkaya y col. 2003). Además, se caracterizan por ser péptidos catiónicos o hidrofóbicos (Nes y col., 1996) y la mayoría presentan masas moleculares bajas (<30 KDa) y entre 40 y 60 aminoácidos (Monroy Dosta y col., 2009).

## 2. Objetivo

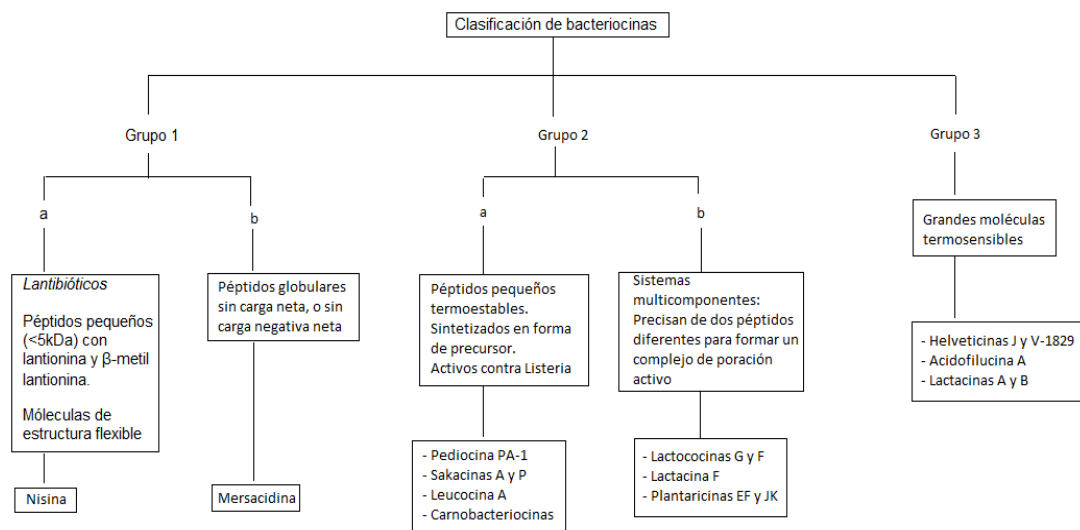
La fermentación microbiana podría ser la forma más antigua, después del secado, del proceso de conservación de los alimentos. Desde hace unos años se ha suscitado un interés creciente por los métodos biológicos de conservación. La utilización de las bacterias lácticas (LAB) en la conservación de alimentos es aceptada por los consumidores como algo natural e incluso promotor de la salud. Las bacteriocinas, compuestos producidos por algunas de las cepas LAB asociadas a alimentos fermentados, inhiben la alteración microbiana y las bacterias patógenas en los alimentos sin cambiar la naturaleza fisicoquímica de los mismos. Como la utilización de bacteriocinas es un campo emergente de la microbiología de los alimentos, el objetivo de este trabajo es la realización de un estudio bibliográfico sobre este tema.

## 3. Desarrollo

### 3.1. Clasificación de las bacteriocinas

La clasificación de las bacteriocinas está en continua revisión debido a los descubrimientos de nuevas moléculas y la reordenación según sus similitudes y diferencias. En general se clasifican en 3 grupos (Klaenhammer, 1993; Nes y col., 1996; Cleveland y col., 2001) (Figura 1). Dentro del primer grupo la más representativa es la Nisina que fue descubierta en

1928 (Rogers & Whittier, 1928; Hurst, 1967). Mientras estudiaban algunas cepas de *Lactococcus* observaron un efecto inhibitorio sobre otras bacterias lácticas. Posteriormente, (Whitehead, 1933) observó una inhibición parecida en cultivos iniciadores para quesos en Nueva Zelanda y se verificó la naturaleza proteica de la molécula. A este tipo de bacteriocinas se les denomina lantibióticos. Se dividen en dos subclases según tengan o no carga neta y por la rigidez de la molécula. Las tipo Ia son péptidos hidrofóbicos de naturaleza catiónica y que forman poros en membranas, y las Ib son péptidos globulares sin carga neta, o sin carga negativa neta. La clase II son termoestables y de pequeño tamaño con péptidos no modificados o bien con dos componentes (IIb). La clase III son bacteriocinas de gran tamaño y sensibles al calor (Morata Barrado, 2008).



**Figura 1. Clasificación de bacteriocinas. Adaptado de (Klaenhammer, 1993; Nes y col., 1996; Cleveland y col., 2001; Morata Barrado, 2008)**

En la actualidad, se han identificado y caracterizado nuevas bacteriocinas, las cuales se clasifican en cuatro grupos, se ha añadido un grupo nuevo con respecto a la clasificación anterior, en función de sus propiedades físicas y bioquímicas como: peso molecular, estabilidad al calor, espectro de acción antimicrobiano (Cintas y col., 2001; Nes y col., 2007). Las bacteriocinas pueden clasificarse en cuatro grupos: Clase I: lantibioticas, con poca estabilidad al calor, péptidos policíclicos (<5 KDa) con aminoácidos modificados; Clase II: pequeñas (<10 KDa), no lantibioticas, estables al calor; Clase III: moléculas grandes (>10 KDa) e inestables al (Cintas y col., 2001); y Clase IV: compuesta por las bacteriocinas con proteínas complejas que implican lípidos o hidratos de carbono para su actividad (Rodríguez y col., 2003; Klaenhammer, 1993; Papagianni, 2003).

Aunque se han propuesto diferentes clasificaciones de estos péptidos antimicrobianos, la más reciente y sencilla es la propuesta por (Cotter y col., 2005), quien propone únicamente dos grupos o clases: la Clase I, o lantibioticos, a la cual pertenecen las bacteriocinas que contienen

el aminoácido lantionina, y la Clase II para las demás bacteriocinas. La Clase I se ha subdividido en tres subclases de acuerdo a su actividad antimicrobiana y mecanismo de acción. Los lantibióticos se caracterizan por ser péptidos termo-resistentes de entre 19 a 39 aminoácidos. Contienen residuos de lantionina o metil-lantionina formados por modificaciones postraduccionales, tales como la deshidratación de residuos de serina y treonina a 2,3-dehidroalanina y 2,3-dehidrobutirina, que se unen covalentemente con la cisteína para dar origen a la lantionina y metil-lantionina, respectivamente. Estas interacciones dan origen a la configuración característica de los anillos estructurales de los lantibióticos (Hoover & Chen, 2005). Dentro de esta clase de bacteriocinas se encuentra la Nisina, Mutacina, Salivaricina, Estreptococina, Planataricina y Bovicina, entre otras (Muñoz y col., 2012). Las bacteriocinas de la Clase II se caracterizan por tener un bajo número de aminoácidos, ser termo-resistentes y no contener lantionina, por lo cual no están sometidas a grandes cambios postraduccionales. La mayoría de estas bacteriocinas son activas en concentraciones nanomolares y el mecanismo de acción principalmente se basa en la formación de poros en la membrana celular (Cotter y col., 2005)

### **3.2. Estructura y función de las bacteriocinas**

Por lo general las bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular con tamaños que varían entre 30 y 40 aminoácidos, capaces de entrar en las células diana mediante la unión con los receptores de la membrana celular. Su mecanismo de acción puede variar e incluye la formación de poros en la membrana, la degradación del ADN celular, la inhibición de la síntesis de proteínas a través de la escisión específica del ARNr 16s y la inhibición de la síntesis de peptidoglicano (Heu y col., 2001). Su principal función es la defensa de la bacteria ácido láctica contra microorganismos patógenos en diferentes ambientes (Papagianni, 2003). La producción de péptidos antimicrobianos es una estrategia de defensa de muchas especies. Existen distintos tipos de péptidos antimicrobianos producidos por diferentes especies que pueden actuar de forma específica contra algunos microorganismos o tener un amplio espectro y actuar sobre distintos tipos.

Las bacteriocinas y los antibióticos se diferencian en al menos dos características: 1) las bacteriocinas son péptidos (metabolitos primarios), mientras que los antibióticos son metabolitos secundarios; y 2) el espectro de inhibición de las bacteriocinas es relativamente estrecho ya que usualmente son activas contra microorganismos cercanos al microorganismo que las produce (Riley & Wert, 2002; Rodríguez y col., 2002). Como anuncia (Cotter y col., 2005), las bacteriocinas se pueden emplear para conferir inmunidad innata a los alimentos. Desde hace varios años las bacteriocinas, al igual que las LAB, han sido consumidas por el hombre. Por esta razón son consideradas como ingredientes naturales en los alimentos (Settanni & Corsetti, 2008), y tienen el estatus de QPS (Qualified Presumption of Safety), es decir son consideradas como seguras para la salud (Monroy Dosta y col., 2009; Jamuna & Jeevaratnam, 2004).

**Tabla 1. Péptidos antimicrobianos de origen eucariota.** (Cleveland y col., 2001)

<b>Péptido</b>	<b>Origen</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Espectro</b>	<b>Toxicidad</b>	<b>Referencias</b>
Pardaxina	<i>Pardachirosmaroratus</i> (Red Sea MosesSole) y <i>Par.pavoninus</i> (peacocksole)	Forma poros que inducen la liberación de neurotransmisores	Gr+ y especialmente Gr-	Hemolisis reducida contra eritrocitos humanos	(Oren & Shai, 1996)
Melittina	Abeja venenosa	Inserta $\alpha$ hélices en membrana	Gr+ y Gr-	Lisis de células de mamíferos y bacterias	(Oren & Shai, 1996)
Ceratotoxina	<i>Ceratitiscapita</i>	Desconocido	Gr+ y Gr-	Lítico para <i>E.coli</i> K-12	(Marri y col., 1996)
Histatinas	Saliva humana	Forma poros en membrana	Amplio espectro bacterias y hongos	Baja o nula	(Helmerhorst y col., 1997)
Trichorzinas	<i>Trichoderma</i> (hongo del suelo)	Forma barreras de voltaje en canales de iones	<i>S.aureus</i> pero no <i>E.coli</i>	Hemolítico	(Goulard y col., 1995)
Cecropinas	Sistema inmunitario de lagunos insectos ( <i>Hyalophoracecropia</i> )	Provocan la ruptura de la bicapa lipídica	Gr- más sensibles que Gr+	Lisa liposomas aniónicos y bacterias	(Moore y col. , 1996; Hansen, 1993; Helmerhorst y col., 1997; Boman, 1991)
Magaininas	Ranas y otros anfibios ( <i>Xenopuslaevis</i> )	Producen canales permeables a los aniones en la membrana	Bacterias y hongos	Lítico	(Higazi y col., 1996; Helmerhorst y col., 1997; Hansen, 1993)
Defensinas	Neutrófilos de mamíferos	Forma barreras de voltaje en canales de iones	Gr+, Gr-, hongos y envueltas de virus	Citotóxico	(Higazi y col., 1996; Kagan y col., 1994)

### 3.3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas

En primer lugar, hay que destacar algunas características esenciales para que las bacteriocinas puedan llevar a cabo su actividad antimicrobiana:

- Son independientes del blanco celular, membrana o pared celular.
- Su interacción con algunas proteínas importantes en el metabolismo de la célula.
- Poseen una carga neta positiva que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram-negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram-positivas (Cleveland y col., 2001).
- La hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, así como su flexibilidad, que le permite realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de interacción con la membrana.

A pesar de que estas características varían de molécula a molécula, todas son importantes para la actividad antimicrobiana (López y col., 2008).

En el mecanismo de acción de estos compuestos se incluye:

- La formación de poros en la membrana celular, lo que causa la pérdida del contenido celular, éste es el mecanismo descrito para las bacteriocinas, Nisina (Figura 2) y Lactocoquina A de *L.lactis*.
- La inhibición de la síntesis de la pared celular, mecanismo de acción descrito para la Mersacidina, que involucra la unión al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano (UDPMur- Nac-pentapéptido-GlcNAc); y
- La inhibición de la actividad de enzimas como la fosfolipasa A2, que participa en la reparación de membranas, mecanismo reportado para la Cinamicina de *Streptomyces cinnamoneus* (López y col., 2008; Monroy Dosta y col., 2009; OMGE, 2008).

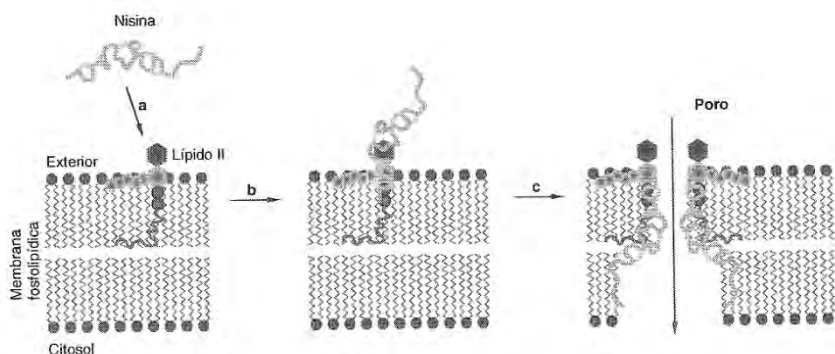


Figura 2. Formación de poros en la membrana fosfolipídica bacteriana por interacción entre la bacteriocina Nisina y el lípido II. (Morata Barrado, 2008)



El modo de acción más común de los péptidos antimicrobianos es la permeabilización de puntos concretos de la membrana celular lo que produce la fuga de material celular y la muerte de la célula (Cleveland y col., 2001).

Por ejemplo, la Lacticina 3147 es una bacteriocina obtenida a partir de *Lactococcus lactis* cuyo mecanismo de acción se ha determinado y que produce un poro en la membrana, que es permeable a cationes  $K^+$  e iones fosfato a través del cual fugan al exterior celular (Figura 3). Para equilibrar el sistema y reacumular estos iones la célula tiene que hidrolizar ATP a ADP liberando fosfato. Pero el ATP es necesario para mantener el gradiente de protones y el metabolismo energético y la célula pierde energía y termina muriendo (McAuliffe y col., 1998)

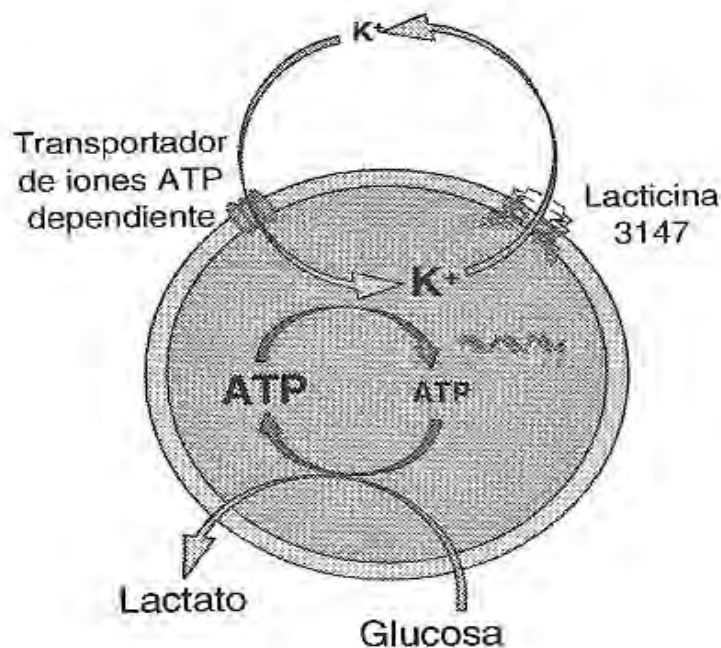


Figura 3. Modo de acción de la Lacticina 3147. (Morata Barrado, 2008)

### 3.4. Microorganismos dianas de las bacteriocinas

Aunque las bacteriocinas son en general bactericidas de espectro estrecho se han encontrado algunos con efectividad contra gran número de bacterias Gram + y Gram -. *Enterococcus mundtii* ST15 produce una bacteriocina de 3944 Da que inhibe el crecimiento de bacterias como: *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Propionibacterium spp.*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus caprinus* (De Kwaadsteniet y col., 2005).

El poder que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos va a tener distintos comportamientos, es decir, algunos microorganismos pueden ser sensibles, mientras que otros, son resistentes a la acción de estos compuestos, inclusive una cepa que parece ser sensible puede tener células que presenten resistencia a la acción de la bacteriocina. De estos mismos microorganismos algunos pueden ser sensibles a una y resistentes a otra, las mismas bacterias productoras de compuestos antimicrobianos pueden ser sensibles a la acción de otra bacteriocina y por último, células de esporas que presentan resistencia a estas sustancias, pueden volverse sensibles después de la esporulación (Cintas y col., 2001; Grande y col., 2006). El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cistina y de acuerdo con ello, se establecen tres grupos:

- a) Bacteriocinas con un estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie;
- b) Bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram-Positivas; y
- c) Bacteriocinas con amplio rango de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram-Positivas (Cintas y col., 2001).

La Tabla 2 resume distintas aplicaciones de bacteriocinas en alimentos y microorganismos sensibles a ellas.

**Tabla 2. Bacteriocinas y microorganismos patógenos alimentarios sensibles. (Morata Barrado, 2008)**

Microorganismo	Bacteriocina	Peso molecular (kDa)	Rango pH	Microorganismo	Referencias
<i>Lactococcuslactis</i>	Nisina	5.0	5-8	<i>L. monocytogenes</i> Scott A <i>Listeria innocua</i> <i>S. aureus</i>	(Bozariis & Nychas, 2006; Al-Holy y col., 2006; Sobrino-López & Martin-Belloso, 2006)
<i>L. plantarum</i> LMG 13556	Plantaricina 432	-	-	<i>Listeria innocua</i> <i>Streptococcus caprinus</i>	(Todorov & Dicks, 2006)
<i>L. curvatus</i> CRL705	Lactocina705	-	-	<i>Listeria innocua</i> <i>Bochothrix thermosphacta</i>	(Castellano & Vignolo, 2006)
<i>Vibrio mediterranei</i> 1	BLIS	63-65	5-9	<i>V. parahaemolyticus</i>	(Carraturo y col., 2006)
<i>Bacilluslentus</i> NG 121	Bacteriocina	-	5-10	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>	(Sharma y col., 2006)
<i>Lactobacilluscurvatus</i> CWBI-B28	Bacteriocina	-	-	<i>L. monocytogenes</i>	(Ghalfi y col., 2006)
<i>Enterococcusfaecium</i> <i>Enterococcusfaecalis</i>	Enterocina P	-	2-9	<i>Listeria innocua</i> <i>L. monocytogenes</i>	(Abriouel y col., 2006)
<i>Lactococcuslactis</i>	Lacticina 3147	2.85 y 3.30	6-7	<i>Listeria innocua</i> <i>L. monocytogenes</i>	(Abriouel y col., 2006)
<i>Enterococcusfaecalis</i> MR99	Enterocina MR99	5.0	4-8	<i>Listeria spp.</i> <i>S. aureus</i> <i>Clostridium spp</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella sonnei</i> y <i>flexneri</i>	(Sparo y col., 2006)
<i>Enterococcusmundtii</i> ST15	Enterocina ST15	3.94	2-12	<i>E. faecalis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>C. tyrobutyricum</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	(De Kwaadsteniet y col., 2005)

### **3.5. Factores que pueden afectar a la efectividad del tratamiento**

#### **3.5.1. Relativos a los microorganismos**

El contenido inicial del inóculo es fundamental a la hora de evaluar la efectividad de cualquier tratamiento. En cuanto a la fase de crecimiento siempre los microorganismos son más sensibles en condiciones de intensa reproducción celular (crecimiento logarítmico). (Morata Barrado, 2008)

#### **3.5.2. Relacionados con las condiciones de tratamientos**

La composición química y las condiciones físicas del alimento pueden tener un efecto significativo en la actividad de las bacteriocinas. Por ejemplo, la Nisina es 228 veces más soluble a pH 2 que a pH 8, lo que afecta a su traslocación y a su capacidad de acceder a los microorganismos a eliminar (Liu & Hansen, 1990). Parece ser que el pH puede influir también en la adsorción de las bacteriocinas en las células productoras mientras que a pH bajo se muestran más solubles. La bacteriocina producida por *L. plantarum* N014 no se adsorbió a pH 1-3 mientras que se detectó una adsorción del 100% a pH 7 (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2006). La concentración de bacteriocina aplicada afecta también a la efectividad del tratamiento. Dosis altas presentan un mayor efecto inhibitorio (Boziaris & Nychas, 2006).

Se ha publicado que el grado de aireación influye en la cantidad de la bacteriocina Amylovorina producida por *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 observándose que los máximos contenidos de bacteriocina soluble se producían a elevados contenidos de dióxido de carbono (Neysens & De Vuyst, 2005). Con este tipo de bacteriocinas se podrían utilizar tecnologías fermentativas como crecer de modo simultáneo el *Lactobacillus* con un *Saccharomyces* para aumentar la producción de bacteriocinas por anaerobiosis (Morata Barrado, 2008).

Las proteasas pueden hidrolizar las bacteriocinas por su naturaleza peptídica y por tanto tratamientos simultáneos con bacteriocinas y proteinasa K, pronasa, pepsina u otras proteasas pueden reducir o inhibir su actividad (De Kwaadsteniet y col., 2005). Se ha verificado sensibilidad de la bacteriocina de *Lactobacillus plantarum* N014 ante las proteasas papaína, pepsina, pronasa E, proteinasa K y tripsina (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2006).

### **3.6. Efectos sobre los alimentos**

#### **3.6.1. Sobre las propiedades sensoriales de los alimentos**

Las bacteriocinas son péptidos de pequeño tamaño que no se ha publicado que posean efectos significativos en el perfil organoléptico de los alimentos. Sin embargo, a veces cuando no se adiciona la bacteriocina directamente sino que se inocula el microorganismo productor, y que a la vez es el responsable de fermentar el alimento, se pueden producir modificaciones sensoriales positivas (Morata Barrado, 2008). En un estudio se utilizó *Lactobacillus sakei* para producir bacteriocinas (Sakacina P) en la elaboración de salchichas fermentadas. Posteriormente, las evaluaron mediante un panel sensorial comparándolas con las elaboradas mediante un inóculo comercial, obteniendo muy buenos resultados con la cepa productora de Sakacina P en cuanto a jugosidad y ternura de la carne, además encontraron una buena acidez, un bajo nivel de oxidación lipídica y una mayor preferencia por estas salchichas por parte de los panelistas (Urso y col., 2006a; Urso y col., 2006b).

