



**APROVECHAMIENTO Y VALORIZACION DEL ALPEORUJO
TRATADO TERMICAMENTE COMO: FERTILIZANTE BIOLÓGICO Y
FUENTE DE HIDROXITIROSO**

Sandra Marcela Usaquen Alvarado

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

Granada, España. 10 de enero 2008



**APROVECHAMIENTO Y VALORIZACION DEL ALPEORUJO
TRATADO TERMICAMENTE COMO: FERTILIZANTE BIOLOGICO Y
FUENTE DE HIDROXITIRO SOL**

Sandra Marcela Usaquen Alvarado

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar al título de
Microbiólogo Industrial**

Dr. Juan Antonio Ocampo Bote. Director.

Dra. Inmaculada García. Directora.

Marcela Franco Correa. Asesor.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARREERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

Granada, España. 10 de enero 2008

**APROVECHAMIENTO Y VALORIZACION DEL ALPEORUJO
TRATADO TERMICAMENTE COMO: FERTILIZANTE BIOLÓGICO Y
FUENTE DE HIDROXITIRO SOL**

Sandra Marcela Usaquen Alvarado

APROBADO

**Dr. Juan Antonio Ocampo Bote,
Profesor Investigador del CSIC
Director**

**Dra. Inmaculada Garcia Romera,
Investigador Científico del CSIC
Directora**

**Dr. José Manuel García Garrido,
Investigador Científico del CSIC
Jurado**

**Dr. Horst Vierheilig,
Investigador Científico del CSIC
Jurado**

**Marcela Franco Correa,
Microbióloga, M. Sc., DEA
Asesor**

**APROVECHAMIENTO Y VALORIZACION DEL ALPEORUJO
TRATADO TERMICAMENTE COMO: FERTILIZANTE BIOLOGICO Y
FUENTE DE HIDROXITIRO SOL**

Sandra Marcela Usaquen Alvarado

APROBADO

**Ingrid Shuler
Bióloga. Ph. D
Decano Académico**

**Janeth Arias Palacios
Bacterióloga M. Sc- M. Ed
Director de Carrera**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus
alumnos en sus
trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a
la moral
católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona
alguna, antes
bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

PARA MI FAMILIA Y MI LABORATORIO.

AGRADECIMIENTOS

La experiencia vivida al realizar este trabajo deja muchas cosas en mí, me dividió en un antes y un después, me permitió conocer personas tan maravillosas que nunca imagine, aprender tanto profesional como personalmente, y también algo muy importante, reconocer verdaderamente las personas que están conmigo.

Quiero agradecer a mis directores de tesis de la EEZ y a todo su grupo por darme la gran oportunidad de compartir con ellos, aprender de cada uno y sobre todo por aceptarme sin saber absolutamente nada de mí, por eso siempre agradeceré todo su apoyo porque fueron mi familia en el tiempo que viví en Granada, España.

Agradecer a mi mamá por su constancia, por su llamada diaria durante un año y medio, por su fuerza para poderme mantener. A mi papá por su ánimo y por sus palabras precisas en el momento exacto. A mi tío Jairo por mantener siempre la razón y transmitirme toda su sabiduría. A mi hermanita por su alegría en momentos difíciles, y en general a toda mi familia por su amor y confianza.

Por su puesto a tres personas también muy especiales, Carol por su impulso y su compañía. A Ivonn porque nunca estuve sola aunque estuvimos lejos, por mantenerte conectada a mí. A Carmen mi gran compi de piso por sus consejos incondicionales y su gran sonrisa.

No por ser lo último es lo menos importante, deseo agradecer a la Universidad Javeriana por todas las experiencias y enseñanzas, y sobre todo a Marce por su amistad y ayuda.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Resumen	07
Abstract	08
Introducción	09
Marco teórico	12
1. Agricultura industrializada y ecológica	12
2. Fertilizantes a partir de residuos	13
2.2. Problemática de los residuos	13
2.3. Biorremediación	14
3. Agroindustria del olivar	15
3.1. El olivo	15
3.2. Sistemas de extracción de aceite de oliva	16
4. Valoración de los subproductos del olivar	18
4.1. Alpechín	18
4.2. Alpeorujo	19
4.2.1. Características del alpeorujo	19
4.2.2. Compuestos fenólicos del alpeorujo	20
4.2.3. Usos y aprovechamiento del alpeorujo	25
5. Tratamiento para el aprovechamiento del alpeorujo	27
5.1. Pretratamiento físico	27
5.2. Pretratamiento químico	28
5.3. Pretratamiento biológico	28
5.4. Pretratamiento físico-químico	29
Formulación del problema y justificación	31
Objetivos	33
Materiales y métodos	34
1. Alpeorujo	34
2. Tratamiento biológico del alpeorujo	34
2.1. Hongos saprobios	34
2.1.1. Aislamiento de hongos saprobios del suelo	34
2.1.2. Aislamiento de hongos saprobios de la madera	35

2.2. Medios de cultivo	35
2.3. Proceso de incubación del alpeoruj saprobios	36
3. Tratamiento al vapor de alpeoruj	37
4. Recuperación de hidroxitirosol	38
5. Determinación de la fertilidad del alpeoruj	39
5.1. Características del suelo empleado	39
5.2. Plantas	40
5.3. Esterilización de semillas	40
5.4. Cultivos en maceta	40
6. Determinaciones analíticas	41
6.1. Determinación de polifenoles totales extractables	41
7. Análisis estadístico de los resultados	42
Resultados	43
1. Recuperación de hidroxitirosol a partir de alpeoruj	43
2. Efecto del uso del alpeoruj transformado térmica y biológicamente sobre el desarrollo de plantas	47
Discusión	53
Conclusiones	57
Recomendaciones	58
Referencias	60

RESUMEN

El alpeorujo, residuo procedente de la extracción del aceite de oliva se destina, tras secarlo y extraerle el aceite de orujo, a la cogeneración de energía eléctrica y térmica mediante combustión. Sin embargo, y debido a la gran cantidad de residuo que se genera en cada una de las campañas oleícolas, es necesaria la búsqueda de vías alternativas para la completa valorización de este subproducto.

Dada su composición agroquímica podría emplearse como un enmendante orgánico, que contribuiría a restablecer los niveles de materia orgánica de los suelos. Sin embargo posee componentes tóxicos de naturaleza muy variada que producen efectos nocivos sobre el suelo y cultivos vegetales por lo que se necesita su estabilización antes de su uso. Por otro lado este residuo es rico en potentes antioxidantes de gran interés para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

Se han realizado estudios de utilización de tratamientos físicos, químicos y biológicos para la estabilización del alpeorujo, sin embargo, y debido a la composición compleja de este residuo, estos tratamientos requieren largos periodos de tiempo o no son muy efectivos. La detoxificación del alpeorujo se ve potenciada mediante la integración del tratamiento al vapor, el cual combina alteraciones físicas y químicas permitiendo la separación de sus componentes para facilitar la acción de los microorganismos. De esta manera se ha conseguido una recuperación casi completa de hidroxitirosol libre, debido a la acción de la β -glucosidasa liberada por el *Paecilomyces farinosus* en alpeorujo tratado al vapor a 150°C. Cuando se combina el tratamiento térmico del alpeorujo a 150°C con el biológico con *Coloriopsis rigida* se consigue además la detoxificación de dicho residuo en periodos cortos de tiempo.

El tratamiento integral del alpeorujo descrito en este trabajo solucionaría un gran problema medioambiental mediante una valorización completa del alpeorujo.

ABSTRACT

The alpeorujo, a residue from the olive oil extraction is used in the cogeneration of electric and thermal energy through combustion, after drying it and extracting the orujo oil. Nevertheless, due to the high quantity of residue generated in each olive harvest, different use of this sub-product is necessary.