También se ha publicado que algunos *Lactobacillus* productores de bacteriocinas, y utilizados como cultivos protectores en carne envasada al vacío, pueden tener un efecto positivo en la reducción de la oxidación lipídica (Katikou y col., 2005).

Otros estudios, han usado películas de quitosano, donde se encuentra la bacteriocina, que llevan incorporado aceite esencial de orégano y no se mostró la influencia negativa en el gusto de muestras de pollo. Además aumentaron la vida útil de los filetes de pollo a 14 días, manteniendo las características sensoriales aceptables (Petrou y col., 2012). Por lo tanto, se debe evaluar cada aplicación en particular y establecer las condiciones que conducen a mantener la seguridad del alimento sin alterar las características sensoriales.

#### **3.6.2. Sobre las propiedades nutricionales de los alimentos**

Las bacteriocinas no producen una mejora de las propiedades nutricionales, ya que son péptidos y proteínas de pequeño tamaño. Sin embargo, cuando la bacteriocina se aplica en forma de un cultivo productor que realiza algún tipo de fermentación en el alimento, sí que puede producir proteólisis, lipólisis y mejora de la digestibilidad del alimento, o bien la producción de metabolitos intermedios nutricionalmente saludables. Tampoco producen, por su modo de acción, una reducción de las características nutricionales como desnaturalización de enzimas o proteínas (Morata Barrado, 2008).

### 3.7. Resistencia a bacteriocinas

Cuando un nuevo agente antimicrobiano es descrito y se demuestra que es seguro y eficaz contra patógenos, es fundamental evaluar los riesgos potenciales del desarrollo de resistencias a las bacteriocinas si se produce una exposición prolongada (Cotter y col., 2013). La frecuencia con la que los organismos susceptibles puedan desarrollar resistencia a una determinada bacteriocina es, por tanto, un tema muy importante para tener en cuenta cuando se proponen estrategias de control biológico basadas en las bacteriocinas. Las bacteriocinas no han sido ampliamente utilizadas en el ámbito clínico (Cotter y col., 2013). Sin embargo, la Nisina se ha utilizado durante mucho tiempo como bioconservante de alimentos, pero no ha sido registrada ninguna resistencia durante el deterioro de alimentos por microorganismos en la industria alimentaria (Blake y col., 2011).

La resistencia innata a bacteriocinas puede variar mucho entre las diferentes cepas de bacterianas (Katla y col., 2003).

Esta resistencia innata a bacteriocinas puede ser resultado de diferentes mecanismos. Los mecanismos principales se resumen en la Figura 4.

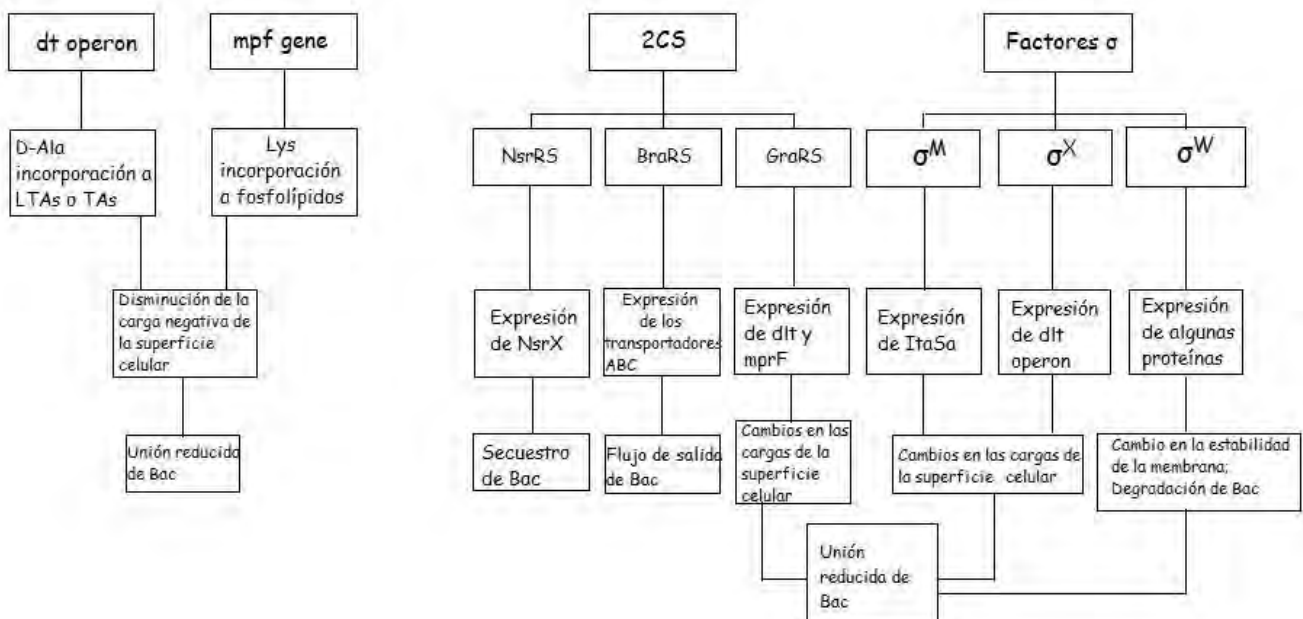


Figura 4. Ejemplos de mecanismos involucrados en la resistencia de bacteriocinas. Adaptación (De Freire Bastos y col., 2015)

### **3.7.1. Resistencia debido a la mímica de la inmunidad**

El mimetismo inmunológico es un mecanismo que contribuye a la protección específica de las bacteriocinas. En estos casos, las cepas productoras de bacteriocinas no llevan genes que codifican sistemas homólogos funcionales de la inmunidad de la bacteriocina, también denominado "genes de inmunidad huérfana". Este fenómeno se ha descrito para postraducción (Draper y col., 2009) y clases de bacteriocinas tipo II (Fimland y col., 2002). Se ha demostrado que la expresión heteróloga de estos genes de inmunidad huérfana confiere protección contra la bacteriocina cognado (Draper y col., 2012).

### **3.7.2. Resistencia debido a la degradación de la bacteriocina**

También este mecanismo de resistencia parece ser específico para cada bacteriocina. Algunas cepas resistentes a la Nisina de *Bacillus spp.* producen una enzima, la nisinasa, que degrada la Nisina (Jarvis, 1967). Fue demostrado que la nisinasa podía ser producida por cepas de *Bacillus cereus* y *Paenibacillus (ex bacilo) polymyxa* durante la esporulación. La nisinasa rompe el C-terminal del anillo de lantionina (Jarvis & Farr, 1971) y también es activo contra la subtilina, pero no contra la bacitracina, polimixina y gramicidina (Jarvis, 1967). Esta ausencia de resistencia cruzada hacia los antibióticos es muy relevante. Si la resistencia de las bacteriocinas mutantes se convierte simultáneamente en resistencia a los antibióticos, tales resultados pueden crear preocupación con respecto a las aplicaciones clínicas de las bacteriocinas.

### **3.7.3. Resistencia asociada a condiciones de crecimiento**

La resistencia innata a bacteriocina parece depender de varios factores. Las células de *Listeria monocytogenes 412* en la fase estacionaria exhiben una mayor resistencia a cualquier Nisina ( $300 \text{ UI mL}^{-1}$ ) o Pediocina PA-1 ( $320 \text{ AU mL}^{-1}$ ) que las células en fase exponencial. Sin embargo, no se observa ningún efecto en la fase de crecimiento a una alta concentración de Pediocina ( $2560 \text{ AU mL}^{-1}$ ). La tolerancia a la Pediocina PA-1 también fue observada con estrés osmótico (6.5% NaCl) y en células en frío-tensionadas ( $5^\circ\text{C}$  durante 60-80 min). Los resultados anteriores se explicaron por los cambios en las interacciones electrostáticas entre las bacteriocinas y la superficie de la célula en presencia de iones a altas concentraciones. Además, puede cambiar la morfología celular debido al aumento de osmolaridad del medio de crecimiento, llevando a los cambios en la envoltura celular (Jydegaard y col., 2000).

### **3.7.4. Resistencia debida a cambios en la célula bacteriana**

Muchas bacterias Gram-positivas tienen ácidos teicoicos (TAs) o ácidos lipoteicoico (LTA) como principales constituyentes de la pared celular (Fischer, 1988). Estas moléculas se extienden a través del peptidoglicano a la superficie externa de la célula y queda cargada por grupos fosfatos desprotonizados. Sin embargo, la esterificación con D-alanina reduce la carga negativa neta de la pared celular por la introducción de grupos de aminoácidos básicos (Fischer, 1988).

Un ejemplo de un sistema que contribuye a la resistencia innata de bacteriocinas en bacterias Gram-positivas es el operón *dlt*, que codifica para proteínas necesarias para la incorporación de D-alanina al TAs y LTAs (Peschel y col., 1999). Las mutaciones en el gen del *dltA* aumentan la sensibilidad a bacteriocinas debido a una incorporación de D-alanina defectuosa al TAs o LTA. En consecuencia, las células mutantes llevan una carga negativa mayor de superficie, dando como resultado una mayor interacción de bacteriocinas de la superficie bacteriana y, por tanto, inhibición de la célula (Peschel y col., 1999).

### **3.7.5. Otros locus genéticos implicados en la resistencia**

Collins y col., 2010 describen un locus (posición fija en un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador), *lmo 1967*, requerido para la resistencia innata de la Nisina en *L. monocytogenes*. Este locus es un homólogo de la *telA* del gen de resistencia al telurito y su papel en la resistencia innata de la Nisina fue demostrado por análisis de diferentes tipos de mutantes. Tras la postraducción, los mutantes se volvieron susceptibles a la Nisina, y también a la Cefuroxima, Cefotaxima y Bacitracina. Este fue el primer estudio que asocia un gen *telA* con la resistencia innata a bacteriocinas, aunque aún no se ha propuesto ningún mecanismo para explicar este fenotipo de resistencia.

Por lo general estos mecanismos implican cambios en la célula bacteriana, que se traducen en a) la reducción o pérdida de bacteriocina vinculante o inserción, b) secuestro de bacteriocinas, c) bacteriocina en flujo bombeo (exportación) y d) degradación de bacteriocinas, entre otros.

Los estudios reportados en la literatura sugieren que la resistencia a bacteriocinas puede desarrollarse durante la utilización de estas para aplicaciones biotecnológicas. La mayoría de las resistencias a las bacteriocinas no tienen mucha importancia en cuanto a costos. Si la resistencia hace que las células sensibles a la bacteriocinas aumenten su tasa de crecimiento y predominan en el alimentos, las células mutantes serán superadas en número y probablemente eliminadas. Por lo tanto, tales células mutantes no tendrían ningún impacto sobre control microbiológico con bacteriocinas.

Como ha señalado por Gravesen y col., 2002, la frecuencia de aparición de resistencias a bacteriocinas no se puede predecir, ya que dependerá de las condiciones específicas de



esfuerzo y crecimiento. Las principales propuestas de aplicación para la mayoría de las bacteriocinas es la conservación de alimentos. Aunque los experimentos realizados in vitro son importantes para poder medir parámetros, tales como una evaluación de la facilidad con que se presenta la resistencia, el impacto que ejerce la resistencia sobre la bacteria y la estabilidad de la resistencia en ausencia de selección (Blake y col., 2011). Se requiere de sistemas de modelo sobre el desarrollo de la resistencia de las bacteriocina en los alimentos para medir su frecuencia y evaluar su impacto en el control microbiano. Los alimentos tienen una composición heterogénea y sus factores intrínsecos pueden afectar a la actividad de la bacteriocina y al desarrollo de la resistencia de bacteriocina (Bastos & Ceotto, 2011).

## **4. Bacteriocinas más utilizadas**

### **4.1. Nisina**

La Nisina, descrita en 1928, fue la primera bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos; es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos y como un aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Maldonado & Llanca, 2007).

Es un péptido de 34 aminoácidos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa. La síntesis de la Nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones postraduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen dos variantes de esta bacteriocina, la Nisina A y la Nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina en la nisina A cambia por asparagina en la nisina Z (Sangronis & García, 2007). La Nisina es ácida por naturaleza por lo que es estable en condiciones ácidas; su solubilidad aumenta al aumentar la temperatura y disminuir el pH. Se demostró que la Nisina es rápidamente inactivada en el intestino por las enzimas digestivas y no puede detectarse en la saliva de humanos diez minutos después de haber consumido un líquido que la contenga (Simova y col., 2006).

### **4.2. Pediocina**

Es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidolactic* es utilizada como conservador en productos vegetales y cárnicos. Se ha observado una elevada actividad contra *Listeria spp.* Dada su alta actividad contra estas especies tiene un alto potencial para ser utilizada como conservador en alimentos lácteos (Fernández, 2005; Wirawan y col., 2007).

### **4.3. Plantaricinas E/F y J/K**

Son bacteriocinas del grupo IIb producidas por *Lactobacillus plantarum* que tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos. La síntesis de la Plantaricina es sumamente compleja, está regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes, existen numerosos artículos que asocian a la existencia de plásmidos para la producción de esta bacteriocina (Mourad, 2007).

### **4.4. Divergicina A**

Es una bacteriocina producida por *Caernobacterium divergens* LV13 que se caracteriza por poseer un sistema de secreción que involucra la presencia de la señal de un péptido. Con un peso molecular de 4.6 kDa, la Divergicina A es un péptido pequeño, de naturaleza hidrofóbica y termoestable. A diferencia de las bacteriocinas de la clase II que tienen un sitio de ruptura característica, Gli-Gli, esta bacteriocina posee en su extremo N-terminal un sitio de ruptura Ala-Ser-Ala y actúa como péptido señal para el uso del sistema de secreción de la célula (Maldonado & Llancas, 2007).

### **4.5. Helveticina J**

Esta bacteriocina es producida por *Lactobacillus helveticus*, microorganismo que se encuentra de manera natural en quesos curados. La bacteriocina presenta actividad antibacteriana contra especies relacionadas. Es una proteína de 37 kDa termolábil (30min a 100°C) y el gen que la produce se localiza en el ADN cromosomal. Se conoce poco las características bioquímicas de esta bacteriocina y su modo de acción (Cintas y col., 2001).

## **5. Producción y purificación de bacteriocinas**

La detección de cepas productoras de bacteriocinas requiere de varios pasos metodológicos para identificar, producir y purificar dichas sustancias.

- Es necesario realizar estudios de producción y contar con grandes proporciones de cultivos antes de iniciar la purificación. La producción de algunas bacteriocinas puede ser favorecida bajo ciertas condiciones de crecimiento. Por ejemplo, las condiciones de incubación, como son la temperatura y el pH (Wescombe & Tagg, 2003; Svetoslav y col., 2004; Chang y col., 2007). Por lo que las condiciones de producción deben ser específicas para cada organismo productor (Pascual y col., 2008).

- La composición del medio de crecimiento también afecta a la producción de estas sustancias (Wescombe & Tagg, 2003; Zalán y col., 2005). En general los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno son óptimos para el aumento de producción de bacteriocinas (Kemperman y col., 2003; Kawai y col., 2003). Es importante elegir un medio de crecimiento correcto ya que este puede interferir o aumentar la producción y purificación de bacteriocinas, por ejemplo, se ha reportado que el Tween 80, interfiere en la purificación de estas sustancias además de que disminuye la actividad antimicrobiana de Pediodicina A y Lactocina S (Monroy Dosta y col., 2009).
- Una vez conseguida la producción necesaria de la cepa de interés, se remueven las células por centrifugación y se precipita la proteína con la adición de sulfato de amonio, seguido de varios pasos de cromatografía (Cintas y col., 2001). Se han desarrollado otros métodos con separaciones por cromatografía y de acuerdo al pH del medio donde se logra una total liberación o absorción de las bacteriocinas dentro de la célula. El método más común utilizado es la precipitación con sulfato de amonio seguido de una cromatografía HPLC (Svetoslav y col., 2004).
- Para comprobar las características bioquímicas del antibiótico producido se tratan las muestras obtenidas con diferentes proteasas ( $\alpha$ -quimiotripsina, tripsina, proteinasa K, y pronasa E), o con otras enzimas ( $\alpha$ -amilasa, lipasa A, lisozima, aminopeptidasa, mutanolisina, DNAsa, y RNAsa); después se determina el tamaño del compuesto producido mediante ultrafiltración o se detecta la actividad en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) al 15% (Tiwari & Srivastava, 2008).
- Posteriormente se determina el campo de acción inhibitorio de la bacteriocina haciendo diferentes pruebas de inhibición *in vitro*. (Moreno y col., 2008), describen dos técnicas ampliamente utilizadas: antagonismo directo e indirecto. La primera consiste en hacer crecer la cepa productora de la sustancia inhibidora junto a una cepa indicadora o sensible y, observar, tras la incubación la formación de halos de inhibición. El segundo tipo de antagonismo consiste en hacer crecer en primer lugar la cepa productora de la sustancia inhibidora, de esta forma se permite que libere la sustancia y solo entonces se siembra la cepa contra la cual se desea observar el efecto antagónico.

La producción de bacteriocinas para uso industrial se puede realizar utilizando cepas productoras crecidas en fermentadores en condiciones nutricionales y fisiológicas que optimicen la producción de estas moléculas o bien se puede realizar una producción mediante sistemas de expresión heterólogos. Esta última técnica consiste en introducir una construcción, generada mediante técnicas de ADN recombinante, que permitan expresar la bacteriocina en un microorganismo distinto de la fuente nativa. La construcción debe contener un promotor (que dirija la transcripción y traducción en el organismo heterólogo), la secuencia codificadora (del gen que codifica la bacteriocina), y un terminador (para acabar la transcripción correctamente en el organismo heterólogo). La construcción puede integrarse en

el organismo heterólogo mediante un plásmido o bien integrarse en su genoma. Los sistemas de expresión heterólogos se utilizan con tres finalidades principales: 1) Conseguir la elucidación funcional de las proteínas recombinantes y péptidos; 2) Facilitar el control transcripcional/traducional de la expresión del gen recombinante; 3) Conseguir niveles de producción superiores a los obtenidos la fuente nativa (Makrides, 1996).

La efectividad en alimentos de la bacteriocina o de las cepas productoras de bacteriocinas se puede ver reducida por múltiples factores como: reducido espectro de actividad, pérdida espontánea de capacidad bacteriogénica, baja adaptación de la cepa productora al alimento en el que se desea utilizar y la aparición de resistencias. La expresión heteróloga de bacteriocinas puede ayudar a solucionar algunos de estos problemas (Figura 5) mejorando el control de la expresión, utilizando microorganismos productores adaptados a las condiciones nutricionales y fisiológicas del alimento o de su proceso de elaboración. También puede permitir, construir cepas multibacteriogénicas capaces de expresar y producir varias bacteriocinas o aportar propiedades de interés tecnológico a las cepas usadas como cultivos iniciadores (Rodríguez y col., 2003).

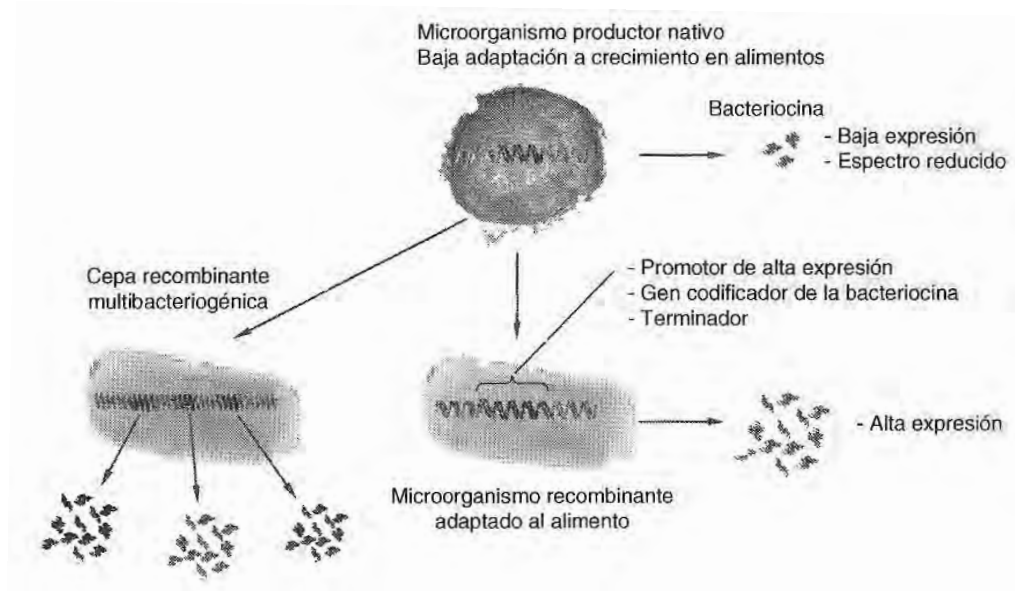


Figura 5. Expresión heteróloga de bacterias. (Morata Barrado, 2008)

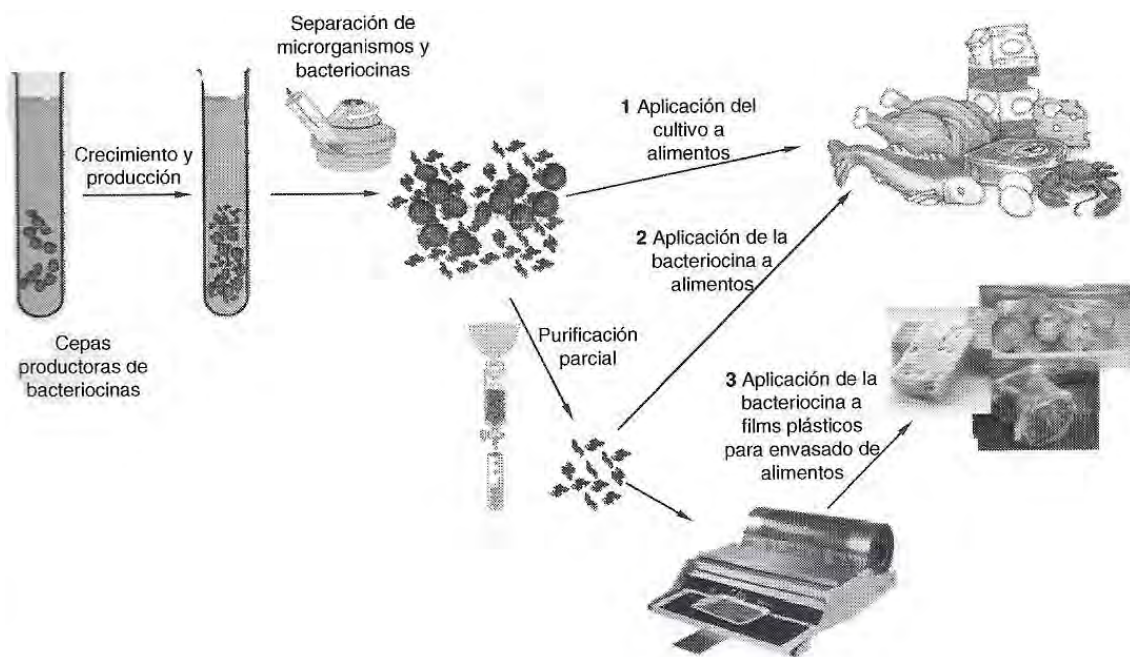
## 6. Aplicaciones en la industria alimentaria

Considerando la tendencia actual de eliminar el uso de conservantes sintéticos en alimentos y obtener productos cada vez más naturales, saludables y frescos; las bacteriocinas se presentan como una alternativa potencial para suplir estas necesidades (Ahmadova y col, 2013). De esta forma, las bacteriocinas, purificadas o semipurificadas, pueden ser empleados como bioconservantes en alimentos con el fin de reducir o eliminar microorganismos

causantes del deterioro como *Leuconostoc spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus subtilis*, y algunos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, responsables de enfermedades transmitidas por alimentos (Todorov y col, 2005; Todorov y col., 2008; Parada y col., 2007).

Las características principales del uso de las bacteriocinas como técnica de conservación de alimentos son: (Morata Barrado, 2008)

- Efectividad contra bacterias: formas vegetativas y esporas.
- Algunas son inestables durante el almacenamiento.
- Pueden generar resistencias.
- Interacción con componentes del alimento.
- Inactivación por enzimas proteolíticas.
- Difusión limitada en matrices sólidas.
- Espectro de actividad reducido
- Imagen natural.
- Muchas son termoestables.



**Figura 6. Aplicaciones de cultivos productores de bacteriocinas y de bacteriocinas en industria alimentaria. (Morata Barrado, 2008)**

## 6.1. Lácteos

La industria alimentaria busca alternativas para obtener alimentos seguros y productos de larga duración capaces de mantener la calidad nutricional y organoléptica, satisfaciendo así las demandas de los consumidores. La utilización de bacteriocinas para la protección del alimento puede mejorar la seguridad y asegurar la calidad de los alimentos, mantener o mejorar sus características organolépticas.

Los animales representan un importante reservorio de patógenos que pueden ser transferidos a la leche. Las principales bacterias patógenas que pueden ser transmitidas a la leche y tener un efecto negativo en humanos son *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli*. La leche cruda favorece el desarrollo de estas bacterias (Farrokh y col., 2013). Aunque la pasteurización destruye los microorganismos patógenos, el procesamiento tras la pasteurización puede conducir a la contaminación de los productos lácteos (Arqués y col., 2015)

El control de la *Listeria spp.* en la industria alimentaria sigue siendo un desafío debido a su carácter ubicuo y su capacidad de crecer a bajas temperaturas y a sobrevivir y persistir incluso en ambientes hostiles. Debido a su alta tasa de letalidad, la listeriosis es, tras la salmonelosis, la segunda causa más frecuente de infecciones transmitidas por los alimentos en Europa (Allerberger & Wagner, 2010). *Staphylococcus aureus* es el agente causal de mastitis en bovinos, capaz de producir una enterotoxina termoestable, es un microorganismo común en el medio ambiente y se puede encontrar en la leche cruda. Las enfermedades causadas por *Staphylococcus aureus* en alimentos pueden provocar calambres abdominales, náuseas, vómitos y diarrea (Bennett, 2012).

La aplicación de las bacteriocinas en los productos lácteos, que pueden ser incorporadas en fermentados o no fermentados, supone una ventaja adicional para mejorar la seguridad y aumentar la calidad de los productos lácteos, reduciendo la probabilidad de contraer enfermedades transmitidas por los alimentos.

Las bacteriocinas son activos contra patógenos Gram-positivos tales como *L. monocytogenes* y *S. aureus* y pueden ser eficaces contra Gram-negativos si se consigue desestabilizar la membrana celular (Nissen-Meyer y col., 2009). Las bacteriocinas producidas in situ a través de la incorporación de cepas productoras como motores o como complemento en productos lácteos fermentados se pueden aplicar para mejorar la seguridad del producto. La primera bacteriocina reconocida como segura (GRAS) y el primer péptido antimicrobiano descrito en el laboratorio fue la Nisina, producida por *Lactococcus lactis*. La Nisina y Pediocina PA1 se utilizan en bioconservación de alimentos y la preparación de estas bacteriocinas es comercializada (Arqués y col., 2015). El uso de fermentos o de cultivos productores de bacteriocinas no requiere la aprobación de los reguladores o la declaración en el etiquetado, por lo que es considerado a menudo un estrategia más atractiva para incorporar las bacteriocinas en los alimentos (Deegan y col., 2006; Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008).

La primera aplicación de Nisina a través de los productos lácteos fue en el queso para la prevención de la contaminación por *Clostridium spp.* (Delves-Broughton y col., 1996). La Nisina



es bactericida contra diferentes cepas de *L. monocytogenes*, y su efecto fue mejorado con la adición de NaCl para la reducción del pH (Harris y col., 2001).

El amplio espectro de la Lacticina 3147 producida por *Lactococcus lactis* DPC 3147 inactiva *L. monocytogenes* en el yogur y queso (Morgan y col., 2001).

La pediocina se ha aplicado en los productos lácteos debido a su fuerte actividad antilisterial y su estabilidad y actividad en una amplia gama de valores de pH. Un preparado seco de Pediocina disminuyó *L. monocytogenes* en queso, crema y salsa de queso (Pucci y col., 1988), aunque el patógeno reinicia ligeramente su crecimiento en alimentos ácidos y neutros.

Cuando se adicionan directamente las bacteriocinas durante la producción de alimentos se produce una pérdida de la actividad antimicrobiana debido a la difusión en la matriz alimentaria y la interacción con otros componentes de los alimentos. Algunas de las estrategias de incorporación que se han estudiado han sido:

- La microencapsulación de bacteriocinas en liposomas, propuesta como una alternativa a la adición directa de bacteriocinas libres a la leche para mejorar la estabilidad y la distribución en quesos, además de impedir la acción antimicrobiana inicial en el queso durante la fabricación (Benech y col., 2002).
- La Nisina se encapsula en nanovesículas de lecitina de soja e inactiva el crecimiento de *L. monocytogenes* en leche a bajas temperaturas, y son tan efectivas como la Nisina libre (Malheiros y col., 2010).
- Envases bioactivos de bacteriocinas constituidos por diferentes películas, se aplican en la separación de lonchas de queso Cheddar (Arqués y col., 2015).
- La Nisina insertada en una base de celulosa reduce los niveles de *Listeria innocua* y *S. aureus* durante el almacenamiento en atmósferas modificadas a temperaturas de refrigeración (Scannell y col., 2000).
- Películas de caseinato de sodio plastificadas de sorbitol que contenían en su interior la Nisina redujeron *L. innocua* inoculadas en la superficie de quesos. Las películas eran eficaces en las superficies de queso contaminado (Cao-Hoang y col., 2010).

Como ya se ha comentado anteriormente, las bacteriocinas pueden ser producidas en la matriz alimentaria durante la fermentación de los alimentos (in situ), pero existen laboratorios donde se pueden producir en una mayor cantidad in vitro durante las fermentaciones en óptimas condiciones físicas y químicas. Debido a la complejidad de la matriz del alimento y la dificultad de cuantificar las bacteriocinas de los alimentos, los estudios in vitro se pueden realizar para simular y empezar a estudiar in situ la funcionalidad de bacteriocinas. La producción de bacteriocinas in situ tiene un futuro prometedor debido al rápido y generalizado uso legal de estas para alcanzar una fermentación deseable y un producto final seguro.

Tabla 3. Aplicación de bacteriocinas en productos lácteos. (Arqués y col., 2015)

Bacteriocina	Productor de la bacteriocina	Aplicación	Patógeno	Producto	Referencia
Lacticina 3147	<i>Lc. lactis</i> DPC3147	Spray en polvo seco	<i>L. monocytogenes</i>	Requesón	(Morga y col., 2001)
Pediocina	<i>P. acidilactici</i> PACLO	Polvo seco	<i>L. monocytogenes</i>	Requesón y yogur	(Pucci y col., 1988)
Pisciolina	<i>C. pisciola</i> JG 126	Sobrenadante concentrado	<i>L. monocytogenes</i>	Queso Camembert	(Wan y col., 1997)
Enterocina CRL35	<i>E. faecium</i> CRL 35	Sobrenadante concentrado	<i>L. monocytogenes</i>	Queso de leche de cabra	(Farías y col., 1999)
Nisina	<i>Lc. lactis</i> CNRZ 150	Bacteria	<i>L. monocytogenes</i>	Queso Camembert	(Maisnier-Patin y col., 1992)
Nisina	<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Bacteria	<i>L. monocytogenes</i>	Queso semicurado	(Rodríguez y col., 2001)
Lacitina 481	<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Bacteria	<i>L. monocytogenes</i>	Queso semicurado	(Rodríguez y col., 2001)
Lacitina 3147	<i>Lc. lactis</i> DPC 4275	Bacteria	<i>L. monocytogenes</i>	Requesón	(McAuliffe y col., 1999)
Enterocina AS-48	<i>E. faecalis</i> TAB 28	Bacteria	<i>L. monocytogenes</i>	Queso semicurado	(Rodríguez y col., 2001)
Enterocina AS-48	<i>E. faecalis</i> INIA 4	Bacteria (al inicio o como complemento)	<i>L. monocytogenes</i>	Queso Manchego	(Nuñez y col., 1997)
Pediocina	<i>Lc. lactis</i> MM 217	Bacteria	<i>L. monocytogenes</i>	Queso Cheddar	(Buyong y col., 1998)
Pediocina	<i>Lb. plantarum</i> WHE 92	Superficie tratada con suspensión celular	<i>L. monocytogenes</i>	Queso Munster	(Ennahar y col., 1998)
Pediocina	<i>Lc. lactis</i> CL 1	Bacteria como complemento	<i>L. monocytogenes</i>	Queso semicurado	(Rodríguez y col., 2005)
Pediocina	<i>Lc. lactis</i> CL 1	Bacteria como complemento	<i>S. aureus</i>	Queso semicurado	(Rodríguez y col., 2005)
Nisina	<i>Lc. lactis</i> ESI 515	Bacteria como complemento	<i>S. aureus</i>	Queso semicurado	(Rodríguez y col., 2005)



## 6.2. Productos cárnicos

Los alimentos de origen animal son ampliamente distribuidos y consumidos en todo el mundo debido a su alta disponibilidad de nutrientes pero también proporcionan un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos y patógenos. Hoy en día, los consumidores exigen alimentos sin aditivos químicos con una larga vida útil. Las películas y recubrimientos para alimentos con antimicrobianos naturales son una prometedora tecnología de conservación de productos cárnicos porque proporcionan una buena barrera contra los microorganismos patógenos y de descomposición. Además, estas películas sirven de barrera al aire contribuyendo así a disminuir los cambios físico-químicos, tales como el color, la textura y la humedad. La eficacia de diferentes tipos de recubrimientos con antimicrobianos depende de la carne, los polímeros utilizados, los microorganismos, las propiedades de la sustancia antimicrobiana y las condiciones de almacenamiento.

La liberación gradual de la sustancia antimicrobiana desde los envases de film durante un período prolongado de tiempo puede ser más ventajosa que la incorporación de las bacteriocinas en los alimentos (Ye y col., 2008)

Estudios en los que se ha incorporado películas con quitosano en los productos cárnicos han demostrado que la oxidación lipídica se reduce, lo que sugiere que puede ser debido a la actividad antioxidante del quitosano (Günlü & Koyun, 2013), y a su baja permeabilidad al oxígeno (Siripatrawan & Noipha, 2012). Se han obtenido resultados similares cuando se incorporan otros compuestos como aceites esenciales (Ahmad y col., 2012), extractos de pomelo extractos (Shin y col., 2012), o lisozima (Ünalán y col., 2011). Sin embargo, incluso cuando el revestimiento pueda proporcionar protección contra la oxidación lipídica, también puede cambiar otras características que modifican los atributos sensoriales del alimento, lo cual es inaceptable para los consumidores. La aplicación de películas sobre la superficie de la carne podría aumentar, en algunos casos, la estabilidad del color de la carne roja (Ahmad y col., 2012).

Los posibles beneficios de la utilización de las películas antimicrobianas y recubrimientos comestibles (AEFC, the Antimicrobial Edible Films and Coatings) en la industria cárnica son la prevención de la pérdida de humedad, evitando así cambios en la textura, el sabor, y el color. Otras ventajas son: la reducción del goteo del producto envasado y la reducción en el uso de almohadillas absorbentes en la parte inferior de las bandejas. La baja permeabilidad al oxígeno disminuye la oxidación lipídica evitando el color marrón consecuente de la oxidación de la mioglobina, la reducción de la carga de microorganismos patógenos y de descomposición, y la parcial inactivación de enzimas proteolíticas (Sánchez-Ortega y col., 2014)

Los sabores y los olores volátiles de carnes, aves y pescados podrían disminuir al usar películas y recubrimientos comestibles, y la incorporación de aditivos, tales como agentes antimicrobianos, pueden ser utilizados para realizar un tratamiento de superficie en la carne. Sin embargo, hay algunos factores que pueden resultar desventajosos a la hora de utilizar AEFC; existe una gran diversidad de productos cárnicos lo que dificulta la estandarización de

un procedimiento único. La composición y propiedades de las AEFC son diferentes lo que puede afectar a la ampliación de métodos de aplicación de recubrimientos (Sánchez-Ortega y col., 2014)

La selección de la AEFC para un determinado producto cárnico dependerá de su naturaleza, características, necesidades específicas, los costos y los beneficios que esta tecnología puede ofrecer a los fabricantes y los consumidores. Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones para mejorar la producción y los procesos de la aplicación de AEFC destinados a la industria de la carne para que sea económicamente viable y adecuado para cada producto.

### 6.3. Pescado

Por lo general, la LAB no son consideradas como microbiota propia del entorno acuático, pero se han encontrado determinados géneros como *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* asociados al agua dulce y al agua del mar. Algunas LAB han sido aisladas de productos procesados procedentes del mar como conservas de pescado (LPFP) y semiconserva de pescado (SPFP). La categoría LPFP incluye los productos de la pesca conservados con bajos niveles de sal (<6% [w/w] NaCl en la fase acuosa) y, para algunos productos, se incluye la adición de conservantes (sorbato potásico, benzoato, NO<sub>2</sub>, o humo). El pH de estos productos es relativamente alto (>5.0), y a menudo son envasados al vacío y necesitan ser almacenados y distribuidos a bajas temperaturas de refrigeración (<5°C) (Mejlholm & Dalgaard, 2007; Mejlholm y col., 2008). Las LAB más utilizadas para estos productos envasados al vacío con almacenamiento en frío, como por ejemplo el pescado ahumado, incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Carnobacterium* (Gancel y col., 1997). Muchos estudios han demostrado que las *Carnobacterium* son bastante comunes en marisco fresco refrigerado o ligeramente conservado, pero a temperaturas más altas de almacenamiento (15-25°C), otras especies como *Enterococcus spp.*, se pueden encontrar durante el deterioro del marisco (Dalgaard y col., 2003; Emborg y col., 2002).

Los productos de la pesca con un alto contenido de sal (>6% de NaCl en fase acuosa) o con un pH inferior a 5.0 y a los que se le añaden conservantes como: benzoato, sorbato potásico, nitrato, se definen como "semiconservas" (Mejlholm y col., 2008). Por lo general, los productos de la pesca europea (como por ejemplo el arenque salado y/o marinado, las anchoas, el caviar) se distribuyen a bajas temperaturas (<10°C). En las conservas en escabeche o de pescado deshidratado, salado o pescado fermentado, la microbiota puede ser muy diversa, se ha detectado la presencia de *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

Las LAB presentes en los mariscos, son capaces de crecer a bajas temperaturas y son compatibles con el medio en el que se encuentre este (envasado en atmósfera modificada, un pH bajo, altas concentraciones de sal, presencia de aditivos como, por ejemplo, ácido láctico o ácido acético). Lo más importante es que su crecimiento también puede suprimir los microorganismos más agresivos de la descomposición por medio de antagonistas y actividad inhibitoria (ya sea a través de la competencia por los nutrientes o la producción de uno o más metabolitos antimicrobianos activos) (Nilsson, 1997; Nilsson y col., 1999; Nilsson y col., 2005;

Nes I. , 2011). Por lo tanto, las LAB cumplen con los requisitos necesarios para la bioconservación de los productos de la pesca.

Algunos patógenos psicrotóxicos y las bacterias de putrefacción pueden sobrevivir y crecer en conservas de pescado (LPFP), por lo que se han realizado estudios sobre este tema. Junto a los moluscos bivalvos crudos, las conservas SPFP y LPFP constituyen el grupo más peligroso de los productos de la pesca. La presencia y el crecimiento de *L. monocytogenes* es uno de los principales motivos de preocupación. *L. monocytogenes* ha sido aislada en conservas LPFP en frío como por ejemplo en salmón ahumado. Este microorganismo es frecuente en el pescado: sobrevive al salado y al ahumado en frío (<30°C) y es capaz de crecer en el producto final a temperaturas glaciales. En este sentido, el uso de bacterias lácticas aisladas de mariscos y/ o de sus bacteriocinas han tenido éxito en impedir o retrasar el crecimiento de este patógeno en conservas de pescado LPFP (Mahdi y col., 2013).

#### **6.4. Frutas y verduras**

Una de las bacteriocinas estudiadas en frutas y verduras es la Nisina la cual se utilizó para controlar el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 junto a otros parámetros como grado Brix, temperatura y pH, para controlar el crecimiento de esta bacteria en los zumos y poder así aumentar su vida útil (Peña & Massaguer, 2006).

La Nisina también se ha utilizado junto con el ácido cítrico para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* en hummus (Al-Holy y col., 2006).

Otra posibilidad es la utilización de la Nisina junto con Pediocina y lactato sódico. Dicha combinación se ha utilizado para controlar *Listeria monocytogenes* en repollo, brócoli y brotes de judías (Bari y col., 2005).

### **7. Conclusiones**

La posible utilización de las bacteriocinas como conservante de alimentos podría llevar a la sustitución de los conservantes químicos. Las bacteriocinas son agentes que pueden actuar sobre las células microbianas a través de distintos mecanismos. A diferencia de los conservantes químicos, las bacteriocinas tienen la aceptación de la mayor parte de los consumidores debido a su procedencia natural. Además, estas moléculas presentan características como: resistencia al calor, a la acidez, baja actividad de agua y actividad a gran rango de temperaturas. Sin embargo, es necesario continuar realizando estudios que muestren la viabilidad técnica y económica de su uso como agentes de control para el crecimiento y supervivencia microbiana en los alimentos a nivel industrial.

## 8. Bibliografía

- Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., & Gálvez, A. (2006). Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in enterococci isolated from food sources. *Letters in Applied Microbiology*, *42*, 331-337.
- Ahmad, M., Benjakul, S., Sumpavapol, P., & Nirmal, N. (2012). Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, *155*(3), 171-178.
- Ahmadova, A., Todorov, S., Choiset, Y., Rabesona, H., Mirhadi, T., Kuliyeu, A., y otros. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, *30*, 631-641.
- Al-Holy, M., Al-Qadiri, H., Lin, M., & Rasco, B. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* in hummus by a combination of nisin and citric acid. *Journal of Food Protection*, *69*, 1322-1327.
- Allerberger, F., & Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent food-borne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, *16*(1), 16-23.
- Arqués, J., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J., & Medina, M. (2015). Review: Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed Research International*, 1-9.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En D. Marcel, *Lactic Acid Bacteria*. Oxford, UK: 9600 Garsington Road.
- Aymerich, M., Garriga, M., Monfort, J., Nes, I., & Hugas, M. (2000). Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish style fermented sausages: Characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, *17*, 33-45.
- Bari, M., Ukuku, D., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., & Kawamoto, S. (2005). Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *Journal of Food Protection*, *68*, 1381-1387.
- Bastos, M., & Ceotto, H. (2011). Bacterial antimicrobial peptides and food preservation. In *Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality*. (M. Ray, & M. Chikindas, Edits.) *Wallingford: CAB International*, 62-76.
- Benech, R., Kheadr, E., Laridi, R., Lacroix, C., & Fliss, I. (2002). Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(8), 3683-3690.
- Bennett, R. (2012). *Staphylococcus aureus*. En *Bad Bug Book, Food Borne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins* (2 ed., págs. 87-92). USA.

- Bhunja , A. (2008). Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis. En *Food Science* (pág. 93). Springer: Text Series.
- Blake, K., Randall, C., & O'Neill, A. (2011). In vitro studies indicate a high resistance potencial for the lantibiotic nisin in Staphylococcus aureus and define a genetic basis for nisin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 2362-2368.
- Boman, H. (1991). Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell Press*, 65, 205-207.
- Boore, A., Herman, K., Pérez, A., Chen, C., Cole , D., Mahon, B., y otros. (2010). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks. En *Morbidity and Mortality Weekly Report* (Vol. 31, págs. 973-979). United States.
- Boziaris, I., & Nychas, G. (2006). Effect of nisin on growth boundaries of Listeria monocytogenes Scott A, at various temperatures, pH and water activities. *Food Microbiology*, 23, 779-784.
- Buyong, N., Kok, J., & Luchansky, J. (1998). Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, Lactococcus lactis subsp. lactis MM217, to control Listeria monocytogenes in Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4842-4845.
- Cao-Hoang, L., Chaine, A., Grégoire, L., & Waché, Y. (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control Listeria in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology*, 27(7), 940-944.
- Carraturo, A., Raieta, K., Ottaviani, D., & Russo, G. (2006). Inhibition of Vibrio parahaemolyticus by a bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by Vibrio mediterranei 1. *Journal Applied of Microbiology*, 1001, 234-241.
- Casp, A., & Abril, J. (2003). Panorama histórico de la conservación de alimentos. En *Procesos de Conservación de Alimentos* (Segunda ed., págs. 19-32). Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Castellano, P., & Vignolo, G. (2006). Inhibition of Listeria innocua and Brochothrix thermosphacta in vacuum-packaged meat by addition of bacteriogenic Lactobacillus curvatus CRL75 and its bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 194-199.
- Cetinkaya, S., Osmanag, A., & Cokmus, O. (2003). Bacteriocin diversity in Bacillus sphaericus. *Folia Microbiológica*, 48, 157-161.
- Chang, J., Lee, H., & Chang, H. (2007). Identification of the agent from Lactobacillus plantarum KFRI464 that enhances bacteriocin production by Leuconostoc citreum GJ7. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2504-2515.
- Cintas, L., Herranz, C., Hernández, P., Casaus, M., & Nes, L. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7, 281-305.