Because of its agrochemical composition it could be used as an organic amendment, which would contribute in restoring the levels of the organic matter of soils. However, the alpeorujo has a lot of toxic compounds that have negative effects on the soil and plants, for that, it is necessary to be stabilized before its use. On the other hand this residue has a lot of very strong antioxidants that could be used in the pharmaceutical, cosmetic and feed industries.

Some physical, chemical and biological treatments for the stabilization of the alpeorujo have been carried out. Nevertheless, due to the complex composition of this residue those treatments are time consuming and/or not effective. The detoxification of alpeorujo by steaming treatment, which combines physical and chemical alterations, produced compounds easier to the action by microorganisms. In that way, an almost complete recovery of free hydroxytyrosol due to the action of the β -glucosidase released by *Paecilomyces farinosus* from alpeorujo after 150°C's steam has been obtained. When the thermal treatment of alpeorujo was combined with biological treatment using *Coloriopsis rigida*, a detoxification of this residue was obtained in shorter time.

The integral treatment of the alpeorujo described in this work allows solving a great environmental problem caused by this residue.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de aceite de oliva, dadas las propiedades beneficiosas que posee para la salud y su presencia en la dieta Mediterránea, hacen que la agroindustria del olivar sea de enorme importancia en España y especialmente en Andalucía donde la producción de aceite de oliva es del 80% de producción nacional. Las transformaciones tecnológicas producidas en el proceso de elaboración del aceite de oliva a lo largo de los últimos veinticinco años han ido modificando notoriamente la producción, composición y aprovechamiento de sus subproductos. El sistema de extracción continua mediante centrífugas de tres fases que genera aceite, “orujo” y “alpechín” se ha ido sustituyendo progresivamente desde los años noventa y en la actualidad, en casi la totalidad de las almazaras del país, se ha implantado el sistema continuo de dos fases donde, además de aceite, se produce un residuo denominado “alpeorujo”. El objetivo de este cambio tecnológico en el proceso de extracción fue la reducción del consumo de agua y de energía aunque esta modificación, sin embargo genera un residuo cuyo manejo supuso adaptaciones del sector respecto a su transporte y almacenamiento y lo que fue más importante respecto a su uso y valorización.

Actualmente el alpeorujo se destina, tras secarlo y extraerle el aceite de orujo, a la cogeneración de energía eléctrica y térmica mediante combustión, sin embargo, y debido a la gran cantidad de residuo que se generan en cada una de las campañas oleícolas, es necesaria la búsqueda de vías alternativas para el tratamiento de estos subproductos.

El alpeorujo, dada su composición vegetal y su riqueza en materia orgánica así como de otros componentes de interés agroquímico, podría emplearse como un enmendante orgánico. Este uso del alpeorujo como fertilizante contribuiría a restablecer los niveles de materia orgánica de los suelos que se pierde continuamente por mineralización y provocan cambios en la estructura del suelo. Sin embargo el alpeorujo, tal y como lo muestran multitud de estudios, no puede aplicarse directamente al suelo por los efectos fitotóxicos derivados principalmente de sustancias como los fenoles (Martín *et al.*, 2002). Además la elevada relación C/N dificulta su aplicación directa a los cultivos ya que provoca

un hambre de N en los mismos que se debería corregir añadiendo una fuente adicional de nitrógeno como el estiércol (Cabrera *et al.*, 2002). También el uso directo de este en el suelo tiene un efecto perjudicial en la estabilidad estructural del suelo y en la población microbiana de este (Sampedro, 2005). Para dar respuestas al problema que genera la existencia de una gran cantidad de alpeorujos y la falta de fuentes de materia orgánica, surgen iniciativas dentro del sector de la agricultura ecológica donde se opta por la estabilización y biotransformación de este subproducto con objeto de obtener fertilizantes orgánicos.

La valorización del alpeorujos mediante compostaje está siendo objeto de estudio en los últimos años debido a que las características físicas del mismo hacen difícil el proceso (Cegarra *et al.*, 2000; Filippi *et al.*, 2002). Sin embargo se ha descrito que son necesario largos periodos de tiempo para llevar a cabo el proceso de compostaje de este residuo por lo que se están buscando alternativas para acelerar dicho proceso. Estudios recientes, llevados a cabo en nuestro grupo de trabajo, demuestran que debido a la complejidad de los compuestos fenólicos, la incubación del alpeorujos con determinados hongos saprobios necesitan al menos 5 meses para disminuir y en algunos casos eliminar la fitotoxicidad de este, debido principalmente a la degradación y/o polimerización de fenoles (Sampedro *et al.*, 2004a,b, 2005).

La aplicación de varios tratamientos físico-químicos puede al mismo tiempo recuperar compuestos de alto valor añadido del alpeorujos así como permitir la detoxificación del residuo al eliminar o disminuir la presencia de ciertos compuestos que son inhibidores de microorganismos (Fernandez-Bolaños *et al.*, 2002a,b, 2004; Ginos *et al.*, 2006). Por tanto, mediante el fraccionamiento físico-químico del alpeorujos sería posible por una parte recuperar ciertos compuestos valiosos del mismo y por otra aumentar la efectividad detoxificadora de los hongos saprobios acortando el tiempo necesario para la eliminación de la fitotoxicidad del residuo e incluso para conseguir la transformación del este en fertilizante orgánico. Por tanto, la combinación de los tratamientos físico-químico y biológico constituiría una vía alternativa de reutilización del alpeorujos contribuyendo a incrementar la rentabilidad y eficacia del aprovechamiento integral del subproducto.

Estos hongos saprobios del suelo que viven en la rizoplasma y micorrizosfera de las plantas intervienen en los procesos de descomposición de la materia orgánica por medio de degradaciones enzimáticas, así como también intervienen en la movilización de los nutrientes. En nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la existencia de hongos capaces de disminuir la fitotoxicidad causada por el alpeorajo seco y extractado (Sampedro *et al.*, 2004a). Hemos encontrado indicaciones de que la disminución de fitotoxicidad del alpeorajo seco y extractado puede estar relacionada con la disminución del contenido fenólico llevada a cabo por determinados hongos saprobios (Sampedro *et al.*, 2005). Se sabe que uno de los mecanismos más importantes de degradación de los fenoles por hongos es mediante la producción de lacasas y enzimas hidrolíticas, especialmente hemicelulasas (Hamman *et al.*, 1999).

MARCO TEÓRICO

1. Agricultura industrializada y ecológica

El concepto de fertilización química no responde a la realidad del suelo como medio vivo ni a su dinámica. Básicamente, la fertilización como técnica debe estar enfocada a mantener o aumentar la fertilidad del suelo agrícola, entendiendo por fertilidad, la capacidad de los suelos agrícolas para mantener de manera perdurable un nivel de producción estable y de calidad, manteniendo un estado de alta estabilidad frente a los procesos que implican su degradación, y todo ello dentro de una amplia gama de condiciones locales agroambientales, socioeconómicas y culturales. El mantenimiento perdurable de la capacidad productiva requiere prácticas de conservación de suelos eficaces para mantener la integridad de su perfil y evitar su degradación por el deterioro de su estructura y por la pérdida de materia orgánica y mineral y practicas de fertilización orgánica que permita el suministro equilibrado de nutrientes esenciales que potencien la biodiversidad edáfica y que optimicen los parámetros edáficos ligados a la conservación de los suelos de cultivo (Bellapart, 1988).

La necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios de síntesis y la demanda impuesta por la sostenibilidad de la agricultura esta conduciendo a el uso de estrategias alternativas que mantengan una producción vegetal competitiva sin deterioro del medio ambiente. En este contexto, el uso fertilizantes obtenidos a partir de residuos (lodos de depuración, “compost” de basuras y de residuos agroindustriales), que se están empleando de forma creciente en agricultura, pueden desempeñar también un papel clave en las prácticas dirigidas a una agricultura sostenible (García-Gómez *et al.*, 2005).