- Cleveland, J., Montville, T., Ingolf, F., & Chikindas, M. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, *71*, 1-20.
- Collins, B., Joyce, S., Hill, C., Cotter, P., & Ross, R. (2010). TelA contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin and other cell wall-acting antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*, 4663-4658.
- Cotter, P., Hill, C., & Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(3), 88-777.
- Cotter, P., Ross, P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 95-105.
- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P., & Leisner, J. (2003). Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brines shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C. *Journal of Applied Microbiology*, *94*, 80-89.
- De Freire Bastos, M., Varella Coelho, M., & Da Silva Santos, O. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, *161*, 683-700.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S., Knoetze, H., & Dicks, L. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *105*, 433-444.
- De Vuyst, L., & Vandamme, E. (1994). *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. London, UK: Blackie London.
- Deegan, L., Cotter, P., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, *16*(9), 1058-1071.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R., & Hungenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, *69*(2), 193-202.
- Draper, L., Grainger, K., Deegan, L., Cotter, P., Hill, C., & Ross, R. (2009). Cross-immunity mimicry as mechanisms of resistance to the lantibiotic lactacin 3147. *Molecular Microbiology*, *71*, 1043-1054.
- Draper, L., Tagg, J., Hill, C., Cotter, P., & Ross, R. (2012). The spiFEG locus in *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* BAA-102 confers protection against nisin U. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*, 573-578.
- Emborg, J., Laursen, B., Rathjen, T., & Dalgaard, P. (2002). Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2°C. *Journal of Applied Microbiology*, *92*, 790-799.

- Ennahar, S., Assobhei, O., & Hasselmann, C. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin ACh producer. *Journal of Food Protection*, *61*(2), 186-191.
- Farías, M., Nuñez De Kairuz, M., Sesma, F., Palacios, J., De Ruiz Holgado, A., & Oliver, G. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin enterocin CRL35 during goat cheese making. *Milchwissenschaft*, *54*(1), 30-32.
- Farrokh, C., Jordan, K., & Auvray, F. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, *162*(2), 190-212.
- Fernández, D. (2005). Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina.
- Fimland, G., Eijsink, V., & Nissen-Meyer, J. (2002). Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology*, *148*, 3661-3670.
- Fischer, W. (1988). Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, *29*, 233-302.
- Gancel, F., Dzierszinski, F., & Tailliez, R. (1997). Identification and characterization of *Lactobacillus* species isolated from fillets of vacuum-packed smoked and salted herring (*Clupea harengus*). *Journal of Applied Microbiology*, *82*, 722-728.
- Ghalfi, H., Allaoui, A., Destain, J., Benkerroum, N., & Thonart, P. (2006). Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *Journal of Food Protection*, *69*, 1066-1071.
- Goulard, C., Hlimi, S., Rebuffat, S., Bodo, B., & Trichorzins, H. (1995). Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: I. Fermentation, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*, *48*, 1248-1253.
- Grande, M., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N., Maqueda, M., y otros. (2006). Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, *106*, 185-194.
- Gravesen, A., Jydegaard Axelsen, A., Mendes da Silva, J., Hansen, T., & Knochel, S. (2002). Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 756-764.
- Günlü, A., & Koyun, E. (2013). Effects of vacuum packaging and wrapping with chitosan-based edible film on the extension of the shelf life of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets in cold storage (4°C). *Food and Bioprocess Technology*, *6*(7), 1713-1719.
- Hansen, J. (1993). Antibiotics synthesized by post translational modification. *Annual Reviews of Microbiology*(47), 535-564.



- Harris, I., Flemming, H., & Klaenhammer, T. (2001). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL 500 to nisin. *Journal of Food Protection*, 54, 836-840.
- Helmerhorst, E., van't Hof, W., Veerman, E., Simoons-Smit, I., & Nieuw Amerongen, A. (1997). Synthetic histain analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochemical Journal*, 326, 39-45.
- Heu, S., Oh, J., Kang, Y., Ryu, S., Cho, S., & Cho, Y. (2001). Gly gene cloning and expression and purification of Glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *Glycines* 8ra. *Applied and Environmental Microbiology*, 4105-4110.
- Higazi, A., Ganz, T., KAriko, K., & Cines, D. (1996). Defensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*(271), 17650-17655.
- Hill, C. (2010). Probiotics and pharmabiotics: Alternative medicine or an evidence-based alternative? *Bioengineered Bugs*, 2(1), 79-84.
- Hoover, D., & Chen, H. (2005). Bacteriocins with Potencial for Use in Foods. En *Antimicrobials in Food* (3ª ed.). CRC Press.
- Hurst, A. (1967). Function of nisin and nisin-like basic proteins in the growth cycle of *Streptococcus lactis*. *Nature*, 214, 1234-2132.
- Jamuna, M., & Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *The Journal of Food General and Applied Microbiology*, 79-90.
- Jarvis, B. (1967). Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology*, 47, 33-48.
- Jarvis, B., & Farr, J. (1971). Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. *Biochim. Bophys Acta*, 227, 232-240.
- Jydegaard, A., Gravesen, A., & Knochel, S. (2000). Growth condition-related response of *Listeria monocytogenes* 412 to bacteriocin inactivation. *Letters in Applied Microbiology*, 68-72.
- Kagan, B., Ganz, T., & Lehrer, R. (1994). Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology*, 87, 131-149.
- Katikou, P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P., & Georgakis, S. (2005). Effect of *Lactobacillus* -protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1303-1313.
- Katla, T., Naterstad, K., Vancanneyt, M., Swings, J., & Axelsson, L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1 and nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4431-4437.



- Kawai, Y., Arakawa, K., Itoh, A., Saitoh, B., Ishii, Y., Nishimura, J., y otros. (2003). Heterologous expression of gassericin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasei* LA39. *Animal Science Journal*, 74, 45-51.
- Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O., & Kok, J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1589-1597.
- Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-86.
- Liu, W., & Hansen, J. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2551-2558.
- López, J., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, J., Martínez, M., & Loeza, P. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(3), 49-57.
- Mahdi, G., Mansooreh, J., Konrad, J., & Wolfgang, K. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria- A review. *Food Science and Technology*, 54, 315-324.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, S., Tatini, S., & Richard, J. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait*, 72, 249-263.
- Makrides, S. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiology Reviews*, 60, 512-538.
- Maldonado, R., & Llanas, L. (2007). Efecto de la incorporación de la nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*, 33, 147-163.
- Malheiros, P., Daroit, D., Silveira, N., & Brandelli, A. (2010). Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*, 27(1), 175-178.
- Marri, L., Dallai, R., & Marchini, D. (1996). The novel antibacterial peptide ceratotoxin A alters permeability of the inner and outer membrane of *Escherichia coli* K-12. *Current Microbiology*, 33, 40-43.
- McAuliffe, O., Hill, C., & Ross, R. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology*, 68(1), 251-256.
- McAuliffe, O., Ross, P., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 285-308.
- McAuliffe, O., Ryan, M., Ross, R., Hill, C., Breeuwer, P., & Abee. (1998). T.Lactacin 3147: a broad spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 439-445.

- Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2007). Modeling and predicting the growth of lactic acid bacteria in lightly preserved seafood and their inhibiting effect on *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Protection*, *70*, 2485-2497.
- Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M., Boknaes, N., & Koort, J. (2008). Microbial spoilage and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology*, *124*, 250-259.
- Monroy Dosta, M., Castro Barrera, T., Fernández Perrino, F. J., & Mayorga Reyes, L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacteria probióticas. *Contactos* *73*, 63-72.
- Moore, A., Beazley, W., Bibby, M., & Devine, D. (1996). Antimicrobial activity of cecropins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *37*, 1077-1089.
- Morata Barrado, A. (2008). Biopreservación. Bacteriocinas. En A. M. Barrado, *Nuevas Tecnologías de Conservación de Alimentos* (págs. 107-120). Madrid, España: A. Madrid Vicente Ediciones.
- Moreno, M., Baert, B., Denaye, S., Cornelis, P., & De Vuyst, L. (2008). Characterization of the amylovorin locus of *Lactobacillus amylovorus* DCE471, producer of a bacteriocin active against *Pseudomonas aeruginosa*, in combination with colistin and pyocins. *FEMS Microbiology Letters*, *2(286)*, 199-206.
- Morgan, S., Galvin, M., Ross, R., & Hill, C. (2001). Evaluation of a spray-dried lactacin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Letters in Applied Microbiology*, *33(5)*, 387-391.
- Mourad, K. (2007). Plasmid DNA studies in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations: production of and immunity to plataricin OL15 is associated to a 9.6 Kb plasmid (pOL15). *Grasas y aceites*(*58* (2)).
- Muñoz, M., Mosquera, A., Alméjiga, C., Melendez, A., & Sánchez, O. (2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe*, *18*, 321-330.
- Nes, I. (2011). Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to applications. En I. Nes, *History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria* (págs. 3-12). New York: Springer Publishing Company.
- Nes, I., Dzung, B., & Sung-Sik, Y. (2007). Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Science and Biotechnology*, *16(5)*, 675-690.
- Nes, I., Havarstein, L., & Brurberg, M. (1996). Biosynthesis of bacteriocins of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *70*, 113-128.
- Neysens, P., & De Vuyst, L. (2005). Carbon dioxide stimulates the production of amylovorin L by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, while enhanced aeration causes biphasic kinetics

- of growth and bacteriocin production. *International Journal of Food Microbiology*, *105*, 191-202.
- Nilsson, L. (1997). Control of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by preservation. Ph.D. Thesis. Denmark: Danish Institute for Fisheries Research and The Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen.
- Nilsson, L., Gram, L., & Huss, H. (1999). Growth control of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection*, *62*, 336-342.
- Nilsson, L., Hansen, T., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., & Knochel, S. (2005). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a non bacteriocinogenic *Carnobacterium pisciola*. *Journal of Applied Microbiology*, *98*, 172-183.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppergard, C., Haugen, H., & Kristiansen, P. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *10*(1), 19-37.
- Núñez, M., Rodríguez, J., García, E., Gaya, P., & Medina, M. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*, *83*(6), 671-677.
- OMGE, G. d. (2008). *Probióticos y Prebióticos*. Organización Mundial de Gastroenterología.
- Oren, Z., & Shai, Y. (1996). A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses Sole fish. *European Journal of Biochemistry*, *337*, 303-310.
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances*, *21*(6), 99-465.
- Parada, J., Ricoy, C., Bianchi, A., & Soccol, C. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *50*(3), 521-542.
- Pascual, L., Daniele, M., Giordano, C., & Pájaro, M. (2008). Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology*, *56*, 397-402.
- Peña, W., & Massager, P. (2006). Microbial modeling of thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 spores in concentrated orange juice with nisin addition. *Brazilian Journal of Microbiology*, *69*, 4-12.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R., Kalbacher, H., Jung, G., & Gotz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 8410-8450.

- Petrou, S., Tsiraki, M., Gitrakou, V., & Savvaidis, I. (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology*, *156*(3), 264-271.
- Pucci, M., Vedamuthu, E., Kunka, B., & Vandenberg, P. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 10. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(10), 2349-2353.
- Rattanachaiakunsoon, P., & Phumkhachorn, P. (2006). Isolation and preliminary characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* N014 isolated from nham, a traditional Thai fermented pork. *Journal of Food Protection*, *69*, 1937-1943.
- Riley, M., & Wert, J. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochemical Journal*, *361*(5-6), 64-357.
- Rodríguez, J., Martínez, M., Horn, N., & Dood, H. (2003). Review: Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *80*, 101-116.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J., Rodríguez, J., Nuñez, M., & Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, *15*(1), 51-57.
- Rodríguez, E., Arqués, J., Gaya, P., Nuñez, M., & Medina, M. (2001). Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. *Journal of Dairy Research*, *68*(1), 131-137.
- Rodríguez, J., Martínez, M., & Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, *42*(2), 91-121.
- Rogers, L., & Whittier, E. (1928). Limiting factors in lactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, *21*, 211-229.
- Sablon, E., Contreras, B., & Vandamme, E. (2000). Antimicrobial Peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action. *Genetics and Biosynthesis: Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 21-60.
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B., Santos-López, E., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J., & Regalado, C. (2014). Review: Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 1-18.
- Sangronis, E., & García, J. (2007). Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso "tetilla". *Anales Venezolanos de Nutrición*, *20*(1), 12-16.

- Scannell, A., Hill, C., Ross, R., Marx, S., Hartmeier, W., & Arendt, E. (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins lacticin 3147 and nisaplin. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3), 241-249.
- Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 38-123.
- Sharma, N., Kapoor, G., & Neopaney, B. (2006). Characterization of a New bacteriocin produced from a novel isolated strain of *Bacillus lentus* NG121. *Antoine Van Leeuwenhoek*, 89, 337-343.
- Shin, Y., Song, H., Seo, Y., & Song, K. (2012). Preparation of red algae film containing grapefruit seed extract and application for the packaging of cheese and bacon. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 225-231.
- Simova, E., Beshkova, D., Najdenski, H., Frengova, G., Simov, Z., & Tsvetkova, I. (17-21 de September de 2006). Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian milk products: Inhibitory properties and in situ bacteriocinogenic activity. *Proceedings of the IUFOST, 13th World Congress Food Sci Technol "Food is life"*, 907-908.
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 2(1), 102-108.
- Sobrinho-López, A., & Martín-Belloso, O. (2006). Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection*, 69, 345-353.
- Sobrinho-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18(4), 329-343.
- Sparo, M., Castro, M., Andino, P., Lavigne, M., Ceriani, C., Gutierrez, G., y otros. (2006). Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 123-134.
- Svetoslav, T., Vaz-Velho, M., & Gibbs, P. (2004). Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 157-160.
- Tiwari, & Srivastava, S. (2008). Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 759-767.
- Todorov, S., & Dicks, L. (2006). Parameters affecting the adsorption of plantaricina 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423 isolated from sorghum beer. *Biotechnology Journal*, 1, 405-409.

- Todorov, S., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., & Wachsman, M. (2008). Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *104*, 465-477.
- Todorov, S., Dicks, & L.M.T. (2005). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology*, *45*(4), 312-322.
- Ünalán, I., Korel, F., & Yemenicioglu, A. (2011). Active packaging of ground beef patties by edible zein films incorporated with partially purified lysozyme and Na<sub>2</sub>EDTA. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*(6), 1289-1295.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., & Cocolin, L. (2006b). Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. *International Journal of Food Microbiology*, *110*, 232-239.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., & Cocolin, L. (2006a). Sequencing and expression analysis of the skacin P bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* strain isolated from naturally fermented sausages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*, 480-485.
- Wan, K., Harmark, J., & Davidson, B. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *Journal of Applied Microbiology*, *82*(3), 273-280.
- Wescombe, P., & Tagg, J. (2003). Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 2737-2747.
- Whitehead, H. (1933). A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochemical Journal*, *27*, 1793-1800.
- Wirawan, R., Swanson, M., Kleffmann, T., Jack, W., & Tagg, J. (2007). Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*, 1461-1467.
- Ye, M., Neetoo, H., & Chen, H. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiology*, *25*(2), 260-268.
- Zalán, Z., Neémeth, E., Barath, A., & Halasz, A. (2005). Influence of growth medium in hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*, *43*, 219-225.

# **PRODUCCIÓN DE AZÚCARES SIMPLES A PARTIR DE POLÍMEROS DE HIDRATOS DE CARBONO**

Trabajo Bibliográfico calificado con  
Notable

## PRODUCCIÓN DE AZÚCARES SIMPLES A PARTIR DE POLÍMEROS DE HIDRATOS DE CARBON

### ABSTRACT

**Objectives:** Systematic review of processes for producing sugars from starch, cellulose, hemicellulose and other plant polysaccharides indicating the substrates, enzymes and conditions optimal for hydrolysis. Moreover, the state of the art in order to know if the production of food ingredients from carbohydrate- rich materials such as field stubble or wood lignocellulosic organic waste is possible, has been analyzed.

**Material and methods:** We conducted a review of review articles published in Scopus for the last three years and whose keywords are: Starch processing enzymes or amylase or starch or glucose isomerase or hydrolysis or pullulanase or glucoamylase or glucanotransferase or cyclodextrin or glycosyltransferaseglucan processing or cellulase enzymes or hemicelulase or fructooligosaccharides or galactooligosaccharides or celobiase or glucanase or xylanase and saccharification and sugar production. Additionally original articles have been analyzed by their relationship to the theme of the TFG.

**Results:** Out of the 273 documents found in the previous search 55 were review articles. We have taken 20 of these revisions as they were directly related to the topic. The rest are articles had some relations to the theme of work. All these documents are considered as they refer to enzymatic hydrolysis processes well defined for obtaining sugars, both glucose and glucose syrup and glucose / fructose from starch, especially corn starch. These processes use mainly alpha-amylases, glucoamylase and debranching enzyme with glucose isomerase. However, documentation about the hydrolysis of cellulose and its derivatives is scarce. The only items that are close to the idea of using enzyme cocktails for the purpose of degrading polysaccharides contained in plant waste and residues are those relating to lignocellulosic mass destruction, although there is a clear trend towards the use of hydrolytic reactions for biofuels.

**Conclusion:** Simple sugars such as glucose, fructose and high purity maltose can be obtained from enzymatic hydrolysis of starch, addition to oligo- and polysaccharides as fructooligosaccharides and dextrans. However, obtaining sugars from plant residues is also feasible using enzymatic methods described in the present work although greater scientific development in this field is necessary for performance of the process to be more cost effective than those used today for such ingredients.

**Key words:** carbohydrates, cellulose, glycosidases, glycosyltransferases, sugars, starch hydrolysis



## RESUMEN

**Objetivos:** Revisión sistematizada de procesos de producción de azúcares a partir de almidones, celulosas, hemicelulosas y otros polisacáridos de plantas con indicación de los sustratos, enzimas y condiciones óptimas para la hidrólisis. Por otra parte, se ha realizado un análisis del estado del arte con objeto de conocer si es posible la producción de ingredientes alimentarios vía enzimática a partir de residuos orgánicos lignocelulósicos ricos en hidratos de carbono tales como los rastrojos del campo o la madera.

**Material y métodos:** Se ha procedido a la revisión de artículos de revisión publicados en SCOPUS hace no más de tres años y cuyas palabras claves sean: *Starch processing enzymes or amylase or starch hydrolysis or glucose isomerase or pullulanase or glucoamylase or glucanotransferase or cyclodextrin glycosyltransferase or processing enzymes or cellulase or hemicelulase or fructooligosaccharides or galactooligosaccharides or celobiase or glucanase or xylanase and saccharification and sugar production*. Adicionalmente se han analizado artículos originales que por su relación con la temática de este TFG se han incluido en él.

**Resultados:** De la búsqueda anterior resultan 273 documentos de los cuales 55 son revisiones. Se han tomado 20 de estas revisiones. El resto son artículos de interés que tienen alguna relación con la temática del trabajo. De todos estos documentos se consideran aquellos que se refieren a los procedimientos de hidrólisis enzimática bien definidos para la obtención de azúcares, tanto glucosa como jarabes de glucosa y de glucosa/fructosa, a partir de almidones, especialmente de almidón de maíz. Estos procedimientos utilizan fundamentalmente alfa—amilasas, glucoamilasa y enzimas desramificantes junto a glucosa isomerasa. Sin embargo, la documentación acerca de la hidrólisis de la celulosa y sus derivados es escasa. Los únicos artículos que se acercan a la idea de utilizar cócteles enzimáticos con objeto de degradar polisacáridos contenidos en restos vegetales son aquellos relacionados con la destrucción de la masa lignocelulósica, aunque existe una clara tendencia a la utilización de las reacciones hidrolíticas para obtener biocombustibles.

**Conclusión:** Se pueden obtener azúcares simples tales como glucosa, fructosa y maltosa de alta pureza a partir de hidrólisis enzimática de almidones además de oligo y polisacáridos como fructooligosacáridos y dextrinas. No obstante, la obtención de azúcares a partir de residuos vegetales, aunque es viable utilizando los métodos enzimáticos que se describen a lo largo del TFG, es necesario un mayor desarrollo científico en este campo para que el rendimiento de los procesos sea más rentable que los utilizados en la actualidad para obtener dichos ingredientes.

**Palabras clave:** carbohydrates, cellulose, glycosidases, glycosyltransferases, sugars, starch hydrolysis

## INTRODUCCIÓN

El uso de enzimas en la producción alimentaria se remonta al momento en el que los prehistóricos pudieron almacenar sus alimentos en recipientes como la cerámica y descubrieron que el líquido que se producía a partir de esos alimentos almacenados tenía propiedades que favorecerían su consumo.

Los seres humanos han utilizado las propiedades catalíticas de las enzimas, en particular para la producción de alimentos, desde hace miles de años. Uno de los registros más antiguos conservados de la humanidad, escrito hace unos 4.500 años por los sumerios y conocida como la Epopeya de Gilgamesh (se puede ver la tabla original en el Louvre de París), se refiere a la producción de pan y cerveza:

‘Enkidu no sabía nada acerca de utilizar el pan como alimento,  
y el beber cerveza no se le había mostrado.  
La meretriz le habló a Enkidu y le dijo:

Come comida, Enkidu, es la forma en la que uno vive.  
Bebe la cerveza como un hábito terrenal.

Enkidu comió la comida hasta que fue saciado,  
bebió en siete jarros y se volvió más efusivo y cantó con alegría.