La agricultura ecológica ofrece una solución lógica y con fundamento científico que radica en la alimentación activa del suelo a través del suministro de materia orgánica en sus distintas configuraciones, sin olvidar los aportes minerales en forma de rocas minerales pulverizadas (Cánovas *et al.*, 1993).

La agricultura ecológica debe concebirse como parte integrante de un sistema de producción agraria sostenible y como una alternativa viable a un enfoque más tradicional de la agricultura. Desde la entrada en vigor de la

legislación comunitaria sobre agricultura ecológica en 1992, se cuentan por decenas de miles los productores que han optado por este sistema de producción, como consecuencia del mayor conocimiento por parte de los consumidores de los productos derivados del cultivo ecológico y de una demanda creciente de los mismos. En los últimos años, estamos asistiendo a un desarrollo de la agricultura ecológica al que ha contribuido la creciente toma de conciencia por parte de los consumidores de las cuestiones relacionadas con la seguridad alimenticia y los problemas medioambientales. Aunque en el año 2000 solo representaba el 3% del total de la superficie agrícola útil de la Unión Europea, la agricultura ecológica se ha convertido de hecho en uno de los sectores agrarios más dinámicos dentro de la U.E (Consejo Regulador de la Agricultura Ecológica, 1990).

2. Fertilizantes a partir de residuos

2.2. Problemática de los residuos

Llamamos residuo a cualquier tipo de material que esté generado por la actividad humana y que está destinado a ser desechado; hay objetos o materiales que son residuos en determinadas situaciones, mientras que en otras se pueden reciclar si se dispone de las tecnologías adecuadas y el proceso es económicamente rentable. Una buena gestión de los residuos persigue precisamente no perder el valor económico y la utilidad que pueden tener muchos de ellos y usarlos como materiales útiles en vez de tirarlos (Albarran *et al.*, 2004)

El término contaminación puede usarse para describir todos aquellos efectos de la actividad humana que causan un efecto negativo en el medio ambiente, siendo la producción de residuos la principal causa de contaminación. En los distintos sectores de actividades de nuestra sociedad, el sector primario representa el 80% del total de los residuos generados. En este sector se incluyen los residuos agrícolas, ganaderos, forestales y aquellos derivados de técnicas extractivas (canteras y minas). Los residuos forestales se emplean como combustible y como materia prima dentro de la industria papelera. Los residuos ganaderos, entre los que se incluyen residuos ganaderos de cría (excrementos,

camas y lechos) y residuos de matadero (huesos, sangre y pellejo) y los residuos agrícolas que comprenden los residuos de poda y de cosecha, generalmente se incineran o se someten a compostaje por diferentes técnicas. En un contexto más amplio pueden considerarse también como residuos agrícolas los subproductos de origen vegetal generados por las industrias de transformación agrícolas y algunos residuos agrícolas específicos. Entre estas industrias destacan la industria arrocera, oleícola, vitivinícola, del café, harineras, cerveceras, textil, de frutos secos y de transformación de hortalizas. La industria oleícola es especialmente importante en España y la producción de residuos derivados de la agroindustria del olivar representa un gran problema en la actualidad (Madejón *et al.*, 1998).

La intensificación y globalización de la producción agrícola determina una disminución de los recursos naturales y un aumento de los desechos generados. Se hace por tanto necesario una gestión de estos residuos cuyo objetivo primordial debe ser la conversión de los residuos orgánicos en recursos, para lo cual es necesario aplicarle un tratamiento acorde con el destino final.

2.3. Biorremediación

Uno de los procesos mas usados es la biorremediación que consiste en el uso de organismos vivos (bacterias, hongos, animales y plantas) para degradar sustancias contaminantes. Las biotransformaciones de compuestos orgánicos e inorgánicos por la actividad metabólica de organismos son procesos bioquímicos naturales que ocurren en el medio ambiente, aunque el hombre puede interferir potenciando estos procesos o introduciendo organismos más eficientes para tal fin. La biorremediación puede realizarse *in situ*, cuando se realiza en su localización original o bien *ex situ* cuando el sedimento contaminado es transportado a otra localización para su posterior tratamiento.

La biorremediación se viene empleando en el tratamiento de todo tipo de residuos con el fin de reducir la demanda biológica y química de dichos residuos y de este modo poderlos utilizar o desechar sin ningún peligro medioambiental. En el caso de residuos orgánicos con potencial fertilizante como los residuos agrícolas, la biorremediación permite eliminar los componentes tóxicos de estos y

formar un producto estabilizado con posibilidad de uso como abonos (Dick y Tabatabai, 1993).

3. Agroindustria del olivar

3.1. El olivo

El árbol del olivo (*Olea europea*) de la familia botánica Oleaceae, es la única especie con fruto comestible. Este árbol es perenne, de tronco grueso y corteza grisácea y con hojas que suelen vivir dos o tres años. Sus hojas son simples, de forma lanceolada y bordes enteros, verdes oscuras por el haz, con un característico brillo debido a la existencia de una gruesa cutícula y blanquecinas por el envés. La flor del olivo es menuda posee un fruto pequeño ovoide de color verde amarillento y de sabor muy amargo y con pulpa oleosa una vez que ha llegado a la madurez

El origen del cultivo del olivo es incierto, ciertos historiadores indican que procede de Persia, otros del valle del Nilo y otro indican que es originario del valle del Jordán. Sin embargo la mayoría creen que procede de la antigua Mesopotamia, lugar desde el cual se expandió al resto de los países. Su cultivo para la obtención del aceite de oliva empieza en las épocas paleolítica y neolítica (5000 a 3500 A.C). Los primeros documentos escritos sobre el aceite lo constituyen las tablillas minoicas, e indican que el primer cultivo del aceite se desarrolla, por lo tanto, en una región comprendida entre Palestina, Creta y Egipto.

En la actualidad, el país que más olivos posee es España, seguido a gran distancia por Grecia e Italia y un poco más atrás se encuentran situadas Túnez, Turquía y Siria. Con el descubrimiento de América (1492), España llevo el olivo a América. De Sevilla parten los primeros olivos hacia las Antillas y después al continente. La producción total del aceite de oliva del mundo esta en constante crecimiento desde principios del siglo XX (Aragón y Palancar, 2001).

3.2. Sistemas de extracción de aceite de oliva

Las aceitunas llegan al molino, donde se deben molturar el mismo día de su recolección, ya que el fruto tiene agua vegetal que fermenta y aceite que se oxida, por lo que el tiempo de almacenamiento deteriora notablemente la calidad del producto final. A la llegada a las almazaras, después de haber efectuado la limpieza, las aceitunas se depositan en las tolvas de recepción, clasificándolas por calidades o variedades para obtener los mejores aceites, diferenciándolas principalmente en función de que procedan del árbol o del suelo o con algún posible defecto. A continuación se pasan a las tolvas de alimentación del molino, para posteriormente pasar a la molturación y todo el proceso de fabricación (Arjona *et al.*, 2005).

Hasta 1960 aproximadamente, la tecnología empleada en este proceso era el molino de rulos, y separación de las fases por decantación, pero en la actualidad se emplean trituradores metálicos o molinos de martillos y centrifugas tanto horizontales como verticales para la separación de los tres elementos que forman parte de la composición de la aceituna (aceite, orujo y alpechín). Los rendimientos industriales no son del 100% en lo que a separación de estas fases se refiere por lo que, tanto en el orujo como en el alpechín existen restos de aceite que las maquinas no son capaces de extraer y que en el caso del orujo en el proceso de tres fases y del alpeorujo en dos fases, se extrae posteriormente mediante procesos químicos que no dan un aceite apto para el consumo de forma directa y que se debe refinar. Estos rendimientos industriales, varían dependiendo de multitud de factores, que van desde el proceso seguido para la elaboración del aceite, pasando por la naturaleza de la maquinaria utilizada, y llegando incluso a la profesionalidad y experiencia del personal (Uceda *et al.*, 1995).