Estaba eufórico y su rostro resplandecía.  
Echó agua a su peludo cuerpo,  
y se frotó a si mismo con aceite y se volvió humano.<sup>1</sup>

La ley más antigua del vino se puede encontrar como parte del Código de Hammurabi, eternizado en la famosa estela de Hammurabi por el rey de Babilonia (1792-1750 a.C.). Además, los antiguos griegos y romanos adoraban a los dioses Dionisos y Baco por ser los responsables del éxito en los procesos de fermentación. Sin embargo, el conocimiento real de las fermentaciones no fue revelado a la humanidad hasta unos miles de años más tarde.

En el siglo XIX E. Buchner demostró que no es necesario que las levaduras se encuentren vivas para llevar a cabo la fermentación, es decir, detectó la “zimasa”, el componente activo de los extractos donde se lleva a cabo la fermentación; hoy sabemos que la zimasa es un complejo enzimático. Por esta investigación, Buchner recibió el premio Nobel de Química en 1907<sup>2</sup>. Esto aclara la importancia de las enzimas en la industria de la alimentación.

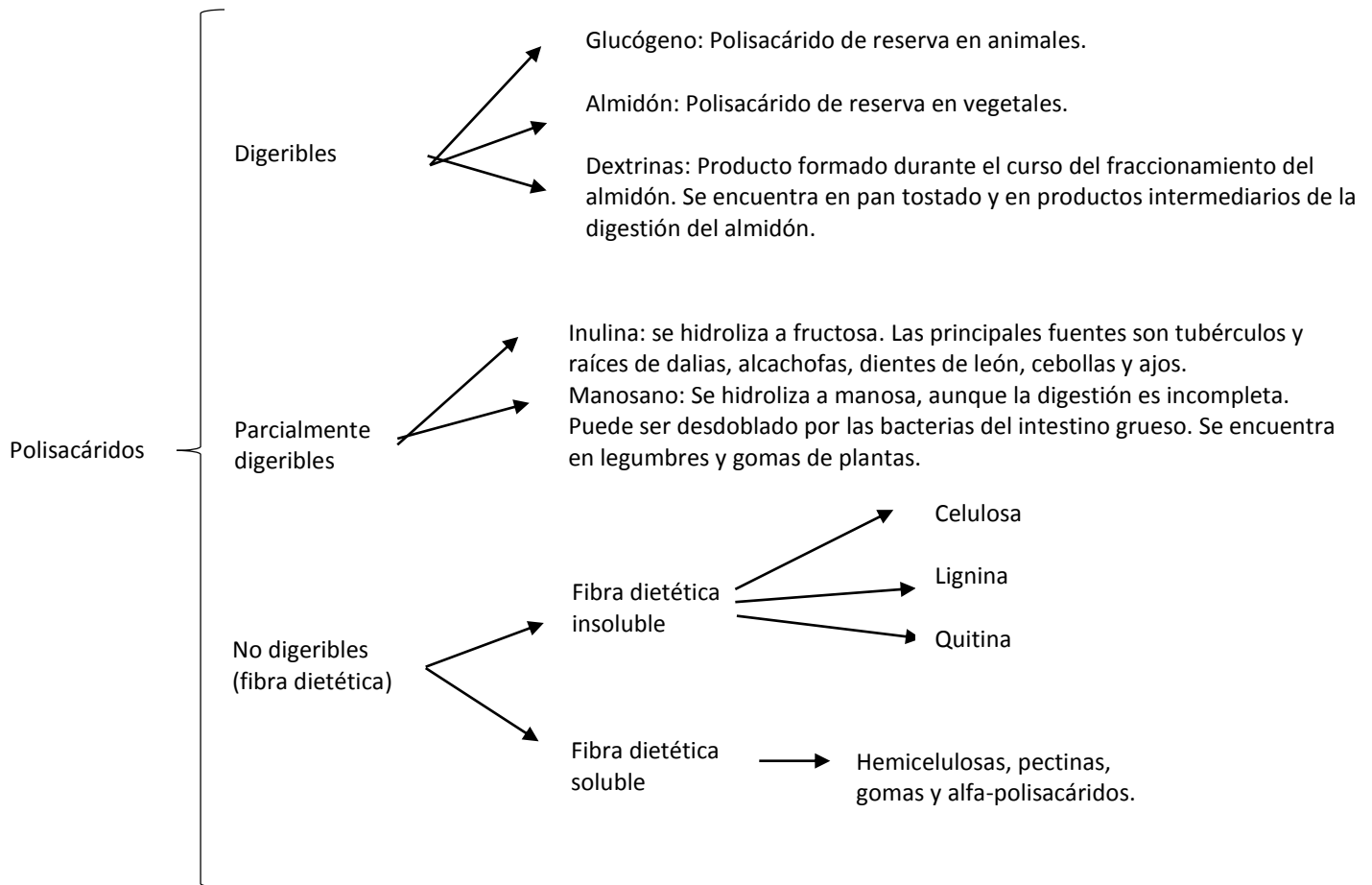
El descubrimiento de Buchner pone de manifiesto que las enzimas son ‘máquinas’ que la industria necesita para producir las sustancias que produce la microbiología industrial (o biotecnología).

El uso de enzimas en la industria alimentaria nos permite suprimir los riesgos que conlleva el uso de microorganismos para la producción de alimentos y permite evitar imprevistos en la variabilidad de la producción que se puede originar por utilizar microorganismos.

Los estudios en enzimología están avanzando día a día. Tanto es así que la Unión Europea (UE) en 2008 tomó cartas en el asunto y reconoció que: 'Las enzimas alimentarias, distintas de las utilizadas como aditivos alimentarios, no están actualmente reguladas, o lo están como auxiliares tecnológicos de los alimentos por la legislación de los Estados miembros. Las diferencias existentes entre las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas nacionales en relación con la evaluación y la autorización de enzimas alimentarias pueden obstaculizar su libre circulación y crear las condiciones para una competencia desigual y desleal. Por ello es necesario adoptar normas comunitarias que armonicen las disposiciones nacionales relativas al uso de enzimas en los alimentos.'<sup>3</sup>

Las glicosidasas son unos enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos para generar glúcidos de tamaño molecular menor tales como azúcares y oligosacáridos. En este trabajo se intenta mostrar una instantánea que refleje el estado del arte del uso de las glicosidasas (número EC 3.2.1) en la industria alimentaria y de sus posibles utilidades en el futuro.

Los polisacáridos más importantes son el almidón y glucógeno (función de reserva energética) y celulosa y quitina (función estructural). Son polímeros cuyos constituyentes (sus monómeros) son monosacáridos unidos mediante enlaces o-glicosídicos. Desde el punto de vista de la nutrición, los polisacáridos pueden ser clasificados como digeribles, parcialmente digeribles, y como no digeribles (véase figura 1).



**Figura 1.** Clasificación de los polisacáridos.

Las glicosidasas son las enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis de los polisacáridos. Algunas de estas enzimas se muestran en la tabla 1.

**TABLA 1.** Esquema de los principales enzimas amilolíticos clasificados funcionalmente según Fraatz (2014).

FAMILIA (CLAN)	ENZIMA	ACTIVIDAD	PRODUCTOS
13 (GH-H)	$\alpha$ -AMILASA	Endoamilasa. Degrada, aleatoriamente, enlaces $\alpha$ -1, 4 en el interior de las moléculas de almidón.	Oligosacáridos de longitud variable.
	$\alpha$ -GLICOSIDASA	Exoamilasa. Degrada, exclusivamente, enlaces $\alpha$ -1, 4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón.	Oligosacáridos de longitud variable.
	PULULUNASA	Enzima desramificante. Exoamilasa. Degrada, exclusivamente, enlaces $\alpha$ -1, 4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón, pululano y glucógeno.	Oligosacáridos de longitud variable.
	ISOAMILASA	Enzima desramificante. Exoamilasa. Degrada, exclusivamente, enlaces $\alpha$ -1, 6 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón y glucógeno.	Oligosacáridos de longitud variable.
	CICLODEXTRIN GLICOSILTRANSFERASA	Transferasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1, 4 de las moléculas de almidón. Tiene la capacidad de formar enlaces glicosídicos.	Ciclodextrinas.
14	$\beta$ -AMILASA	Exoamilasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1, 4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón.	Disacáridos de glucosa (maltosa).
15 (GH-L)	GLUCOAMILASA	Exoamilasa. Degrada enlaces $\alpha$ -1, 4 desde el extremo no reductor de las moléculas de almidón.	Residuos de glucosa con $\beta$ -configuración-almidón.

<sup>1</sup>Se señala la actividad catalítica que poseen y los productos que generan.

Las glicosidasas tienen una gran cantidad de usos los cuales incluyen la degradación de materiales vegetales (ej.: celulasas para degradar la celulosa a glucosa, lo que puede ser usado para la producción de etanol), en la industria alimenticia (ej.: invertasa para producir azúcar

invertido), y en la industria del papel (ej.: xilanasas para extraer hemicelulosa de la pasta de papel).

Dichas enzimas, se encuentran de manera natural en muchos alimentos y tienen un papel fundamental en la calidad nutricional y organoléptica de los mismos. Un claro ejemplo de ello lo encontramos en la industria panaria. Las amilasas son utilizadas a gran escala en la producción de pan. Durante la preparación, los gránulos de almidón son dañados como resultado de la mezcla y por ello el almidón se vuelve accesible a las amilasas que encontramos de forma natural en el trigo. Estas enzimas degradan el almidón a pequeños oligosacáridos que sirven de sustrato para las levaduras. La fermentación de estos azúcares está orientada a la producción de dióxido de carbono y un aumento del volumen del pan. Diferentes amilasas de origen exógeno pueden ser añadidas para aumentar el rendimiento del proceso. El uso de enzimas en la industria panaria está además enfocado a evitar procesos que disminuyan la calidad de producto (enranciamiento, retrogradación...) o para obtener características determinadas (humedad, frescura, sabor...).

Para evitar el enranciamiento del pan se pueden añadir alfa-amilasas, enzimas ramificantes, enzimas desramificantes, beta-amilasas y amiloglicosidasas. El uso de una u otra enzima dará lugar a un producto con unas cualidades particulares. Por ejemplo, la adición de alfa-amilasa, además de su efecto anti-enranciamiento, mejora la suavidad del pan. No obstante, si se añaden cantidades elevadas puede resultar un pan pegajoso.

Una de las enzimas que se venden de forma industrial para la fabricación del pan es una amilasa maltogénica proveniente de *Bacillus stearothermophilus* aislado en aguas termales de Islandia. Esta enzima es comercializada por Novozymes con el nombre de Novamyl (fue la primera enzima comercial que fue producida por un organismo modificado genéticamente) y tiene como principal ventaja que es termoestable. Otra enzima industrial es Gryndamyl (producida por la empresa Danisco). Se obtiene de *Bacillus clausii* BT21 y su óptimo de acción está a los 55 °C y a pH 9.5.

Un ejemplo de las actuales investigaciones sobre las glicosidasas y la producción de alimentos se difunde en el volumen 174 de la revista 'Food Chemistry' (pags. 270-274, año 2015). Investigadores de diferentes nacionalidades han descubierto que el perfil fenólico de los aceites de oliva se ven afectados en función de la temperatura de conservación de las aceitunas. A partir de aceites de olivas (obtenidas de aceitunas almacenadas a 4 y a 20 °C) se han determinado sendos perfiles fenólicos de manera que el aceite obtenido de aceitunas almacenadas a baja temperatura posee un perfil mucho mayor que el que es almacenado a mayores temperaturas. Esto es debido a la acción de las glicosidasas durante ese periodo de almacenamiento. No obstante, se ha comprobado que aunque se almacene la aceituna a 4 °C, la prolongación del proceso de almacenamiento produce efectos negativos en la calidad del aceite<sup>4</sup>.

Otro factor que hay que tener en cuenta a la hora de trabajar con enzimas es que un determinado enzima presentará unas condiciones u otras en función de su origen. Por ejemplo, mientras que las  $\beta$ -glucosidasas obtenidas de *Melanocarpus sp.* actúan a un pH

óptimo de 6 y a una temperatura óptima de 60 °C, las  $\beta$ -glucosidasas provenientes de *Rhizomucor miehei* lo hacen a pH 5 y a 50 °C en su óptimo<sup>5,6</sup>.

## OBJETIVOS

El **objetivo general** del trabajo es hacer una revisión del uso de las enzimas glicolíticas para la producción de ingredientes y productos alimentarios.

Los **objetivos específicos** se centran en explicar el mecanismo de acción de las diferentes enzimas y los ingredientes alimentarios que se podrían obtener a partir de sustratos hidrocarbonados. En un primer lugar se comentarán aspectos relacionados a la hidrólisis de polisacáridos y de las enzimas relacionadas. Posteriormente se dedicará un bloque a la síntesis de oligo y polisacáridos para mostrar los ingredientes y productos alimentarios que se pueden obtener a partir de los productos de la acción de las enzimas glicolíticas y, mediante el uso de glucanotransferasas.

Los procesos enzimáticos descritos a lo largo del TFG están asimismo orientados a responder la pregunta: ¿sería posible obtener todos los ingredientes alimentarios que se describen a partir de restos vegetales como la madera o los rastrojos agrícolas? Antes de concluir el trabajo habrá un apartado que aclare esta cuestión.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha procedido a la revisión de artículos publicados en SCOPUS generalmente hace no más de tres años y cuyas palabras claves sean: *Starch processing enzymes or amylase or starch hydrolysis or glucose isomerase or pullulanase or glucoamylase or glucanotransferase or cyclodextrin glycosyltransferase or processing enzymes or cellulase or hemicellulase or fructooligosaccharides or galactooligosaccharides or celobiase or glucanase or xylanase and saccharification and sugar production*.

## HIDROLISIS DEL ALMIDÓN

El almidón está presente como polisacárido de almacenamiento en hojas, tubérculos, semillas y raíces de muchas plantas. Muchas de estas plantas con alto contenido en almidón han sido domesticadas por el ser humano a lo largo de la historia. Es el caso del maíz, trigo arroz, patata y tapioca. A pesar del consumo directo de estos vegetales, las raíces, los tubérculos y las semillas son utilizados para la obtención de almidón. El almidón puede ser posteriormente tratado con el fin de obtener derivados mediante procesos de hidrólisis (y si procede, luego mediante procesos de síntesis)<sup>7</sup>.

El almidón está compuesto por amilosa (polímeros de glucosa unidos mediante enlace alfa-1-4 glicosídicos) y amilopectina (polímeros de glucosa que además de estar unidos mediante enlace alfa-1-4 glicosídicos, lo están, aunque en menor proporción, por enlaces alfa-1-6 glicosídicos). Dichos enlaces son estables a pH alcalinos y neutros, pero no ácidos. La amilosa y amilopectina están empaquetadas en gránulos de manera que sin el pretratamiento adecuado,

las glicosidasas no podrían actuar efectivamente. Las características de los gránulos varían en función de la especie del vegetal.

El almidón se adiciona a refrescos, salsas, helados, alimentos precocinados o infantiles, etc., para utilizarlo como estabilizador de emulsiones, agente gelificantes o sustituto de grasas. En general, el almidón mejora las propiedades de los alimentos, modificando su estructura y consistencia además de ser fuente de numerosos oligo-, di- y monosacáridos. En la actualidad, una de las aplicaciones en la que se están centrando numerosas investigaciones es la producción de bioetanol a partir del almidón. En la mayoría de las aplicaciones, el almidón debe ser hidrolizado a glucosa, maltosa o maltodextrinas.

El objetivo del procesado del almidón para fines alimentarios es obtener jarabes de glucosa, maltosa o de elevada concentración de fructosa por lo que las etapas posteriores de purificación incluyen la eliminación de las proteínas, las grasas y el color mediante filtración o purificación con carbón activado y la isomerización de la glucosa a fructosa.

Este es un proceso que ocurre en la elaboración de bebidas alcohólicas como la cerveza, el vino, el cava, el tejuino y la sidra. En el caso de la cerveza, la acción de las glicosidasas es vital en el malteado del grano. Respecto a este proceso, la adición de amilasas como las que se encuentran naturalmente en el trigo podría mejorar las cualidades organolépticas de las bebidas.

Tradicionalmente, el almidón era procesado mediante hidrólisis ácida, pero este método presentaba numerosas desventajas (problemas de corrosión de los equipos, formación de numerosos subproductos por ser una hidrólisis no específica, procesos de purificación más complejos, etc.) que provocaban aumentos en los costes de elaboración<sup>8</sup>.

En la actualidad, debido al desarrollo biotecnológico, el procesado industrial del almidón a gran escala se basa totalmente en la utilización de enzimas.

Las enzimas más utilizadas en el procesamiento del almidón son aquellas que hidrolizan el almidón soluble, la amilopectina, la amilosa y para producir pequeñas dextrinas, maltooligosacáridos o glucosa/maltosa. En la tabla 1 se muestran las enzimas que tienen interés en la hidrólisis del almidón. Ha de tenerse en cuenta que el rendimiento de las enzimas se ve afectado por el pH del medio, la temperatura, el origen de la enzima (microbiano, fúngico...), el pretratamiento al que ha sido sometido el sustrato, la presencia de iones, la presencia de inhibidores, etc. A medida que se comentan los diferentes procesos se explicarán las condiciones a las que actúan las correspondientes enzimas.

En el procesado del almidón se distinguen tres etapas fundamentales: gelatinización, licuefacción y sacarificación.

En la gelatinización, entre el 30 y el 40% de los gránulos de almidón se rompen mediante un calentamiento rápido. La temperatura que ha de alcanzarse es dependiente de la especie vegetal de la que se ha obtenido el almidón. Actualmente, el calentamiento se produce mediante un proceso conocido como '*jet-cooking*'. Consiste en introducir vapor a alta



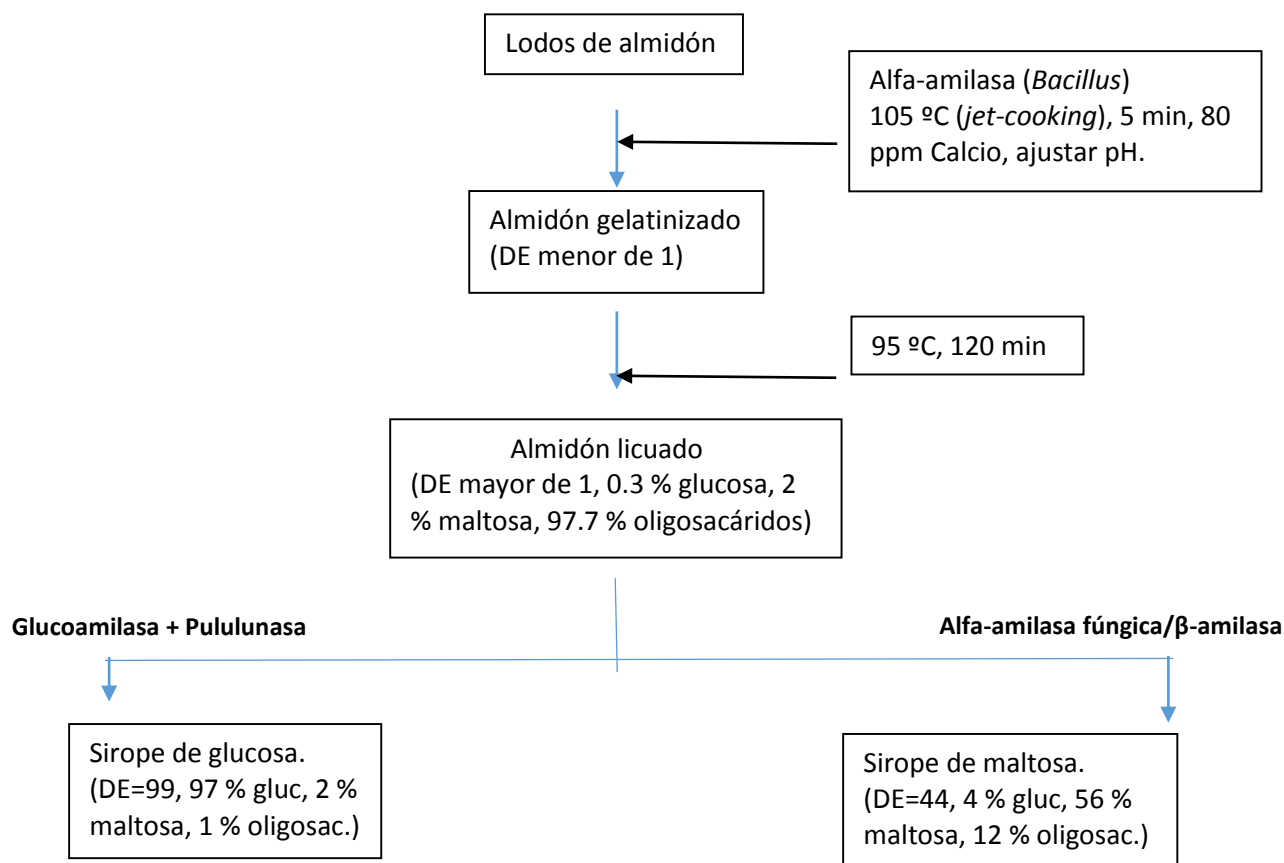
temperatura y presión en el tanque donde se encuentran los lodos de almidón. Previo al calentamiento, es necesario ajustar el pH, añadir entre 20-80 ppm de calcio y la alfa-amilasa termoestable proveniente de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus amyloliquefaciens* (la primera es térmicamente más estable que la segunda). El calcio es necesario para la estabilidad de la enzima. Sin calcio, el enzima se inactivaría rápidamente. La dosis que hay que añadir es de 0.5-0.6 kg de enzima por tonelada de sustrato. El pH se ajusta para que el enzima actúe en su rango de trabajo óptimo. Para que se produzca la gelatinización, la mezcla a la que ya se le ha sometido al tratamiento con vapor se mantiene a 105 °C haciéndola pasar por una serie de tubos.