Los sistemas de extracción de aceite de oliva han ido cambiando progresivamente debido a los avances tecnológicos en el sector, así, a principios de los años 70 el sistema de prensado clásico por presión se sustituyó por un sistema de centrifugas en tres fases. En este sistema se introduce la masa de aceituna en el decánter o decantador centrífugo horizontal junto con agua del exterior para fluidificar la pasta y hacerla girar a gran velocidad. Con esta centrifugación se consigue la separación por diferencia de densidad de una fase

líquida oleosa o aceite, otra líquida acuosa o alpechín resultante del agua añadida para fluidificar la pasta de aceituna antes de introducirla en la centrífuga, la del lavado de aceituna, y la propia que contiene el fruto y una fase sólida u orujo compuesta por la pulpa, hueso y piel de la aceituna. Este sistema requiere la aplicación suplementaria de agua y provoca la aparición de alpechines con un gran poder contaminante (Alburquerque *et al.*, 2004).

A principios de los 90 se introdujo un nuevo sistema de extracción de aceite de oliva mediante centrífugas de dos fases que redujo en un 75% la proporción de residuos. Con este sistema de extracción no es preciso aplicar agua del exterior a la pasta de aceituna, por lo tanto el volumen generado de fase acuosa o alpechín es casi nulo. Tras la centrifugación con el sistema conocido como “sistema ecológico” se obtiene la fase oleosa y un residuo sólido con algo de aceite y con bastante más humedad que el que se obtiene en el sistema continuo de tres fases y conocido como alpeorujo húmedo.

Una de las principales ventajas de este sistema de extracción de aceite de oliva con respecto al de tres fases, como se ha mencionado anteriormente, es la reducción de la cantidad de agua empleada con la consecuente disminución de los alpechines obtenidos. Por otra parte, la calidad del aceite de oliva es mayor ya que con el sistema de extracción de dos fases el contenido de fenoles que permanece en el aceite de oliva aumenta un 1% con respecto al de tres fases (Alba *et al.*, 1992; Vierhuis *et al.*, 2001). Sin embargo este sistema genera un nuevo subproducto que muestra también problemas al tratarse de un residuo de consistencia sólida y con alta humedad, por lo que se requieren nuevos lugares de almacenaje, camiones para transportarlos y toda una serie de adaptaciones a este nuevo residuo.

No obstante y a pesar de la desventaja en el uso y manejo del alpeorujo. Hoy día en España la mayoría de las almazaras emplean el sistema continuo de dos fases produciendo cantidades enormes de dicho residuo, ya que se obtienen 80 toneladas de alpeorujo de cada 100 toneladas de aceitunas extraídas. La producción de alpeorujos es especialmente importante en Andalucía, comunidad que cuenta con el mayor número de extractoras de España, pues se han obtenido en las últimas campañas entre 3.500.000 y 4.000.000 toneladas/año (Datos

campana 2006 suministrados por la Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de agricultura, pesca y alimentación).

4. Valoración de los subproductos del olivar

4.1. Alpechín

El alpechín presenta una elevada carga contaminante y su eliminación siempre ha constituido un grave problema medioambiental, de hecho desde 1983 en España esta prohibida la descarga directa de los alpechines en lugares públicos. Este residuo está constituido por restos de pulpa, aceite, mucílagos y pectinas suspendidos en una emulsión estable (Paredes *et al.*, 1999). Su composición química es muy variable dependiendo de la variedad de aceitunas, el proceso de extracción, el periodo de recogida del fruto, etc. El alpechín presenta un alto contenido en materia orgánica así como numerosos nutrientes como magnesio y potasio, además de ácidos orgánicos, alcoholes, lípidos y polifenoles. El poder contaminante del alpechín ha sido atribuido fundamentalmente al contenido fenólico y de ácidos grasos así como al efecto sinérgico de estos con otros compuestos orgánicos e inorgánicos (Della Greca *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a las grandes cantidades de materia orgánica y macronutrientes, sobre todo potasio este subproducto puede ser considerado útil como enmendante y fertilizante (Palliotti y Proietti., 1992).

Se han realizado numerosas investigaciones dirigidas a reutilizar, directa o previa transformación estos efluentes con fines agroganaderos o industriales (Roig *et al.*, 2006). Para ello ha sido necesario eliminar la alta demanda química orgánica y el contenido fenólico del alpechín que pueden ocasionar problemas de contaminación ambiental. Entre los métodos físicos utilizados destacan la evaporación en balsas, criogénesis, coagulación con limos, separación con membranas (ósmosis inversa y ultrafiltración), floculación con polielectrolitos, concentración térmica y el empleo de biopolímeros que absorben fenoles y sales del alpechín (Borja *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2004; Sarika *et al.*, 2005). El inconveniente de este tipo de tratamientos es la obtención de fangos o lodos de

alpechín los cuales posteriormente hay que volver a tratar por medio de compostaje u otras técnicas.

4.2. Alpeorujó

4.2.1. Características del alpeorujó

El alpeorujó, residuo generado del sistema de extracción de dos fases, posee una composición variable, dependiendo de la variedad de aceitunas, del tiempo de cosecha y de los métodos de procesamiento (Karapiar y Worgan, 1983). Este residuo es una mezcla compleja constituida por piel, pulpa y hueso, con una humedad alta (65%) que disminuye drásticamente (15%) después del extractado y secado, un pH ligeramente ácido y contenido de materia orgánica elevado (88.6%) del que casi el 50% son ligninas y 2.5% grasas. Además, el alpeorujó contiene toda la carga contaminante del alpechín entre los que destacan los polifenoles (Cabrera *et al.*, 2002).

Las grasas muy escasas en el alpeorujó seco y extractado pero presentes en los alpeorujos no extractados (húmedos o secos) y los carbohidratos hidrosolubles entre los que destacan el manitol y en menor cantidad sacarosa y fructosa constituyen una buena fuente como sustrato de crecimiento de microorganismos (Guillén *et al.*, 1992; Albuquerque *et al.*, 2004). Junto con la composición orgánica de este residuo, aparecen restos de pared celular de aceituna con una cantidad considerable de polisacáridos pécticos y polímeros de hemicelulosas ricos en xilano y xiloglucanos (Jiménez *et al.*, 2001).

El alpeorujó, tal y como lo muestran algunos estudios, no puede aplicarse directamente al suelo por los efectos fitotóxicos derivados principalmente de sustancias como los fenoles (Martín *et al.*, 2002, Sampedro *et al.*, 2004a). Además la elevada relación C/N dificulta su aplicación directa a los cultivos ya que provoca una demanda alta de N en los mismos que se debería corregir añadiendo una fuente adicional de nitrógeno como el estiércol (Cabrera *et al.*, 2002) Unido a todo lo anteriormente mencionado, la aplicación del alpeorujó al suelo determina efectos en las propiedades químicas y estructurales de este ya que produce una

inmovilización del N disponible por las plantas, aumenta la salinidad en suelos de tipo anfisol por desplazamiento del Ca y el K al complejo de cambio y disminuye el Mg asequible a las plantas por efecto antagónico con el K (Paredes *et al.*, 1999).

El alpeorujó puede ser usado para obtener antioxidantes como lo es el caso del hidroxitirosol (1,9-2,3 kilogramos por cada 1000 kg de alpeorujó). El hidroxitirosol es un potente antioxidante comparable con antioxidantes sintéticos comerciales como BHT (2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno) y BHA (3-tert-butil-6-hidroxianisol) (Galli y Visioli, 1999; Manna *et al.*, 1999).

Además de aprovechar el potencial farmacéutico de los polifenoles, por su utilidad como antioxidantes y como antimicrobianos, se pueden obtener biopolímeros tipo polihidroxialcanoatos (PHAs) y exopolisacáridos de origen microbiano (EPSs), a partir del alpechín como del alpeorujó (Ramos-Comenzana y Monteoliva-Sánchez, 2000; Aguilera, 2001). También se ha descrito que el alpeorujó podría ser utilizado como aditivo alimentario si se elimina previamente los compuestos fenólicos mediante biorremediación (Giannoutsou *et al.*, 2004).