Durante el siguiente paso, la licuefacción, la mezcla es llevada a una temperatura que ronda entre los 95 y 100 °C. Ésta se mantiene durante unas dos horas. Durante este proceso, los enzimas hidrolizan los enlaces alfa-1-4 (tanto de la amilosa como de la amilopectina) para producir dextrinas. Para poder medir el resultado de la licuefacción se utiliza un medidor conocido como 'Equivalente de Dextrosa (DE: *Dextrose Equivalent*)'. El equivalente de dextrosa es una medida de la cantidad de azúcares reductores presentes en un producto de azúcar, con respecto a la glucosa, expresado como un porcentaje sobre una base seca. Por ejemplo, una maltodextrina con un DE de 10 tendría 10% de la potencia de la reducción de dextrosa. La glucosa posee un DE de 100 y el del almidón es prácticamente de 0. El máximo DE que se obtienen con amilasas de *Bacillus* es de 40. No obstante el proceso se detiene intencionadamente cuando el DE ronda entre 8 y 12. Si no se detuviera, se formaría maltulosa, la cual es resistente a la degradación por glucoamilasa y alfa-amilasas. En función del tipo de producto que se desea obtener, el procesado del almidón puede detenerse llegado a este punto. En la sacarificación, la pululunasa, la glucoamilasa, la beta-amilasa y/o la alfa-amilasa son adicionadas para una degradación adicional del almidón licuado en maltodextrinas, maltosa o siropes de glucosa.

El almidón licuado (DE entre 8 y 12) es bombeado a un recipiente en agitación tras haber ajustado su pH (4-5) y su temperatura (60 °C). En dicho recipiente se añade glucoamilasa. El ajuste del pH hace que la amilasa bacteriana utilizada durante la licuefacción sea inactivada. Cuando el DE deseado es alcanzado, la solución se lleva a una temperatura de 85 °C para detener las reacciones enzimáticas. La glucoamilasa hidroliza principalmente los enlaces alfa-1,4, aunque también muestra cierta acción sobre los enlaces alfa-1,6. La pululanasa proveniente de *Bacillus acidopullulyticus* hidroliza de manera específica los enlaces alfa-1,6. La acción conjunta de sendas enzimas aumenta en un 2 % la concentración de glucosa del producto final. También puede añadirse beta-amilasa. El principal problema industrial de este proceso es el alto coste de algunas enzimas. Para solventar dicho problema, lo que se hace es utilizar enzimas más baratas que sean similares. Por ejemplo, en vez de pululanasa y glucoamilasa se puede utilizar una alfa-amilasa fúngica.

Posteriormente, el producto obtenido es filtrado para eliminar la grasa y desnaturalizar las proteínas. Para una purificación mayor se puede hacer pasar la solución a través de una resina intercambiadora de iones. El proceso de hidrólisis consume agua por lo que el extracto seco de la solución va aumentando a medida que avanza la hidrólisis.

El tratamiento del almidón se resume en el siguiente esquema:

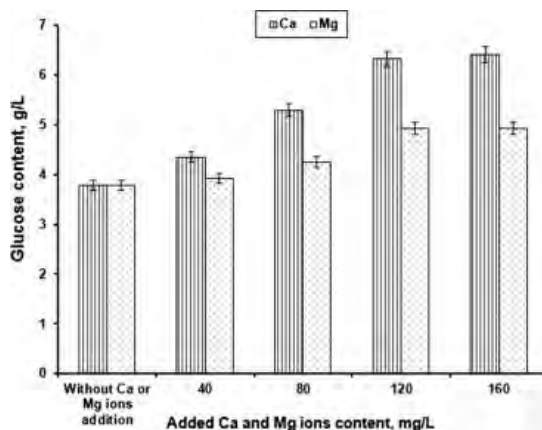


**Figura 2.** Esquema del tratamiento del almidón. Tomado de Van der Maarel, Marc (2009).

Una de las incógnitas que pueden surgir en este apartado es por qué no se utilizan enzimas provenientes de otros microorganismos diferentes a los que hemos nombrado. Investigadores iraníes<sup>9</sup> han purificado y caracterizado una glucoamilasa que presenta unas condiciones de actuación más amplia que la que describimos antes. La 'nueva' glucoamilasa proviene de *Aspergillus niger* y tiene un pH óptimo de entre 4.4 y 5 y su temperatura óptima es de 70 °C. Además la presencia de Calcio no altera su funcionalidad (aunque si la presencia de otros iones tales como el Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> o el Al<sup>3+</sup>. Si utilizáramos este tipo de glucoamilasa tan funcional y que soporta altas temperaturas, el proceso no se podría detener llevando la solución a 85 °C (como anteriormente se dijo que ocurre). Si se lleva la solución a una temperatura demasiado elevada puede provocar reacciones químicas no deseadas que disminuyen la calidad del producto final.

También es importante la presencia de iones. Científicos serbios publicaron en febrero de 2015 unos trabajos en los que se mostraba la influencia de añadir los iones magnesio y calcio al tratamiento del almidón (no para conseguir productos alimenticios sino bioetanol). Se observó

que al añadir los iones se favorece la actuación de los enzimas tal y como se muestra en la figura 3<sup>10</sup>:



**Figura 3.** Comparativa del rendimiento enzimático para la producción de glucosa a partir de almidón en función de la adición de iones calcio y magnesio. Tomado de Jelena D. Pejic (2015).

Así pues vemos que ha de tenerse en cuenta que el rendimiento del proceso se puede ajustar a diferentes variables (temperatura, origen de los enzimas, características de los enzimas, presencia de iones, sustratos iniciales...). Por ejemplo, el almidón resistente, que podría bien ser considerado una fibra dietética al no verse afectada por la digestión, puede ser hidrolizado vía enzimática mediante la utilización de amilasas acopladas a ciclos de autoclaves de refrigeración<sup>11</sup>. También hay que considerar que, tal y como afirman los investigadores del Laboratorio Estatal de Ciencia y Tecnología de los Alimentos chino<sup>12</sup>, una muy elevada concentración de almidón en los lodos iniciales dificulta de manera considerable la gelatinización del mismo.

Con todo esto se quiere poner de manifiesto que hoy en día lo importante no es tener la capacidad de hidrolizar casi cualquier sustancia mediante enzimólisis, sino poder ajustar los parámetros para alcanzar un rendimiento específico

#### PRODUCCION DE FRUCTOSA CON GLUCOSA ISOMERASA

Los siropes de glucosa pueden transformarse en una mezcla de glucosa-fructosa mediante la acción de glucosa isomerasa (E.C. 5.3.1.18). Este enzima fue descubierto en 1957 y fue desarrollado en la segunda mitad de los años sesenta. La glucosa isomerasa es realmente una xilosa isomerasa que convierte la xilosa en xilulosa, aunque su actividad sobre la glucosa es también elevada. Como consecuencia de esto, este enzima fue utilizado para obtener edulcorantes alternativos. El primer proceso industrial de producción de siropes de fructosa a partir de glucosa fue descrito por investigadores japoneses. En un primer momento se utilizó la enzima en solución. No obstante, pronto descubrieron que la inmovilización del enzima propiciaba unos resultados más rentables. En EEUU, el almidón proveniente del maíz es convertido en masa en siropes de fructosa con alta concentración. Este enzima solo puede

convertir una parte de la glucosa en fructosa, pues ambas moléculas son sustratos enzimáticos de manera que al final se alcanza un equilibrio glucosa-fructosa al 50 %. Ahora bien, en función de determinadas condiciones se puede inclinar el equilibrio hacia un lado u otro.

Existen algunas investigaciones actuales centradas en la purificación y caracterización de este tipo de enzimas. Un ejemplo de ello se encuentra en China, donde investigadores<sup>13</sup> han realizado trabajos de ingeniería genética que consiste en introducir el gen que produce dicha enzima (gen perteneciente a *Thermobifida fusca*) en *Escherichia coli* BL21. La temperatura óptima de la glucosa isomerasa fue de 80 °C y su vida media fue de dos horas a 80 °C o de quince horas a 70 °C. El pH óptimo fue de 10. La tasa de transformación de glucosa en fructosa alcanza su máximo cuando el pH es igual a 7.5 y la temperatura es de 70 °C. A continuación se mostrará la tabla que estos investigadores chinos publicaron, en la que se ven los parámetros de las glucosa isomerasas provenientes de diferentes microorganismos.

**Tabla 2.** Parámetros de actuación de diferentes glucosa-isomerasas en función de su origen. Tomado de Deng et al. (2014).

Organismo	Temp (°C)	K <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (mM)	K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (min <sup>-1</sup> /mM)
Clase I				
<i>Thermobifida fusca</i>	70	1668	197	8.6
<i>Arthrobacter sp.</i>	60	1190	210	5.7
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	60	1494	290	5.2
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	60	760	220	3.4
<i>Streptomyces griseoflavus</i>	60	230	250	0.9
<i>Thermus aquaticus</i>	70	294	93	3.2
Clase II				
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	60	330	220	1.5
<i>Thermoanaerobacter saccharolyticum</i>	65	315	120	2.6
<i>T. thermosulfurigenes</i>	65	265	142	1.9
<i>Thermoanaerobacter maritime</i>	90	810	118	6.9
<i>Thermoanaerobacter neapolitana</i>	90	1139	88.5	12.9

## SÍNTESIS DE OLIGO Y POLISACÁRIDOS

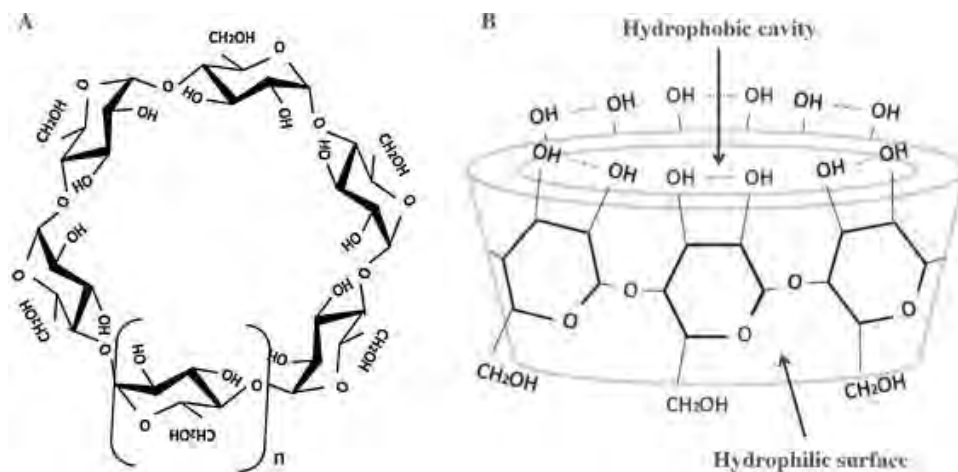
### Glucanotransferasas

El conjunto de enzimas, englobadas bajo el nombre de glucanotransferasas, llevan a cabo una reacción de transglucosilación en la que una parte de la molécula donadora es transferida a un aceptor. La enzima ciclodextrin glucosiltransferasa es un buen ejemplo estas transferasas. En la parte inicial de la reacción, la enzima rompe los enlaces o-glucosídicos. En una segunda parte transfiere el extremo no reductor al extremo reductor con el objeto de formar una molécula cíclica.

Existen dos tipos de glucanotransferasas: las 4-alfa-glucanotransferasas (también conocidas como amilomaltasas) que forman enlaces alfa-1,4 y, las ramificadoras del glucógeno/almidón que forman enlaces alfa-1,6. Ambas se utilizan en la industria alimentaria desde hace décadas.

### **Ciclodextrin-tranferasas**

Las ciclodextrinas son ciclos de glucooligosacáridos unidos mediante enlaces alfa-1,4 que contienen 6, 7 u 8 residuos de glucosa (llamadas alfa-, beta- y gamma-ciclodextrinas respectivamente) y que actualmente es también conocida como azúcares Schardinger. Este tipo de oligosacárido presenta un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica donde pueden acoger moléculas orgánicas no polares (véase la figura).



**Figura 4.** Ilustración de ciclodextrina. Tomado de Costa (2015)

Esta capacidad hace de las ciclodextrinas unas sustancias con beneficiosas propiedades desde el punto de vista tecnológico. En la industria alimentaria pueden ser utilizadas para reducir o eliminar el colesterol de los alimentos, para estabilizar compuestos volátiles y lábiles o para la suprimir olores o sabores no deseados. Uno de los usos que se les ha dado es en el sector de las bebidas. En las bebidas carbonatadas y no carbonatadas, estos oligosacáridos son utilizados para añadir fibra alimentaria al producto final y así mejorar su calidad nutricional. También se les da el mismo uso en cereales y panes.

Otro posible uso es para encapsular sustancias como los ácidos graso omega 3. Investigadores noruegos están investigando sobre las posibilidades de encapsulación usando esta sustancia con el objeto de producir nutraceúticos<sup>14</sup>.

Las ciclodextrinas son producidas mediante la licuefacción del almidón y la posterior adición del enzima ciclodextrina glucosiltransferasa (E.C. 2.4.2.19). La empresa alemana Wacker Chemie comercializan alfa-ciclodextrinas obtenidas de *E. coli* K12 (la información genética para la síntesis del enzima proviene de *Klebsiella oxytoca*). La proteína se purifica a través de precipitación con 1-decanol y decantación y destilación al vapor.

Otro tipo de enzimas que intervienen en la producción de polímeros que contienen residuos cíclicos de glucosa son las cicloamilasas. Aunque no se suelen utilizar de manera comercial, se ha comprobado que tienen un uso potencial como chaperonas para prevenir el mal plegamiento de proteínas.

### ***Amilomaltasas (o 4- $\alpha$ -glucanotrasnferasas)***

Las amilomaltasas, como las obtenidas de *Thermus thermophilus* y *Pyrobacterium aerophilum*, pueden ser utilizadas para producir la gelatinización termorreversible del almidón. La enzima transfiere parte de la amilosa al extremo no reductor de las cadenas laterales de amilopectina. El producto resultante consiste únicamente en la modificación de las moléculas de amilopectina para que las largas cadenas laterales sean capaces de formar un gel blanco y opaco. La gelatinización que produce la amilomaltasa es termorreversible pues el gel se vuelve soluble al aplicar calor. Estas propiedades podrían ser utilizadas como sistemas de encapsulación de sustancias durante la producción de alimentos, tal y como muestran las investigaciones que se han ido desarrollado durante la última década sobre las amilomaltasas<sup>15</sup>.

### **Síntesis de prebióticos a partir de glicosidasas**

Otra de las posibilidades de uso de las glicosidasas son la producción de prebióticos tales como los fructooligosacáridos (FOS) o los galactooligosacáridos (GOS). Los prebióticos son, según la FAO, “ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo”. Otra definición, dada por la Organización Mundial de Gastroenterología es: “sustancias de la dieta, fundamentalmente polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos, no digeribles por enzimas humanas que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas”. Algunos estudios sugieren que los prebióticos podrían ejercer efectos fisiológicos beneficiosos para la salud y el bienestar del organismo, en relación con su capacidad para modular la microbiota intestinal. Estos efectos pueden ser ejercidos no sólo en el colon, sino también en todo el organismo contribuyendo, de esta forma, a reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades intestinales o sistémicas.

Aunque en el mercado mundial se están comercializando como prebióticos un gran número de carbohidratos, solamente existe evidencia científica de sus propiedades en humanos, en los fructanos tipo inulina y los FOS, los GOS, la lactulosa y los oligosacáridos de leche humana.

### ***Síntesis de galactooligosacáridos (GOS)***

Los GOS son compuestos obtenidos industrialmente a partir de la lactosa del permeado de suero de quesería, mediante transglicosilación catalizada por  $\beta$ -galactosidasas (lactasas). Estas enzimas, en determinadas condiciones, son capaces de catalizar tanto la hidrólisis de la lactosa como la formación de un enlace  $\beta$ glicosídico entre la galactosa liberada en la hidrólisis y la

lactosa u otros carbohidratos presentes en el medio de reacción. Los GOS también se encuentran de forma natural en la leche humana y animal. Estos oligosacáridos contienen de 2-10 moléculas de galactosa unidas a una glucosa terminal y se diferencian entre sí en la longitud de la cadena y en el tipo de enlace. Se utilizan en la elaboración de leches maternizadas (junto con FOS) con objeto de imitar los efectos de la leche humana sobre la microbiota de los lactantes. Debido a las posibles propiedades beneficiosas para la salud asociadas al consumo de estos prebióticos, la demanda de alimentos que los contienen se ha incrementado enormemente, particularmente en Japón y Europa. Por ello, se han realizado numerosos estudios encaminados a optimizar su producción especialmente mediante transgalactosilación vía enzimática, ya que la síntesis química es muy tediosa. En la tabla III puede observarse la gran variedad existente, en cuanto a productos comerciales se refiere, de los GOS que se usan actualmente en la industria de alimentos<sup>16</sup>.

**Tabla 3** GOS comerciales y empresas elaboradoras para la industria de alimentos. Tomado de Corzo (2015).

Nombre comercial del prebiótico	Empresas elaboradoras	Procedencia de $\beta$ -galactosidasas
Bimuno (en jarabe y en polvo)	Clasado Ltd Milton Keynes, UK	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Cup-oligo H-70 (jarabe) Cup-oligo P (en polvo)	Nissin Sugar Manufacturing Company Tokio Japón	<i>Cryptococcus laurentii</i>
Dairygold GOS	Dairygold Food Ingredients (Irlanda)	
Garakutoorigo (jarabe)	San-ei Sucrochemical Co, Ltd	
Oligomate 50  Oligomate 55 (jarabe) Oligomate 55 P (en polvo) TOS-100	Yakult Honsha (Tokio, Japón)	<i>A. oryzae, S. thermophilus</i>  <i>S. singularis, K. lactis</i>
Promovita GOS	Fayrefield Food, Creece, UK First milk ingredients, UK	<i>Aspergillus oryzae</i>
Purimune	GTC Nutrition (USA)	<i>Bacillus circulans</i>
P7L	Snow Brabdt Milk Products (Japón)	
Transgalactosylated: - oligosacáridos - disacáridos		<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
Vinal-GOS: TOS syrup	Borculo Domo Ingredients (Zwolle, The Netherlands)	<i>Bacillus circulans</i>

La eficiencia de la síntesis de los GOS debido a la actividad transgalactosidasa de la  $\beta$ -galactosidasa depende tanto de las condiciones aplicadas en el proceso como de la enzima utilizada. La síntesis de GOS es una reacción cinéticamente ajustable, por tanto, las características de la enzima determinan la formación de los GOS, de sus estructuras, y la

productividad del enzima.

Además, aparece el problema de que la lactosa apenas se disuelve en agua (18.9 g por 100 g a 25 °C). Para conseguir una mayor concentración de sustratos se ha de aumentar la temperatura. Considerando que las temperaturas elevadas aumentan la velocidad de reacción de la formación de oligosacáridos, estas temperaturas pueden ser perjudiciales para el biocatalizador. Por otro lado, la alta concentración de azúcares tiene un efecto estabilizador en las proteínas debido a la hidratación preferencial de la proteína.

Esto permite la síntesis de GOS a temperaturas más altas que el óptimo en soluciones acuosas diluidas. Un buen ejemplo es la  $\beta$ -galactosidasa derivada de *Kluyveromyces lactis*, que tiene una temperatura óptima de 40 °C. La actividad de la enzima disminuye rápidamente al aumentar la temperatura en soluciones acuosas<sup>17</sup>.

Además de la temperatura, el valor pH de la solución es otro factor importante que influye en la reacción. La dependencia del pH de la actividad de la enzima se determina en gran medida por el organismo del que se deriva el enzima. La Tabla IV proporciona ejemplos de las  $\beta$ -galactosidasas bien descritos derivadas de diferentes fuentes. También se mencionan los rangos de sustrato y los rendimientos GOS.

**Tabla 4.** Sustratos, temperaturas y rangos de pH en la síntesis de GOS mediante  $\beta$ -galactosidasa obtenida de diferentes fuentes. Tomado de Kovács (2014) .

Fuente de la enzima	Concentración de lactosa (g/L)	Temperatura (°C)	pH	Rendimiento GOS (%w/w)
<i>Bifidobacterium sp.</i>	300-500	37-65	6.0-7.5	20-55
<i>B. circulans</i>	45-400	15-60	4.5-7.0	6-56
<i>K. lactis</i>	200-400	6.5-7.3	6.5-7.3	5-50
<i>A. oryzae</i>	100-475	4.5-6.5	4.5-6.5	10-35

El proceso comienza con la disolución de lactosa a una elevada temperatura para obtener una solución sustrato con un suficiente contenido de materia seca. Posteriormente, la solución se enfría a la temperatura de reacción óptima y se transfiere a un reactor (reactor discontinuo agitado). Después del ajuste del pH usando hidróxido de sodio, se añade la enzima al reactor para la conversión de la lactosa a GOS. Después de la reacción de síntesis, la enzima se inactiva por calentamiento. Después de refinar y decolorar, se añade ácido cítrico y el producto se concentra por un evaporador para obtener un jarabe con 75 % de sólidos totales.





**Figura 5.** Diagrama de flujo en la síntesis de GOS. Tomado de Kovács (2014).

### **Síntesis de fructooligosacáridos (FOS)**

Los FOS son oligosacáridos que se obtienen por hidrólisis de la inulina presente en productos vegetales, o mediante transfructosilación enzimática, a partir de sacarosa, utilizando fructosiltransferasas. Los FOS, obtenidos por síntesis enzimática utilizando sacarosa, son una mezcla de fructanos con los enlaces glicosídicos pueden ser  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) o del tipo  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6). También se pueden obtener mediante hidrólisis parcial utilizando endo-inulinasas obteniéndose oligofructosa<sup>17</sup>. Los FOS formado por hidrólisis contiene cadenas más largas, y no todos los enlaces  $\beta$ -(2-2) de las cadenas fructosilo terminan con una glucosa terminal. Los FOS se encuentran naturalmente en varios materiales biológicos y se pueden extraer de, por ejemplo, la leche caprina, la cebolla, espárragos, y la cáscara del plátano<sup>18</sup>.

Las enzimas utilizadas en la producción de FOS suelen ser la  $\beta$ -D-fructofuranosidasa (invertasa, EC 3.2.1.26) o fructosiltransferasa (EC 2.4.1.9). La síntesis es un proceso complejo que implica una multitud de reacciones secuenciales que conducen a diferentes productos finales. Uno de los subproductos de estas reacciones es la glucosa, que ha resultado ser el principal factor de la disminución de rendimiento durante la síntesis de FOS.

Se ha observado que el tipo de inhibición de la glucosa depende también de la fuente de la enzima. Esto es, la glucosa inhibirá la reacción en un grado u otro en función del origen de la enzima. La enzima proveniente de *Aspergillus niger* ATCC 20611 presenta un modelo de competición no competitiva. La inhibición competitiva por la glucosa se ha observado en *Rhodotorula sp*, *Aspergillus japonicus*, y *Aureobasidium pullulans*. El principal reto en la producción de FOS es lograr un alto rendimiento y una alta pureza de FOS. La cantidad y la naturaleza del FOS formado en el proceso catalizado enzimáticamente dependen de varios factores, incluyendo la fuente de la enzima, la concentración, y la naturaleza del sustrato, y las condiciones de reacción.