4.2.2. Compuestos fenólicos del alpeorujó

Los fenoles poseen uno o varios anillos aromáticos (fenoles monoméricos o polifenoles) con sustituyentes hidroxilos o derivados funcionales tipo éster, metiléster o glicósidos, estos compuestos se encuentran formando parte de los tejidos de las plantas o como metabolitos primarios implicados en la síntesis de material esencial para estos, como la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, o bien intervienen como metabolitos secundarios con una función restringida y poco clara en el metabolismo general, ya que no son necesarios para la fotosíntesis y respiración pero son requeridos para el crecimiento de las plantas.

Los fenoles desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales. En general y debido a su condición de polifenoles se oxidan con mucha facilidad y actúan como antioxidantes. También se han encontrado fenoles que de forma específica activan el crecimiento de las plantas e inducen la dormancia de semillas mientras que otros en cambio inhiben la germinación de semillas,

elongación radical, expansión de hojas, fotosíntesis, absorción de nutrientes y acumulación de materia seca en vástagos y raíces de plantas, de ahí sus propiedades fitotóxicas (Rasmussen y Einhellig, 1977; Reynolds, 1989; Lyu y Blum, 1990; Lyu *et al.*, 1990). Los fenoles al acumularse en las capas más superficiales de los vegetales, captan la mayor parte de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de las mismas en los tejidos internos de la planta, al mismo tiempo que la protegen de microorganismos, por su carácter antimicrobiano (Ryan y Robards, 1998).

En la aceituna existe un gran número de compuestos fenólicos (Mateos *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2002; Bianchi, 2003; Owen *et al.*, 2003). Estos presentan un gran potencial antioxidante y juegan un papel importante dentro de las propiedades químicas organolépticas y nutricionales del aceite de oliva virgen y de la aceituna de mesa. Bien conocido son los efectos positivos de las aceitunas y de los productos que se obtienen a partir de ella, sobre la salud (Perez-Jimenez *et al.*, 2005). Una dieta rica en antioxidantes puede proteger al organismo frente a enfermedades causadas por agentes oxidantes (oxígeno activo, radicales libres, etc.), y que están implicados en la etiología de enfermedades crónicas como el cáncer y la arterosclerosis (Aruoma, 2003; Visioli *et al.*, 2005). También previenen la oxidación lipídica y con ello el deterioro de los alimentos. Por lo tanto, la adición de antioxidantes naturales puede ser una buena estrategia para la formulación y desarrollo de alimentos funcionales, en donde además de proteger al alimento durante su conservación aporta efectos beneficiosos para la salud.

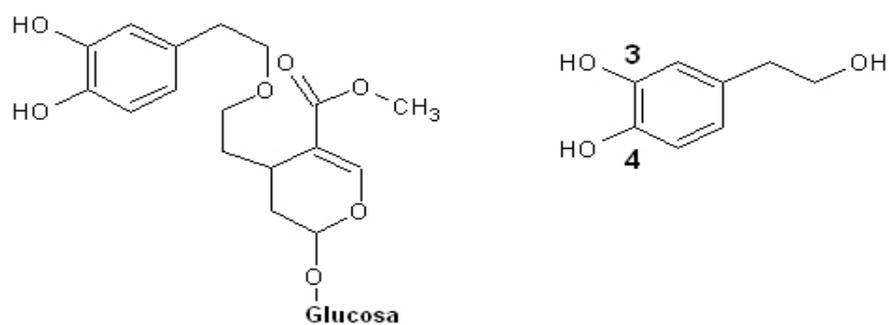
La composición fenólica de las aceitunas varía en función de su variedad, estado de madurez y condiciones climáticas en las que se ha desarrollado cada campaña (Romero *et al.*, 2004). En la aceituna aparecen componentes de tipo secoiridoide como la oleuropeína (formada por la unión del ácido elenólico, el hidroxitirosol y una molécula de glucosa), verbascósido y ligustrósido; grupos de compuestos fenólicos derivados del ácido cinnámico (ácido ferúlico, cafeico y p-cumárico) y del ácido benzoico (ácidos 3,4-dihidroxifenilacético y 4-hidroxibenzoico) y otra serie de fenoles como el catecol, metilcatecol, fenilalcoholes (tirosol, hidroxitirosol), flavonoides presentes en una concentración relativamente alta (luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, rutina y

quercetina) y pigmentos antocianos (cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido) responsables de la coloración violácea de las aceitunas maduras (Ryan *et al.*, 2002).

Entre los compuestos fenólicos del aceite de oliva se encuentra el (3,4-dihidroxifenil) etanol, más conocido como hidroxitirosol. Este compuesto procede de la hidrólisis de la oleuropeina, un glicósido amargo que puede llegar a constituir más del 14% del peso seco del fruto del olivo (Ryan y Robards, 1998).

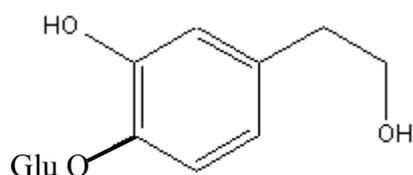
En el transcurso de la maduración del fruto y durante el proceso de la maduración de las aceitunas de mesa, la oleuropeina se hidroliza dando lugar a sus componentes: oleuropeina aglicona, hidroxitirosol y ácido elenólico. El hidroxitirosol representa el principal compuesto fenólico presente en la aceituna, ya sea en forma libre o conjugada (Figura 1). Las aceitunas por lo tanto son la fuente substancial de hidroxitirosol en la dieta, donde se han encontrado concentraciones de hasta 761mg/kg en algunas variedades (Blekas *et al.*, 2002).

Debido a su carácter polar, durante el proceso de elaboración del aceite, la mayor parte de los compuestos fenólicos quedan en residuos acuosos formando parte del orujo, el alpechín o las aguas de lavado. Por tanto, estos residuos procedentes de la industria del aceite de oliva también son muy ricos en compuestos fenólicos y podrían constituir una fuente muy importante de hidroxitirosol (Fernandez-Bolaños *et al.*, 2002a). Por otra parte debido a su carácter anfipático, una parte de hidroxitirosol permanece en el aceite de oliva. La concentración de hidroxitirosol en el aceite de oliva depende de muchos factores tales como la variedad de la aceituna de procedencia, su grado de maduración, el proceso de extracción, etc. Entre los aceites de oliva vírgenes españoles el contenido de hidroxitirosol oscila entre 113,7 y 381,2 mg/kg (Brenes *et al.*, 2000). Otra fuente importante de hidroxitirosol y oleuropeina es la hoja del olivo cuyo extracto se comercializa actualmente como suplemento nutricional.



oleuropeína

hidroxitirosol



Hidroxitirosol-4-β-D-glucósido

Figura 1. Hidroxitirosol libre o conjugado.

El hidroxitirosol presenta propiedades farmacológicas y una elevada actividad antioxidante, esta última debida tanto a un efecto quelante de iones de metales, como a un efecto secuestrador de radicales libres. Se ha demostrado que este compuesto fenólico posee una actividad igual o superior a la de otros antioxidantes conocidos como la vitamina E, vitamina C y el hidroxitolueno butilado (BHT) (Galli y Visioli, 1999). Estudios *in vitro* han demostrado que posee propiedades biológicas que hacen pensar que podría tener efectos beneficiosos en enfermedades tales como el cáncer, la enfermedad cardiovascular o las enfermedades neurodegenerativas (Fabiáni *et al.*, 2002; Visioli *et al.*, 2004).

Se están realizando numerosos estudios sobre la biodisponibilidad de este antioxidante natural y su metabolismo en humano, que implican importantes efectos beneficiosos para la salud (Miró-Casas *et al.*, 2003; Visioli *et al.*, 2005).

La actividad antioxidante ha sido demostrada en multitud de ensayos tanto en sistemas físico-químicos, sistemas biológicos y modelos celulares (Baldoli *et al.*, 1996). Al parecer la actividad orto-difenólica del hidroxitirosol es fundamental para que pueda ejercer dicha actividad, ya que otros compuestos similares presentes en el aceite de oliva, como el tirosol (p-hidroxifeniletanol), mostraron actividades antioxidantes mucho menores o nulas. Además, se ha descrito que gracias también a la estructura del anillo de catecol, el hidroxitirosol también puede actuar como agente quelante de metales (Ryan y Robards, 1998).

El hidroxitirosol podría tener cierto papel protector frente a la acción de las lipoproteínas de baja densidad y contribuir de esta forma a prevenir las enfermedades cardiovasculares (Visioli *et al.*, 1995). En modelos celulares se ha comprobado que concentraciones reducidas de hidroxitirosol podían proteger a los eritrocitos de los daños ocasionados por el estrés oxidativo disminuyendo de forma significativa la hemólisis y protegiendo de la lipoperoxidación las membranas celulares eritrocitarias (Manna *et al.*, 1999).

El estrés oxidativo y la generación de radicales libres también parecen estar implicados en la patología del cáncer (Halliwell y Gutteridge, 1999) y se ha sugerido que el hidroxitirosol y los compuestos fenólicos del aceite de oliva podrían tener relación con la baja incidencia de diversos tipos de cáncer en la región mediterránea (Owen *et al.*, 2004). Estudios llevados a cabo en células cancerosas apoyan esta hipótesis. Así, el hidroxitirosol fue capaz de proteger al DNA celular de las células prostáticas de los daños ocasionados por los radicales libre por lo que podría prevenir la actividad mutagénica ocasionada por el estrés oxidativo (Deiana *et al.*, 1999; Quiles *et al.*, 2002).

También se han descrito efectos del hidroxitirosol en la inflamación y la agregación plaquetaria (Carluccio *et al.*, 2003). El hidroxitirosol presenta propiedades antimicrobianas *in vitro* frente a varios agentes infecciosos del tracto gastrointestinal y respiratorio tales como *Haemophilus influenza*, *Salmonella typha*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* o *Staphylococcus aureus*, a concentraciones mínimas inhibitorias que en algunos casos eran inferiores a la que presentaron antibióticos como la ampicilina (Bisignano *et al.*, 1999).

Recientemente se ha descrito que el hidroxitirosol también posee actividad frente a el agente causal de la neumonía *Mycoplasma pneumoniae* y otras especies de la familia de los micoplasmas (Furneri *et al.*, 2004).

4.2.3. Usos y aprovechamiento del alpeorujo

Desde la aparición del alpeorujo como nuevo residuo en la extracción de aceite mediante la tecnología de dos fases se han realizado numerosos estudios encaminados al aprovechamiento de dicho residuo. Los usos más importantes que se conocen son:

➤ Extracción del aceite de orujo

Los orujos son sometidos a una segunda extracción, mediante disolventes químicos, en general hexano. Esta operación se realiza en las extractoras que generalmente están en un lugar distinto a la ubicación de la propia almazara. El subproducto resultante es el alpeorujo seco y extractado u orujillo en el que el porcentaje de aceite es muy bajo y presenta una humedad del 10-13%.

➤ Energía térmica y eléctrica

La generación de energía mediante el aprovechamiento de residuos constituye una fuente de energía renovable y limpia que además contribuye a la conservación del medio ambiente gracias al reciclado de productos de desecho como los que origina la industria oleícola. La cogeneración de energía es un proceso mediante el cual se obtiene energía eléctrica y/o mecánica y energía térmica a partir de una misma fuente de energía. El alpeorujo seco y extractado se puede utilizar como combustible para la cogeneración de energía eléctrica y térmica por combustión ya que presenta un poder calorífico de 400 kcal/kg (Masghouni y Hassairi, 2000; Caputo *et al.*, 2003). El inconveniente de este aprovechamiento del alpeorujo es la alta producción de cenizas como residuo último de la combustión.

➤ Abono orgánico

El alpeorujo se puede utilizar como abono de suelos agrícolas por su alto contenido en materia orgánica y presencia de micronutrientes. Este residuo es rico en fósforo lo que provoca una mejor incorporación al suelo de este elemento que en el caso de utilizarse fertilizantes minerales (Barreto *et al.*, 2000). Además tiene una alta proporción C/N que provoca una reacción de demanda de N del cultivo que se puede corregir adicionando una fuente externa del mismo (Ordoñez *et al.*, 1999; Cabrera *et al.*, 2002). Sin embargo, debido a los niveles elevados de fenoles del alpeorujo que originan síntomas de fitotoxicidad en los cultivos ya que el uso directo de este en el suelo tiene un efecto perjudicial en la estabilidad estructural del mismo, se opta por el tratamiento de dicho residuo antes de su uso para eliminar su toxicidad (Ruiz *et al.*, 1997).

En todos los casos estudiados, el alpeorujo tratado o compostado mostró un alto grado de humificación, sin efectos fitotóxicos y con un alto contenido en nutrientes minerales, representando este tipo de tratamientos una estrategia alternativa para el reciclaje de estos subproductos (García-Gómez *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2006a, b). Sin embargo el tiempo necesario para llevar a cabo estos compostajes es largo por lo que se están buscando alternativas para acelerar dicho proceso. Estudios recientes demuestran que la incubación del alpeorujo con determinados hongos saprobios disminuye y en algunos casos eliminan la fitotoxicidad de este debido principalmente a la degradación y/o polimerización de fenoles presentes en este residuo (Sampedro *et al.*, 2005; Sampedro, 2005).

➤ Productos de alto valor añadido

El alpeorujo contiene compuestos de interés para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Es un residuo muy rico en hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína, potentes antioxidantes que se pueden extraer del residuo por medio de tratamiento térmico al vapor (Fernández-Bolaños *et al.*, 2002a). El alpeorujo se puede utilizar para la producción de pectina, compuesto de gran interés en la industria alimentaria ya que es usada como agente gelificante, estabilizante y emulsionante (Cardoso *et al.*, 2003). Además también se ha estudiado la mezcla

de alpeorujos con polímeros termoplásticos para la fabricación de contenedores (Siracusa *et al.*, 2001).

➤ Otras aplicaciones

Los orujos secos y extractados son materiales lignocelulósicos y su utilización como fuente nutricional para rumiantes puede estar limitada por la presencia de los compuestos fenólicos, pero puede solucionarse con la utilización de agentes bloqueantes como el polietilenglicol (PEG), la suplementación con nitrógeno o su utilización por especies de rumiantes con baja sensibilidad a la presencia de estos compuestos como es el caso del caprino y ovino (Martín *et al.*, 2003). Sin embargo, dada la alta proporción de fibras poco digeribles y el bajo contenido en proteínas de estos piensos, se recomienda la aplicación de un suplemento proteico (Molina y Nefzaoui, 1996; Martín-García *et al.*, 2004).

Por otro lado las almazaras están empezando a separar los huesos presentes en el alpeorujos debido al aumento de su mercado no sólo como combustible, sino por su uso como abrasivo, materia prima para la obtención de carbón activo (Güneysu *et al.*, 2004) e incluso para favorecer el compostaje de otros materiales orgánicos (García-Gómez *et al.*, 2005).

5. Tratamiento para el aprovechamiento del alpeorujos

Diversos estudios se han realizado en el alpeorujos sobre pretratamientos eficaces para separar la fase líquida de la sólida, solubilizando compuestos de gran interés, para su posterior recuperación, así como conseguir aumentar la accesibilidad de los principales componentes del sólido. Los tratamientos más utilizados normalmente son pretratamientos químicos, físicos y biológicos (Garrote *et al.*, 1999).