Los FOS producidos a partir de sacarosa también pueden producirse a partir de la sacarosa presente en diferentes fuentes, tales como los desperdicios agrícolas o subproductos baratos. Un ejemplo son la melaza de remolacha, los residuos de yuca, el salvado de cereales, productos de maíz, bagazo de caña de azúcar y subproductos del café y el té. En la tabla 5 se muestran las diferentes características de las enzimas según su origen:

**Tabla 5.** Características de las fructosiltransferasas (según su origen) utilizadas para la producción de FOS y la conversión de sacarosa. Tomado de Kovács (2014).

Fuente de la enzima	Concentración inicial de sacarosa (g/L)	Condiciones de la reacción	Conversión de sacarosa (%w/w)	Rendimiento FOS (%w/w)	Fructosa liberada (%w/w)
<i>Aspergillus sp. 27H</i>	615	40 °C, pH 5.5	52	61	Trazas
<i>Aspergillus sp. N74</i>	550	60 °C, pH 5.5	90	50	*n.r.
<i>Aspergillus oryzae</i>	600	55 °C, pH 6 (0.05 M citrato/fosfato)	86	57	Trazas
<i>A. oryzae</i> MTCC 5154	600	55 °C	80	54	*n.r.
<i>A. pullulans</i>	600	55 °C, pH 5 (acetato de sodio)	*n.r.	59	*n.r.
<i>B. macerans</i> EG-6	200	50 °C, pH 5 (acetato de sodio)	93	39	10
<i>B. macerans</i> EG-6	500	37°C, pH 6 (fosfato)	98	42	9
<i>F. oxysporum</i> 172464	500	26 °C, pH 5 (acetato de sodio)	50	30	30
<i>Penicillium rugulosum</i>	775	55 °C, pH 5.5 (acetato de sodio)	98	84	1.4
<i>Rhodotorula sp. LEB-V10</i>	775	50 °C, pH 4.5 (50 mM acetato de sodio)	91	54	2
<i>Rhizopus stolonifer</i> LAU 07	600	55 °C, pH 5.2 (0.1 M ácido cítrico/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	*n.r.	34	*n.r.
<i>Aspegillus aculeatus</i>	400-600	50-65 °C, pH 5-6	70-89	53-69	0-6

\* No remitido

El mercado de los FOS ya es sustancial y está creciendo rápidamente. En la actualidad, un gran número de compañías producen FOS en escala industrial. A continuación se resumirá el proceso de fabricación de Neosugar G y Neosugar P, las dos formulaciones de FOS producidas

comercialmente por Meiji Seika (Japón). Neosugar G se produce en un proceso por lotes convencional usando enzimas libres obtenidos a partir de *Aspergillus niger* ATCC 20611. La reacción se lleva a cabo en un reactor de tanque agitado con una solución de sacarosa de alta concentración (50-60 (% w/w)) a pH 5,5-6,0 y a 50-60 °C. La mezcla de hidratos de carbono resultante (que contienen FOS, glucosa, y sacarosa residual) después se calienta hasta 90 °C durante 30 min con el fin de desactivar la enzima. La mezcla de reacción se enfría a menos de 50 °C, se clarifica por filtración, y se desioniza a través de una columna de resina de intercambio iónico. La mezcla de reacción purificada se concentra al 75% (w / w) por evaporación. El producto resultante, Neosugar G, se compone de alrededor de 55-60% FOS sobre una base total de carbohidratos. Neosugar P, en la que el contenido de FOS es de más de 95% sobre una base total de carbohidratos, se obtiene a partir Neosugar G mediante la eliminación de azúcar y glucosa residual por cromatografía Movingbed simulada<sup>18</sup>.

Actualmente está aceptado que la inulina y los FOS no se degradan ni se absorben en el tracto gastrointestinal superior de tal forma que llegan intactos al colon donde son metabolizados por la microbiota intestinal. La configuración  $\beta$  en posición 2 $\rightarrow$ 1, del carbono anomérico de la fructosa, les hace resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas. Los FOS favorecen el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos disminuyendo el de bacteroides y clostridios. El reconocimiento de la inulina y los FOS como ingredientes GRAS (*Generally Recognized as Safe*) en USA y como FOSHU (*Foods of Specified Health Use*) en Japón ha permitido que actualmente, la inulina y la oligofructosa se utilicen sin restricciones en un gran número de alimentos como yogures, bebidas, barritas de cereales, galletas, cereales y productos de bollería o formando parte de alimentos simbióticos<sup>17</sup>.

### **Hidrólisis de la celulosa y sus derivados**

La celulosa ((C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>) con un valor mínimo de n = 200) es un biopolímero constituido por la unión de moléculas de  $\beta$ -glucosa a través de enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídico, lo que hace que sea insoluble en agua. El enlace  $\beta$  impide que la molécula se enrolle, de forma que las cadenas de celulosa pueden adoptar una conformación plenamente extendida permitiendo que se empaqueten con facilidad mediante puentes de hidrógeno, lo que explica su resistencia y su insolubilidad en agua. A diferencia de los casos anteriores, los vertebrados no poseen enzimas capaces de hidrolizar el enlace  $\beta$ -(1-4), sólo los herbívoros poseen microorganismos simbióticos con una enzima (celulasa) que permite hidrolizar los enlaces  $\beta$ -(1-4) glucosídicos. En la actualidad, las plantas industriales encargadas de producir celulosa extraen esta fibra de la madera del pino y del eucalipto, separándola de las otras componentes de la madera como la lignina y la hemicelulosa. Durante siglos, esta fibra se ha constituido en la materia prima para la fabricación de diversos objetos de uso cotidiano, entre los cuales sobresale, por su importancia, la elaboración del papel. Al no ser atacable por las enzimas digestivas del hombre, es una importante fuente de “cuerpo voluminoso”, de la dieta. Es parcialmente degradada a glucosa por la acción bacteriana del intestino grueso. Se encuentra en las pieles de frutas, las cubiertas externas de las semillas y de tallos y en las hojas de ciertos vegetales.

La degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular de los vegetales juega un papel importante en la extracción de los compuestos presentes en los vegetales y frutas, ya

que los preparados enzimáticos, al degradar los polisacáridos presentes en el tejido, incrementan la formación de los poros, el tamaño del poro y la porosidad total del sustrato lo que permite una mejor difusión del solvente a través del tejido de las frutas o vegetales dando como resultado una mayor y rápida recuperación de los compuestos extraídos. Pero la aplicación de algunos preparados enzimáticos no está limitada a facilitar la liberación de los componentes alimenticios, o a mejorar la eficiencia del proceso y el rendimiento de la extracción, sino también la acción de las enzimas presenta un impacto importante sobre el aspecto nutricional, la calidad y la estabilidad de los productos extraídos<sup>1</sup>.

El efecto de  $\beta$ -glucanasa (la celulosa es un tipo de  $\beta$ glucano) en la panificación apenas ha sido investigado. El uso de una concentración de enzima óptima (0,04 %) aumentó el volumen específico (57,5 %) y elasticidad (21 %), y redujo la firmeza de la miga (74 %) y la tasa de endurecimiento. El pan al que se le ha adicionado  $\beta$ -glucanasa tenía un mejor sabor, suavidad, y la aceptabilidad global de las características sensoriales en comparación con el pan de control mejoró. Por otra parte, la calidad del pan compuesto de trigo - cebada después de la adición de 0,04 % de beta-glucanasa fue casi igual a la calidad del pan de trigo puro. Estos resultados indican que la masa características reológicas y la calidad del pan de harina de trigo- cebada compuesto se pueden mejorar mediante la adición de un nivel distinto de  $\beta$ -glucanasa<sup>18</sup>.

Las celulasas son enzimas importantes industrialmente, pues se utilizan ampliamente en la industria textil, en la extracción de jugos de frutas, en los aditivos para piensos animales y en la gestión y blanqueamiento de la pasta de papel en la industria del papel. En el escenario actual, hay un creciente interés en la bioconversión de la celulosa en azúcares fermentables, lo que permitiría la producción de biocombustibles y productos químicos a través de fermentaciones industriales<sup>19</sup>.

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- $\beta$ -1,4- glucanasa (1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), la exo- $\beta$ -1,4-glucanasa (1,4- $\beta$ -Dglucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y la  $\beta$ -1,4-glucosidasa o celobiasa ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21).

Las glucanasas son enzimas que degradan  $\beta$ -glucanos y se clasifican en dos grandes grupos según los mecanismos que utilizan para hidrolizar el sustrato, identificados por los productos de hidrólisis: las exo- $\beta$ -glucanasas, las cuales hidrolizan el sustrato por ruptura secuencial de residuos de glucosa desde el extremo no reductor, y las endo-  $\beta$ -glucanasas, que rompen aleatoriamente los sitios de enlace b de la cadena polisacarídica, liberando pequeños oligosacáridos.

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo, sólo algunos de ellos producen la celulasa extracelular capaz de hidrolizar la celulosa. Un ejemplo sería *Trichoderma koningii*. Otros microorganismos productores de celulasas incluyen a los hongos aeróbicos termófilos

(*Sporotrichum thermophile*), los hongos anaeróbicos mesofílicos (*Neocallimastix frontalis*), las bacterias aeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Cellulomonas sp*), y las bacterias anaeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Acetivibrio cellulolyticus*). Entre estos microorganismos, los termofílicos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas de hasta 90 °C. Las enzimas celulolíticas producidas por las bacterias del género *Bacillus* presentan básicamente actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa y exo- $\beta$ -1,4- glucanasa; pero tienen una característica particular, en especial las enzimas producidas por *Bacillus subtilis* y es la resistencia a ser inhibida por la glucosa o celobiosa<sup>1</sup>.

El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: primero la endo  $\beta$ -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración  $\beta$  de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de la exo- $\beta$ -1,4-glucanasa<sup>20</sup>. Esta enzima, que corta las cadenas a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las ciclodextrinas, provoca la separación de unidades de celobiosa o glucosa. Ambas enzimas, la endoglucanasa y la exoglucanasa, son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis.

Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -1,4- glucosidasa celobiosa, porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa.

Además, el estudio de la literatura sugiere que los aditivos metálicos como  $MnCl_2$ ,  $KCl$ ,  $CaCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $FeCl_3$ ,  $CoCl_2$ ,  $PbNO_2$ ,  $HgCl_2$ ,  $MgCl_2$ , y  $CdSO_4$  podrían actuar como cofactores o inhibidores de las enzimas celulolíticas. Para determinar estos iones metálicos que pueden inducir el sistema enzimático, hemos tratado todos estos aditivos metálicos para las aplicaciones prácticas.

Una de las aplicaciones a las que se les está dando a las glucosidasas es para la producción de bioetanol para su uso como combustible.

En un trabajo llevado a cabo por investigadores chinos se propone el reciclaje de enzimas por re-adsorción para reducir el uso de la enzima en la conversión de lignocelulosa y reducir por tanto los gastos de producción. Este estudio propone la combinación de una cepa de levadura modificada genéticamente que expresa  $\beta$ -glucosidasa. Esto permite reducir la cantidad de  $\beta$ -glucosidasa en los experimentos que llevan a cabo el reciclado de enzimas. El uso de estas cepas supuso un ligero aumento en la concentración de etanol que se obtuvo después de un 96-h de fermentación de mazorcas de maíz pretratados. Las concentraciones de etanol

aumentaron un 34,7% y 62,7% en las siguientes dos rondas de reciclaje utilizando la cepa modificada en comparación con aquellos que utilizan su cepa parental sin adición  $\beta$ -glucosidasa. Además, con la adición de  $\beta$ -glucosidasa en 30 CBU / g de celulosa, la concentración de etanol después de dos rondas de reciclaje superó el 90% de la observada en la primera ronda con la cepa de ingeniería a una alta carga de celulosa inicial<sup>21</sup>.

Una vez comentado el uso de las glucosidasas para la producción de biocombustible nos centramos en los posibles usos para estas enzimas en la alimentación. Sabiendo que las glucosidasas son capaces de degradar grandes cadenas de polisacáridos tales como el almidón y la celulosa, y teniendo en cuenta que hay enzimas que son capaces de transformar los productos de las reacciones glicolíticas en otros monosacáridos u oligosacáridos más provechosos que la glucosa desde el punto de vista tecnológico e incluso nutricional, es posible considerar el uso de enzimas para producir ingredientes alimentarios a partir de desechos industriales tales como los rastrojos agrícolas u otros residuos orgánicos ricos en polisacáridos (restos vegetales principalmente).

### **OBTENCIÓN DE INGREDIENTES ALIMENTARIOS A PARTIR DE RESTOS VEGETALES**

Los procesos enzimáticos descritos a lo largo del TFG están orientados a responder una pregunta: ¿sería posible obtener todos los ingredientes alimentarios que se describen a partir de restos vegetales como la madera o los rastrojos agrícolas? En este apartado intentaremos analizar la propuesta de si obtener ingredientes para la alimentación a partir de ciertos restos vegetales es posible.

Para poder entender este proyecto es necesario conocer los primeros pasos en la obtención de azúcares simples a partir de hidratos de carbono complejos. En la revista *Unasyva* (1952) se publicó un artículo sobre *la sacarificación de la madera* por métodos no enzimáticos. Tal es la fe de los autores de las investigaciones que llegan a afirmar que: 'Todo país que cuente con abundancia de residuos celulósicos podrá convertir estos materiales en combustible o en alimentos, en caso de guerra, sin tener que recurrir a sus tierras agrícolas productivas.'

''El volumen y naturaleza de los azúcares que puedan obtenerse de la madera, así como los procesos que exige la necesaria hidrólisis, vienen determinados por los polisacáridos de la madera.

El principal polisacárido en todos los materiales de plantas leñosas es la celulosa, análoga desde el punto de vista químico y físico al algodón hidrófilo en el sentido de que es fibrosa, posee una alta resistencia a los álcalis y es muy difícil de hidrolizar con producción de glucosa.

Las hemicelulosas se hallan presentes en la madera y en otros materiales celulósicos en una proporción aproximada de un tercio de los hidratos de carbono totales. La hemicelulosa es amorfa y, por carecer de una organización cristalina, se hidroliza con mucha mayor facilidad que la celulosa. Si el total de hidratos de carbono de la madera pudiera hidrolizarse con la misma facilidad que la hemicelulosa, no habría lugar a dudas en cuanto a la inmediata y amplia utilidad industrial de la sacarificación de la madera.

Los azúcares componentes del producto final de la degradación hidrolítica de 20 especies diferentes de madera contienen glucosano, galactano, manano, arabano y xilano. La proporción de galactano, basada en el azúcar total producido por hidrólisis de especies coníferas, varía entre un 6,0 y un 17,5 por ciento, y la de manano entre un 7,5 y un 16,0 por ciento. Los valores correspondientes para especies frondosas son de 1,0 a 4,0 por ciento y de 0,5 a 4,0 por ciento, respectivamente. El contenido de xilano de las especies coníferas varía entre un 9,0 y un 13,0 por ciento, y el de las especies frondosas entre un 19,5 y un 39,0 por ciento. El contenido de arabano es bajo en todos los casos, y solamente excede del 3 por ciento para tres de las especies coníferas. La composición de los hidratos de carbono de una especie determinada no se mantiene estrictamente constante, pero las variaciones presentes no bastan a borrar las diferencias características observadas entre las coníferas y las frondosas.

La lignina es el principal elemento constitutivo de la madera y de otras plantas, distinto de los hidratos de carbono. En esencia es un material aromático polimerizado, y la mayor parte del mismo se obtiene por procedimientos hidrolíticos como residuo insoluble, en la proporción del 20 al 30 por ciento de la madera tratada. La química de la lignina ha sido estudiada recientemente con todo detalle por Brauns ( falta el año). A pesar de que la lignina no ha tenido mucha aplicación hasta ahora, podría muy bien resultar la clave de algún futuro y satisfactorio proceso de elaboración para el aprovechamiento combinado de residuos celulósicos.

La conversión de materiales celulósicos en azúcar parece a primera vista constituir una simple disociación hidrolítica de los enlaces de los glucósidos. Según esto debería esperarse una reacción simple, con reducido gasto para la fábrica que a ello se dedique. En la realidad, sin embargo, la celulosa es un polisacárido único entre todos los conocidos y posee una extremada resistencia a la hidrólisis. Los enlaces de los glucósidos se disocian fácilmente, pero la estructura cristalina de la celulosa da por resultado una baja accesibilidad para el ácido diluido que de ordinario se emplea como catalizador. En consecuencia, la temperatura y concentración del ácido necesarias para conseguir la reacción en un tiempo razonable ocasiona una grave descomposición de los azúcares resultantes. Enfrentados con esta realidad, solamente se presentan unas cuantas soluciones alternativas para una hidrólisis práctica:

1. Efectuar una simple hidrólisis por ácido diluido sin separar el producto a medida que éste se forma.
2. Seguir un procedimiento de percolación en el que se aumente el rendimiento mediante una extracción continua del producto a medida que se forma.
3. Seguir, en fin, un procedimiento por ácido concentrado por el que se destruya la estructura cristalina de la celulosa y se solubilizan los hidratos de carbono, hidrolizándolos por último totalmente por ácido diluido.

Tras una profunda explicación del proceso de comentará los principales problemas que surgieron y algunas posibles soluciones que pudieron adoptar:

Considerando el elevado coste de la manipulación de las materias primas, el costo de los productos químicos y las necesidades térmicas, resulta evidente que habrá de tratarse por todos los medios de aprovechar plenamente todos los productos resultantes, y éstos deberán obtenerse con la máxima calidad posible y compatible con el costo. Ninguna empresa comercial ha tenido éxito en tal aprovechamiento. En ningún caso pudo encontrarse para la lignina, que forma del 30 al 40 por ciento de la sustancia leñosa seca, un uso más ventajoso que el de combustible. Se ha visto que en algunos casos la fracción de hemicelulosa necesitaba un tratamiento mucho más moderado que la celulosa resistente, pero no se ha aprovechado la circunstancia de que, al menos un producto químico de naturaleza única, como es el furfurool, podía obtenerse de esta fracción de pentosano. En casi todos los casos el hexosano producido se ha utilizado en forma de melazas crudas que contenían una gran proporción de impurezas desconocidas. Sin duda alguna, parte de estas impurezas podrían separarse con gran provecho en forma de productos químicos orgánicos de precio superior, lo que conduciría a una doble ganancia. Tratándose del proceso por ácido fuerte, se obtiene una fracción de azúcar de alta calidad. Recientemente se ha propuesto un plan para fabricar dextrosa cristalina, que permitiría vender aproximadamente el 55 por ciento del azúcar producido como alimento, colocándose el resto como melazas. La producción de azúcares de alta calidad a partir de los productos de la hidrólisis de la madera por ácido diluido no ha llegado a conocerse debidamente, debiendo ser objeto de posteriores investigaciones. Se ha indicado un método para purificar el azúcar mediante la adición de cloruro sódico, que forma un cristal binario con la glucosa. El rendimiento en azúcar de todos los procesos es elevado. Sería provechoso orientar las nuevas investigaciones hacia un aumento en el rendimiento de los productos totales.”<sup>8</sup>.

Ya mostrado el proceso que se realizó químicamente analizaremos si los problemas que los científicos reportaban se pueden resolver con el uso de las glicosidasas.

Para saber la composición de la madera (información más actualizada que la anterior) tomaremos los datos de un estudio mexicano para la especies vegetales *D. granadillo* y *P. lasiocarpum*: lignina (26.24 a 27.24 %) y holocelulosa (49.24 a 50.66 %), y lignina (25.24 a 25.95 %) y holocelulosa (53.26 a 55.25 %), respectivamente<sup>22</sup>. Así pues, estos son los principales componentes sobre los que actuaría la glucosidasa.

Se llama holocelulosa al total de carbohidratos poliméricos que hay en el material, es decir a la suma de celulosa y hemicelulosas<sup>23</sup>.

De la celulosa ya hemos visto su hidrólisis mediante el uso de celulasas. En un experimento publicado por *Journal of Experimental Nanoscience* se utilizó  $\beta$ - glucosidasa de *Trichoderma reesei* y se inmovilizó sobre magnetita sintética superparamagnético ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) con nanopartículas con un diámetro medio de 10 nm. Esto se utiliza para complementar celulasa en la hidrólisis enzimática de tres sustratos: paja de trigo pretratada con vapor, *Eucalyptus globulus* pretratada por hidrotermólisis y *E. globulus* pretratada por hidrotermólisis seguido por extracción alcalina. Los rendimientos de hidrólisis para cada material pretratado, utilizando  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada y celulasa libre, fueron 76,1 %, 83,6 % y 75,6 %, respectivamente, y resultaron en una mejora de los rendimientos de hidrólisis en comparación con sólo celulasa.



La inmovilización de enzimas ofrece una oportunidad para reducir los costos de las enzimas en el proceso de producción de bioetanol<sup>24</sup>, y alternativamente para la producción de ingredientes alimentarios.

El xilano es el segundo de los polisacáridos más abundante renovables en la hemicelulosa. Se ha estimado que aproximadamente 500 millones de toneladas de este tipo de materiales se producen anualmente a partir de los residuos de los cultivos más importantes y por lo tanto la extracción efectiva de procesos enzimáticos y microbiológicos de estos materiales es de gran interés industrial.