5.1. Pretratamiento físico

Entre los físicos se encuentran los pretratamientos mecánicos de molienda y de extrusión donde su acción es aumentar la superficie específica de contacto

del material con el agente hidrolizante (Furcht y Sille, 1990). Otro procedimiento físico es la irradiación con luz ultravioleta, con radiaciones de alta energía (Khan *et al.*, 1986), o con microondas donde el requerimiento energético es muy alto.

5.2. Pretratamiento químico

Los pretratamientos químicos utilizan reactivos para eliminar lignina y/o hemicelulosas, sin afectar significativamente a la celulosa, pero dejándola más susceptible al ataque por enzimas, o bien agentes que solubilizan la celulosa y reducen notablemente la cristalinidad y el peso molecular de la misma. Entre los primeros hay que destacar los tratamientos con disoluciones acuosas diluidas de álcalis tales como el amoníaco (Harley *et al.*, 1985), hidróxido sódico (Paul *et al.*, 1986), ozono (Haluk y Trojanowski, 1986) y ciertos disolventes orgánicos (Holtzapple, 1984). Entre los segundos, figuran los tratamientos con ácidos tales como el H₂SO₄, HCl, AlCl₃ y H₃PO₄ (Alvarez *et al.*, 2005), complejos metálicos, como el tratamiento de hierro y sodio (Hamilton *et al.*, 1984), organosolventes (Stockberger, 1993), o incluso álcalis y H₂O₂ (Sun *et al.*, 2004).

5.3. Pretratamiento biológico

La importancia de los hongos saprobios del suelo radica principalmente en el papel que desempeñan en la descomposición de la materia orgánica siendo esenciales en la movilización, almacenamiento y liberación de nutrientes a partir del material vegetal en ecosistemas terrestres. Estos hongos intervienen en los procesos de descomposición de la materia orgánica del suelo por medio de degradaciones enzimáticas aunque también llevan a cabo reacciones de condensación de esta materia originando la formación del complejo húmico (Lahdesmaki y Piispanen, 1988). Estos hongos utilizan una variedad de fuentes de carbono desde moléculas simples hasta moléculas de difícil degradación como por ejemplo la lignina, un género con esa capacidad es el *Fusarium* del cual se le han caracterizado diversas enzimas hidrolíticas (Regalado *et al.*, 1997).

El pretratamiento biológico, se basa en la acción de que determinados microorganismos ejercen sobre los componentes del alpeorujo, estos actúan metabolizando alguno de los compuestos tóxicos presentes, con el fin de emplear el sustrato resultante para diversos fines, como por ejemplo la fermentación de los azúcares solubilizados (López *et al.*, 2004).

Existen algunos hongos que se pueden utilizar como transformadores del alpeorujo seco y extractado debido a que son capaces de degradar lignina y celulosa, así como de degradar sustancias tóxicas como los fenoles (Madrid *et al.*, 1996), los hongos son importantes en los procesos de biorremediación (Field *et al.*, 1993).

En investigaciones realizadas recientemente, se ha descubierto que tras la incubación con hongos saprobios se disminuye prácticamente en su totalidad el contenido fenólico del alpeorujo y además se encontró correlación entre el descenso del contenido fenólico del mismo por hongos saprobios y la reducción de la fitotoxicidad del residuo sobre el peso de las plantas. La distinta actuación que tiene cada hongo frente a este residuo podría deberse a las diferencias en la maquinaria enzimática implicada en la degradación de compuestos fenólicos (Sampedro, 2005).

5.4. Pretatamiento físico-químico

Se utiliza el vapor de agua combinado con la acción de factores físicos, como la presión y/o la temperatura, con la acción hidrolítica del ácido acético que se forma a partir de los grupos O-acetilos presentes en las hemicelulosas de los materiales tratados. Se produce una acidificación del medio acuoso de reacción, hasta un pH de 3 a 4, potenciándose la acción hidrolítica sobre la masa a tratar (Garrote *et al.*, 1999).

Se necesitan temperaturas suficientemente elevadas para que la autohidrólisis ocurra. Estas condiciones fuerzan la disociación del agua líquida, creándose un medio ácido que lleva a la ruptura de los grupos acetilos y la liberación del ácido acético, produciéndose la propia autohidrólisis de las hemicelulosas.

Cuando el tratamiento al vapor combina los efectos de las temperaturas (150°C y 240°C) y presiones de (1-36 veces la presión atmosférica) mediante la inyección directa de vapor saturado, junto a la brusca descompresión posterior es lo que se conoce como tratamiento de explosión al vapor o “steam explosión”. El efecto del tratamiento al vapor combina de alteraciones mecánicas y químicas. La alteración mecánica esta causada por la rápida despresurización, creando unas fuerzas de cizallamiento que producen la separación de las fibras, principalmente de las regiones más débiles. El efecto químico se debe a la hidrólisis de los restos acetilos de las hemicelulosas (autohidrólisis), y a la de otra serie de enlaces que hacen más accesibles ciertos compuestos para su posterior recuperación.

Se busca obtener un hidrolizado, tras el tratamiento, rico en una serie de compuestos con ciertas propiedades biológicas que revaloricen al subproducto, como azúcares libres, oligosacaridos, fenoles, etc. (Kessler *et al.*, 1998; Kabel *et al.*, 2002), o que posibiliten el aprovechamiento de un gran número de compuestos de interés (Asada *et al.*, 2004), como por ejemplo la recuperación del hidroxitirosol a partir de orujos de aceitunas (Felizón *et al.*, 2000). Este tratamiento resulta más efectivo que otros métodos de pretratamiento de materiales, y se ha aplicado a una infinidad de residuos lignocelulósidos de muy diversa procedencia, como los provenientes de la biomasa forestal o de la industria agrícola (caña de azúcar, paja de trigo, maíz, piel de avellana, hueso de aceituna, arroz y determinadas hierbas). Se suele adicionar, antes del tratamiento, catalizadores ácidos para aumentar la velocidad de la hidrólisis.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cultivo del olivar y la obtención del aceite de oliva tienen una extraordinaria importancia económica y social en España, particularmente en Andalucía, y genera enormes cantidades de subproductos con gran potencial contaminante. La reutilización del alpeorajo seco y extractado, mediante una estrategia conjunta que considera a los sectores agrario, industrial y medioambiental, reduciría el impacto ambiental del cúmulo indiscriminado del alpeorajo; aumentaría los recursos locales disponibles para la agricultura e industria; facilitaría la conservación y recuperación del medio ambiente y disminuiría los costes de producción en el sector agrario e industrial. Sin embargo, estos subproductos han de ser sometidos a tratamientos antes de su uso tanto agrícola como industrial.

En este estudio se desea combinar el tratamiento térmico en reactor junto con el tratamiento con hongos, con el fin de reducir la fitotoxicidad del alpeorajo para ser usado como enmendante natural del suelo, además de poder obtener compuestos como el hidroxitirosol de alto valor añadido. A lo largo del tiempo se han realizado algunos estudios sobre este residuo industrial debido a la gran cantidad que se produce y a sus conocidas propiedades como fertilizante, sin embargo hasta la fecha no se ha conseguido obtener una completa valorización del mismo. Por ello es necesario obtener nuevas alternativas que posibiliten la adecuada reutilización y posterior valorización de la enorme cantidad de subproductos y residuos orgánicos que genera la sociedad contemporánea.

El sector olivarero y agrario obtendrán un claro beneficio de los resultados de estos estudios, ya que puede ayudar a solucionar uno de los mayores problemas medioambientales; la escasez de materia orgánica de la mayoría de los suelos.

Uno de los mayores beneficios que puede tener el desarrollo del proyecto es la conservación del medio ambiente mediante la disminución del acumulo de subproductos con potencial contaminante, la disminución del uso de fertilizantes químicos debido a la utilización de los biológicos con la consiguiente disminución del efecto contaminante de los suelos y del uso integral de todos los recursos disponibles.