El cultivo del arroz produce aproximadamente ocho y cincuenta y ocho toneladas por hectárea paja de arroz como una biomasa vegetal valiosa y renovable, que es un desperdicio agrícola importante en Corea del Sur. La quema de biomasa de residuos de arroz tiene implicaciones de riesgo ambientales globales. La biomasa de residuos de arroz produce principalmente tres componentes químicos; celulosa (25-35%), hemicelulosa (25-30%), lignina (10-20%) y podría ser utilizado como un recurso renovable de energía. *Streptomyces sp. MDS*, la cepa estudiada en este trabajo, fue capaz de crecer en diferentes sustratos celulósicos produciendo sustancial múltiple celulolítica (endoglucanasa, exoglucanasa, celobiasa) y hemicelulolítica (xilanas y glucoamilasa) enzimas extracelulares. El análisis HPLC confirmó la degradación de estos sustratos celulósicos en azúcares solubles que indican la implicación de las celulasas en el metabolismo de estos sustratos. La suplementación con iones  $Ca_2^+$  y  $Fe_2^+$  estimuló significativamente la actividad de todas las enzimas celulolíticas. Múltiples enzimas celulolíticas producidas por *Streptomyces sp. MDS* en la presencia de diferentes sustratos celulósicos muestran una tolerancia térmica alta, un rango de actuación de pH y la estabilidad del detergente suficientemente alto para justificar aplicabilidad de esta cepa. Estas características enzimáticas son atractivas para potenciales biorrefinerías lignocelulósicas tomando para ello abundante biomasa de residuos lignocelulósicos nativa (principalmente, la paja de arroz, paja de trigo) como sustrato. Los resultados obtenidos hacen de esta variedad digna de mayor investigación, y potencialmente viable para aplicaciones biotecnológicas en diferentes áreas para la hidrólisis de diferentes sustratos celulósicos mediante la producción de enzimas celulolíticas de múltiples componentes y la utilización del hidrolizado de celulosa para la producción de etanol<sup>20</sup> (o alimentos).

Para poder llevar a cabo este proceso de obtención de ingredientes alimentarios de manera bibliográfica se ha de buscar información sobre la producción de etanol vía enzimática pues el proceso de sacarificación es común en ambos. Según la revista FUEL entre las enzimas necesarias para la hidrólisis del almidón granular, el principal grupo comprende enzimas amilolíticas que actúan sinérgicamente con polisacáridos desramificantes (amilosa de cadena lineal y amilopectina de cadena ramificada) en glucosa. Entre las enzimas que se utilizan para la hidrólisis del almidón granular, el principal grupo de ellas las comprenden las enzimas amilolíticas, las cuales actúan sinérgicamente para producir la hidrólisis de los polisacáridos a azúcares más simples como a glucosa. El complejo se compone de endoamilasas, exoamilasas, y enzimas desramificadoras. Es importante mencionar que otras hidrolasas también juegan un papel importante en el proceso. Estas llamadas hidrolasas accesorias incluyen celulasas, xilanasas y proteasas, y su acción contribuye a exponer el almidón crudo a las amilasas. Por lo tanto, la producción de complejos multienzimáticos que contienen amilasas y enzimas

accesorias puede contribuir significativamente a mejorar la conversión y la viabilidad de la hidrólisis de almidón granular<sup>25</sup>.

La conversión industrial de la biomasa lignocelulósica requiere una etapa de pretratamiento para permitir la sacarificación enzimática subsiguiente. Esto a menudo se caracteriza por una combinación de condiciones físico-químicas extremas que implican pH alto / bajo y las temperaturas, presión elevada y altas concentraciones de sal con el fin de eliminar la lignina, reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad, de modo que las fibras de celulosa se hacen más susceptibles a la hidrólisis por enzimas. El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica supone unas condiciones duras (altas temperaturas y presiones; extremos de pH). Las extremozimas (es decir, enzimas capaces de llevar a cabo la catálisis en condiciones extremas) son capaces de llevar a cabo la catálisis durante etapas de pretratamiento para reducir al mínimo el coste y la complicación de las condiciones variables de proceso entre el pretratamiento y los pasos de la hidrólisis enzimática. *Archaea*, bacterias y hongos sintetizan las extremozimas, algunas de las cuales tienen propiedades poliextremofílicas. Dichas enzimas poliextremofílicas pueden soportar simultáneamente una combinación de más de una condición severa como la alta temperatura y la presión (*thermopiezophilic*), baja temperatura y alta presión (*psychropiezophilic*), o de alta temperatura y pH bajo (*thermoacidophilic*). Las hidrolasas termófilas de procariontas se han expresado en plantas que llevan a cabo la autohidrólisis de los componentes de polisacáridos de las paredes celulares secundarias<sup>26</sup>. En la siguiente tabla se muestran algunas de estas extremozimas.

**Tabla 6.** Ejemplo de genes hipertermófilos clonados mediante complementación o mediante screening a alta temperatura. Tomado de Guerriero (2015).

Fuente	Gen	Método de clonación	Promotor
<i>Thermotoga maritima</i>	Endoxilanasas	Screening	Vector plac
	$\beta$ -Fructosidasa	Screening	Desconocido
	$\alpha$ -Galactosidasa	Screening	Desconocido
	$\beta$ -Galactosidasa	Screening	Promotor Lambda
	$\beta$ -Glucosidasa	Screening	Desconocido
	GHD	Complementación	Desconocido
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Maltosintransferasa	Screening	Promotor propio
	Adenilato kinasa	Complementación	Promotor propio
	Metionina aminopeptidasa	Screening	Desconocido
	Ornitina carbamoiltransferasa	Complementación	Vector Tac
	Amilopululanasa	Screening	<i>E.coli</i>
	$\alpha$ -Amilasa	Screening	<i>E.coli</i>
	Pirridolina carboxil peptidasa	Screening	Desconocido
	Enterasa	Screening	Desconocido
	Endoglucanasa	Screening	Desconocido
<i>Pyrococcus woesei</i> <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Pululanasa	Screening	Desconocido
	Aspartato carbamoiltransferasa	Complementación	Desconocido

No obstante no hay que olvidar el uso de enzimas procedentes de hongos, las cuales, como las de *Aspergillus*, *Neurospora* y *Trichoderma*, son capaces de actuar también a amplios rangos de pH y temperatura.

El pretratamiento más eficaz y económico consiste en la explosión de vapor en la cual, se calienta la biomasa lignocelulósica (160-230 ° C) durante un tiempo corto (40-240 s) a alta presión (7-47 atm) de vapor y después se somete a la descompresión explosiva. Además de hacer que la biomasa más accesible a enzimas celulolíticas, este tratamiento también favorece la hidrólisis de hemicelulosa. Es de destacar que la adición de SO<sub>2</sub> en la explosión de vapor puede reducir el tiempo y la temperatura, mejorar la hidrólisis, y disminuir la producción de compuestos inhibidores, lo que supone la eliminación completa de hemicelulosa. El proceso es muy eficaz para las maderas blandas que tienen una química de lignocelulosa diferente (más lignina condensada), en comparación con las maderas duras<sup>27</sup>.

La destrucción de la biomasa lignocelulósica requiere la acción sinérgica de numerosas enzimas oxidativas, hidrolíticas y no hidrolíticas. Las enzimas oxidativas incluyen a las lacasas (oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) y peroxidasas de clase II, tales como la lignina-peroxidasa (EC 1.11.1.14), la manganeso-peroxidasa (EC 1.11.1.13) y la lignina híbrido/manganeso versátil-peroxidasa (EC 1.11.1.16) que catalizan la escisión oxidativa de enlaces C-C y C-O-C en una amplia variedad de compuestos orgánicos, incluyendo polifenoles y lignina, con la generación de radicales libres. Las enzimas hidrolíticas degradan ambos polímeros de celulosa y hemicelulosa e incluyen celulasas (endo-endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa, EC 3.2.1.4), que actúan al azar sobre los enlaces internos de la celulosa y generan oligosacáridos, y exo-celulasas (exo-1, 4- $\beta$ -D-glucanasa, celobiohidrolasa EC 3.2.1.91), que sólo ataca al polímero de celulosa a través de los extremos no reductores para producir celobiosa. El disacárido es finalmente hidrolizado por  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) para formar unidades de glucosa. La hidrólisis de la hemicelulosa implica que muchas enzimas actúen de forma cooperativa, como por ejemplo, las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas (CE 3.2.1.8), las  $\beta$ -d-xilosidasa (CE 3.2.1.37), que rompe los enlaces del xilano, las 1,4- $\beta$ -d-endo-mananasas (EC 3.2.1.78 ) y las 1,4- $\beta$ -D-manosidasas (EC 3.2.1.25) que hidrolizan el manano, así como las  $\alpha$ -L-arabinosidasas, las  $\beta$ -glucosidasas, las  $\beta$ -galactosidasas, las  $\alpha$ -glucuronidasas, las acetilxilano esterasas, arabinofuranosidasas, las acetilmanano esterasas, las feruloyl esterasas, las galacto- y glucomannanasas, el ácido p-cumárico y las acetilxilano esterasas<sup>27</sup>.

Por ejemplo, los ascomicetos, hongos fitopatógenos, tales como las especies de *Fusarium* tienen una capacidad natural importante para degradar componentes de las paredes celulares secundarias y por lo tanto pueden penetrar en los tejidos vegetales. Estas enzimas pueden ser utilizadas en los procesos industriales. La maquinaria degradante de polisacáridos del basidiomiceto *Flammulina velutipes* y su utilidad en la producción de bioetanol ha sido investigada recientemente. Similar a los ascomicetos, los basidiomicetos han sido ampliamente estudiados para ser utilizado como una fuente de catalizadores para enriquecer los cócteles de enzimas que actualmente se utilizan para la deconstrucción eficiente de la biomasa de la planta. Estudios de proteómica cuantitativos sobre *Phanerochaete chrysosporium* han revelado que la producción de enzimas lignocelulolíticas no sólo depende de la fuente, sino que también está influenciada por el tamaño de partícula y la complejidad de la biomasa lignocelulósica. La limitación del nitrógeno desencadena la producción de enzimas que degradan la lignina.

En el genoma de *Rhizopus oryzae* se identificó un total de 317 enzimas con actividad sobre los hidratos de carbono, un número que es menor que en los ascomicetos filamentosos. El genoma de *R. oryzae* contiene un elevado número de endo-glucanasas pero carece de enzimas accesorias. Además, ninguna de las glicosil hidrolasas de esta familia codifica  $\beta$ -glucosidasas.

#### 4. PERSPECTIVAS FUTURAS

La importancia económica de la biomasa lignocelulósica de los restos vegetales como fuente de recursos químicos y bioenergéticos impulsa la inversión en investigación a pesar de los desafíos técnicos que representan. Se necesita un enfoque múltiple para poder explotar de manera eficiente y rentable la biomasa lignocelulósica. A continuación se comentarán las principales desafíos a los que se encuentra este problema:

1. Un mayor estudio en la nutrigenómica de los hongos con objeto de conocer todos aquellos aspectos fisiológicos relacionados con la síntesis de enzimas. Un mayor conocimiento de estos factores permitiría diseñar cepas que hipersecretaran todos aquellos productos de interés. Por otra parte, la interacción entre las fuentes de C y N debe ser investigado utilizando enfoques de alto rendimiento (proteómica, transcriptómica y metabolómica) para identificar los factores críticos que intervienen en la producción y secreción de enzimas, pues se está observando que cuando existen fuentes de C y N, el hongo producirá más enzimas hidrolíticas.
2. Avance en los estudios en ingeniería metabólica encaminadas a la hipersecreción de enzimas mediante la modificación de los flujos de carbono en ciertas vías metabólicas. Una comprensión más profunda de los mecanismos de tráfico de vesículas (responsables de la secreción de hidrolasas de la pared celular) en hongos son también muy importantes para mejorar la producción de enzimas.
3. El estudio del impacto de diferentes factores ambientales (como la luz, la temperatura, el pH y las fuentes de N / C) a nivel epigenético puede ayudar a diseñar nuevas cepas secretoras.
4. Ingeniería de orgánulos: La modificación de cepas microbianas utilizando la ingeniería de orgánulos está ofreciendo resultados prometedores. Por ejemplo, la "peroxicreción", es decir, una vía secretora artificial activada por la fusión de los peroxisomas con la membrana plasmática es un enfoque atractivo para aumentar la expresión de hidrolasas secretadas para la degradación de la biomasa vegetal.
5. Mejoras en metagenómica ambiental. Se han de dedicar más esfuerzos encaminados al estudio de la metagenómica de ciertas asociaciones de microorganismos, especialmente de las que prosperan en ambientes extremos para identificar nuevos candidatos potenciales con aplicaciones industriales. Asimismo, los microorganismos simbióticos de los intestinos de las termitas merecen más estudios enfocados en la secuenciación de alto rendimiento y en su caracterización bioquímica. La microbiota intestinal de las termitas está compuesta por representantes de los tres dominios de la vida, es decir, *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*, lo que hacen que la termita sea un mini-bioreactor extremadamente eficiente.
6. Mayor investigación en la "materia negra" del ADN, es decir, de aquellas secuencias que se encargan de sintetizar proteínas con funciones desconocidas. Después de revisar más de 5.000 genomas microbianos, un estudio reciente identificó 17 genes que codifican enzimas que parecen ser celulasas. La expresión heteróloga de estos genes en *E.coli* confirmaron que 11 de esos genes codificaban celulasas. La identificación y caracterización funcional de posibles celulasas en microorganismos con genomas secuenciados tiene un gran potencial para el descubrimiento de nuevos biocatalizadores en la conversión de la biomasa lignocelulósica.

7. Estudios en el diseño de plantas industriales que sea capaz de proporcionar las condiciones (humanas, económicas, tecnológicas...) adecuadas para el tratamiento de la masa lignocelulósica.
8. Desarrollo de enzimas modificadas genéticamente para poder diseñar enzimas con sustratos determinados y con los parámetros de actuación deseados.
9. Mejoras en nuestro conocimientos sobre las actuaciones sinérgicas que presentan determinadas enzimas con el objeto de mejorar el rendimiento en los procesos: la conversión de la biomasa celulósica, especialmente con el propósito de la fabricación de biocombustibles, es todavía relativamente caro debido a la existencia de múltiples pasos y a la lenta rotación de celulasas, debido a la compleja estructura tridimensional (cristalino) de la celulosa. Por ejemplo, la hidrólisis del almidón amorfo por amilasas es cien veces más rápido que la hidrólisis de celulosa. La forma de superar tanto obstáculos implica la acción concertada de al menos tres enzimas (exo-celobiohidrolasa, endo-glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa) para la hidrólisis de la celulosa y otras enzimas tales como la xilanasas y las oxidativas (lacasa, manganeso peroxidasa y lignina -peroxidasa) para la degradación de los componentes de hemicelulosa y lignina, respectivamente.
10. Enzimas magnéticas y reciclaje de enzimas: El costo de las enzimas celulolíticas es otro factor que limita su aplicación comercial. Por ejemplo, la sacarificación con celulasa y amilasa cuesta aproximadamente US \$ 5 y \$ 0.75 respectivamente por cada 100 L de etanol. Una opción rentable para la conversión de biomasa lignocelulósica es inmovilizar las enzimas (peroxidadas clase II, lacasas y glucanasas) sobre las partículas de nano-magnético. Los beneficios de estas enzimas magnéticas en la conversión de biomasa son numerosas y se describen a continuación. En primer lugar, las enzimas nano-magnéticas ofrecen una fácil separación de la mezcla en reacción debido a su susceptibilidad magnética. Esto puede traducirse en menores costos operativos debido a la facilidad en la separación y a la reutilización repetida y reciclado de las enzimas magnéticas. En segundo lugar, el sustrato y la inhibición del producto, que es una característica común en las enzimas de degradación de lignina y celulasas, pueden ser evitados debido a la difusión, la separación de sustratos y productos de las enzimas magnéticas.

## CONCLUSIONES

1. El uso de enzimas en la industria alimentaria es un fenómeno que los egresados en Ciencia y Tecnología de los Alimentos no han de ignorar. Se pueden obtener azúcares simples tales como glucosa, fructosa y maltosa de alta pureza a partir de hidrólisis enzimática de almidones además de oligo y polisacáridos como fructooligosacáridos y dextrinas. No obstante, la obtención de azúcares a partir de residuos vegetales, aunque es viable utilizando los métodos enzimáticos que se describen a lo largo del TFG, es necesario un mayor desarrollo científico en este campo para que el rendimiento de los procesos sea más rentable que los utilizados en la actualidad para obtener dichos ingredientes. Hemos visto cómo la técnica ha de perfeccionarse pues esta permite obtener sustancias que mejoran la calidad del alimento

desde un punto de vista u otro. No ha de obviarse que en un planeta en el que cada día hay más habitantes, la alternativa que ofrece el uso de enzimas para obtener ingredientes alimentarios puede ser un paliativo (que no una solución) al problema que ocasiona el difícil acceso a los alimentos por parte de la población.

2. Los experimentos que se llevaron a cabo en los años cincuenta sobre la sacarificación de la madera o rastrojos agrícolas poseían unos rendimientos tan bajos en relación a su coste que hubieron de ser abandonados. No obstante, en este TFG se ha mostrado que existen mecanismos enzimáticos capaces de destruir la masa lignocelulósica de restos vegetales con objeto de producir otros sacáridos a partir de los cuales se pueden obtener ingredientes alimentarios.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fraatz MA, Martin R, Holger Z. Food and Feed Enzymes. En: Zorn Holger, Czermak Peter (ed) *Biotechnology of Food and Feed Additives*. Ed. Springer Berlin. Edition: 2014.
2. Alba-Lois L, Segal-Kischinevzky C. Beer & Wine Makers. *Nature Education* 2010; 3; 17.
3. REGLAMENTO (CE) No 1332/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 sobre enzimas alimentarias y por el que se modifican la Directiva 83/417/CEE del Consejo, el Reglamento (CE) no 1493/1999 del Consejo, la Directiva 2000/13/CE, la Directiva 2001/112/CE del Consejo y el Reglamento (CE) no 258/97.
4. Hachicha Hbaieb R, Kotti F, García-Rodríguez R, Gargouri M, Sanz C, Pérez AG. Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: Correlation with virgin olive oil phenolic profiles. *Food Chemistry* 2015; 174: 240-247.
5. Kaur J, Chadha BS, Kumar BA, Saini HS. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Bioresource Technology* 2007, 98: 74-81.
6. Guo Y, Yan Q, Yang Y, Yang S, Liu Y, Jiang Z. Expression and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase, with transglycosylation and exo- $\beta$ -1,3-glucanase activities, from *Rhizomucor miehei*. *Food Chemistry* 2015; 175: 431-438.
7. Van der Maarel M. Starch-Processing enzymes. En: Whitehurstm Robert J, Maarten Van Oort. *Enzymes in Food Technology*. Ed. Wiley-Blackwell Groninga. Edition: 2014.
8. Hall JA, Saeman JF, Harris JF. La sacarificación de la madera: Memoria preparada a solicitud de la FAO en relación con la labor del Cuadro Técnico sobre Química de la Madera 1955. Consultado el 15/04/2015 desde <http://www.fao.org/docrep/x5378s/x5378s03.htm>
9. Bagheri A, Khodarahmi R, Mostafaie A. Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. *Food Chemistry* 2014; 161: 270-278.

- 10 Pejin JD, Mojović LV, Pejin DJ, Kocić-Tanackov SD, Savić DS, Nikolić SB, Djukić-Vuković AP. Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. *Fuel* 2015; 142: 58-64.
- 11 Wu H, Yin XH, Xie LY, Xiao MF, Lin Y. Enzymatic hydrolysis coupled with autoclaving-cooling cycles for the preparation of resistant starch. *Modern Food Science and Technology* 2014; 30: 245-250.
- 12 Li Z, Liu W, Gu Z, Li C, Hong Y, Cheng L. The effect of starch concentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch. *Food Hydrocolloids* 2015; 48: 189-196.
13. Deng H, Chen S, Wu D, Chen J, Wu J. Heterologous expression and biochemical characterization of glucose isomerase from *Thermobifida fusca*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2014; 37: 1211-1219.
14. Vestland TL, Jacobsen Ø, Sande SA, Myrset AH, Klaveness J. Compactible powders of omega-3 and  $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chemistry* 2015; 185: 151-158. *Food Chemistry* 2015; 185: 151-158.
- 15 Saehun M, Yongdoo C, Sunghoon P, Jeonghee S, Yong-Ro K. Release properties of gel-type W/O/W encapsulation system prepared using enzymatically-modified starch, *Food Chemistry* 2014; 157: 77-83.
16. Corzo N, Alonso JL, Azpiroz F, Calvo MA, Cirici M, Leis R, Lombó F, Mateos-Aparicio I, Plou FJ, Ruas-Madiedo P, Rúperez P, Redondo-Cuenca A, Sanz ML, Clemente A. Prebiotics: Concept, properties and beneficial effects [Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos]. *Nutricion Hospitalaria* 2015; 31: 99-118.
17. Kovács Z, Benjamins E, Grau K, Ur Rehman A, Ebrahimi M, Czermak P. Recent developments in manufacturing oligosaccharides with prebiotic functions. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2014; 143: 257-295.
18. Li Z, Dong Y, Zhou X, Xiao X, Zhao Y, Yu L. Dough properties and bread quality of wheat-barley composite flour as affected by  $\beta$ -glucanase. *Cereal Chemistry* 2014; 91: 631-638.
- 19 Fang H, Xia L. Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues. *Fuel* 2014; 143: 211-216.
- 20 Gonzalez Ivonne. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. Promisorios como agentes de control biológico. Expresión de la actividad quinasa. *Rev. Protección Vegetal* 2010; 25: 58-63.
- 21 Guo H, Zou S, Liu B, Su R, Huang R, Qi W, Zhang M, He Z. Reducing  $\beta$ -glucosidase supplementation during cellulase recovery using engineered strain for successive



lignocellulose bioconversion. *Bioresource Technology* 2015; 187: 362-368.

22 Rutiaga-Quiñones JG, Pedraza-Bucio FE, López-Albarrán P. Componentes químicos principales de la madera de *Dalbergia granadillo* Pittier y de *Platymiscium lasiocarpum*. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 2010; 16: 2-15.

23 Eduardo Nuñez C. Pulpa y papel I: Química de la madera. Introducción y análisis. 2008. Consultado el 25/04/2015 desde <http://www.cenunez.com.ar/archivos/69-PulpayPapelISextaParte.pdf>

24 Valenzuela R, Castro JF, Parra C, Baeza J, Durán N, Freer J.  $\beta$ -Glucosidase immobilisation on synthetic superparamagnetic magnetite nanoparticles and their application in saccharification of wheat straw and *Eucalyptus globulus* pulps. *Journal of Experimental Nanoscience* 2014; 9: 177-185.

25. Cinelli BA, Castilho LR, Freire DMG, Castro AM. A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. *Fuel* 2015; 150: 721-729.

26. Guerriero G, Hausman JF, Strauss J, Ertan H, Siddiqui KS. Deconstructing plant biomass: Focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases. *Plant Science* 2015; 234: 180-193.

- Costa P, Medronho B, Gonçalves S, Romano A. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three lamiaceae species. *Industrial Crops and Products* 2015; 70: 341-346.

27. Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2001; 65: 1-43.