Los beneficios industriales serán muy importantes ya que se podrá crear nuevos mercados de productos químicos y biológicos.

Los beneficios científicos que se pueden obtener serán el conocimiento de las potencialidades de la explosión al vapor y los hongos saprobios para la obtención de hidroxitirosol y además para disminuir la fitotoxicidad del alpeorujó.

Los beneficios económicos afectarían al sector oleícola en general, debido a la valorización o aumento de la rentabilidad del cultivo del olivar, almazaras y orujeras. La rentabilidad del sector agrario e industrial mejoraría al utilizarse abonos orgánicos estables y fertilizantes biológicos de menor coste que los tradicionales, y al conseguir la síntesis de compuestos de alto valor añadido utilizando el hidroxitirosol como materia prima.

OBJETIVOS

Objetivo general

Valorización del alpeorujó por tratamiento térmico y biológico para su uso como fuente de hidroxitirosol y fertilizante orgánico.

Objetivos específicos

1. Mejora del proceso de recuperación de hidroxitirosol mediante tratamiento al vapor.
2. Optimización de la recuperación de hidroxitirosol mediante combinación de tratamiento térmico y biológico.
3. Determinación de la fertilidad del alpeorujó tras el tratamiento al vapor.
4. Optimización del uso del alpeorujó como fertilizante biológico, tras la combinación de tratamiento térmico y biológico, con hongos saprobios.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Alpeorujó

Para este estudio se utilizará alpeorujó resultante del proceso de extracción del aceite de oliva utilizando el sistema de dos fases, tras su secado en secaderos rotativos con aire caliente a 400°C se somete a una segunda extracción con n-hexano originando aceite de orujó y un residuo denominado alpeorujó seco y extractado (DOR) con un porcentaje de aceite muy bajo y una humedad del 10-13%.

Se ha utilizado alpeorujó seco, desgrasado y extractado procedente del Instituto de la GRASA (CSIC) en Sevilla, España. El alpeorujó se conservó a 4°C hasta su posterior utilización.

2. Tratamiento biológico del alpeorujó

2.1. Hongos saprobios

Para realizar este trabajo se usaron dos tipos de hongos saprobios en función de su hábitat natural, dos hongos saprobios del suelo: *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces farinosus* y un hongo saprobio de la madera: *Coriolopsis rigida*. Estos microorganismos se seleccionaron de la colección de hongos saprobios de la Universidad de Buenos Aires y del CIB (CSIC) de Madrid.

2.1.1 Aislamiento de hongos saprobios del suelo

Los hongos saprobios del suelo se aislaron a partir de muestras de suelos rizosféricos de distintos cultivos. El aislamiento de dichos hongos se realizó según el método descrito por (Widden y Bisset, 1972) que consiste en lavados del suelo a través de varios tubos de metacrilato divididos en 3 secciones mediante filtros sucesivos de malla metálica y luz decreciente de superior a inferior.

Una vez colocadas las muestras en la parte superior de cada tubo se llenaron con agua estéril, y se hizo burbujear el agua con las muestras por medio de introducción de aire durante tres minutos. A continuación, los tubos se vaciaron y se llenaron de nuevo con agua estéril, repitiendo la misma operación hasta cinco veces, cantidad necesaria para eliminar completamente la población fúngica superficial (esporas, esclerocios, etc.), según una curva de lavado realizada previamente.

Tras el último lavado, las partículas retenidas en los diferentes filtros una vez secas, se transfirieron a placas de Petri con medio de cultivo extracto de malta (MEA) o MEA enriquecido y antibióticos.

2.1.2. Aislamiento de hongos saprobios de la madera

Los hongos saprobios cuyo hábitat natural es la madera se aislaron de troncos de madera en descomposición; para ello se seleccionaron varios trozos que presentaban visualmente gran crecimiento de hongos y se colocaron directamente en placas de Petri que contenían medio de cultivo MEA con antibiótico y se incubaron en estufa a 28°C. Se obtuvo un cultivo puro de hongo mediante el resembrado de una porción de él en otra placa con un medio de cultivo nuevo.

2.2. Medios de cultivo

El cultivo de hongos saprobios se llevó a cabo en medios esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 min. Los hongos saprobios se inocularon en placas de Petri con medio MEA o MEA enriquecido al que se le añadieron los antibióticos estreptomicina (5 µg/l) y tetraciclina (2,5 µg/l) previamente esterilizados por filtración con filtros milipore de 0,2 µm de tamaño de poro y se incubaron a 28°C aproximadamente durante diez días.

Medio MEA

Extracto de malta	2 g
Peptona	2 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 4,7	

Medio MEA enriquecido

Extracto de malta	20 g
Peptona	12 g
Glucosa	70 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

2.3. Proceso de incubación del alpeorujó con los hongos saprobios

Los hongos saprobios se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 g de cebada previamente cocida y esterilizada (120°C durante 20min) durante 10 días a 30°C. Cada matraz se inoculó con cuatro trozos del medio de cultivo anteriormente descrito donde habían crecido los distintos hongos saprobios.

El alpeorujó seco y extractado se incubó estáticamente en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 80 g de alpeorujó estéril durante 2 semanas a 28°C. Cada matraz se inoculó con 4 granos de cebada incubada con los distintos hongos saprobios objeto de estudio. Como controles se utilizaron matraces con alpeorujó a los que se añadió granos de cebada sin inocular.

Tras el periodo de incubación, el alpeorujó destinado para cuantificación de polifenoles totales se almacenó a 4°C y el alpeorujó destinado a ensayos de fitotoxicidad se autoclavó a 120°C durante 20 min, para así eliminar cualquier forma de resistencia del hongo y se almacenó a 4°C.

3. Tratamiento al vapor de alpeorujo

Este residuo se sometió a temperaturas elevadas durante un tiempo corto en un reactor donde se produce una reacción de autohidrolisis. Para el pretratamiento al vapor se usó un reactor que está equipado con una válvula de bola de apertura rápida que permite su descompresión brusca, llamada “explosión al vapor”, una vez pasado el tiempo de reacción. El intervalo de temperaturas usado corresponde al que opera la caldera, entre 140°C y 180°C, y el tiempo se fija entre 2 y 10 min. Las variables se controlan mediante un dispositivo de control automático. En este pretratamiento el tiempo y la temperatura son variables interdependientes, que se deben tener en cuenta simultáneamente. Para favorecer la severidad del tratamiento y comprobar su efectividad, se estudió el efecto de la adición de catalizadores ácidos (H_2SO_4) comparándolo con tratamientos sin catalizador alguno.

Una vez que el reactor se haya calentado a la temperatura requerida se introduce 250 g de muestra, a través de un embudo de acero inoxidable, dentro de la cámara de reacción. Se cierra el sistema y automáticamente comienza a aumentar la presión en el interior del reactor por el aporte de vapor saturado hasta alcanzar la presión que eleve la temperatura hasta la programada, proceso que se realiza en pocos segundos. Cuando finaliza el tiempo de reacción se cierra la válvula de entrada de vapor y se abre de forma instantánea la salida de la muestra. Se produce la despresurización brusca, pasando de la presión de reacción a prácticamente la atmosférica, produciéndose así la llamada “explosión al vapor”.

El material tratado se recoge, con la menor cantidad de agua posible, accediendo al depósito de expansión, para lo cual se deberá esperar unos segundos a que se enfríe la muestra en el depósito de expansión, y a que se alcance la presión atmosférica. Cuando termina el proceso el alpeorujo se filtra y se separa la fase sólida de la líquida mediante una decantación en la mayoría de los casos o en otros con un sistema de centrifugación.

Los alpeorujos obtenidos después de los distintos tratamientos al vapor, y una vez desgrasado, se sometieron a posteriores lavados con agua, disoluciones ácidas, y buffer, que ayudaran a eliminar o disminuir la presencia de ciertos

compuestos, ya presentes en el alpeorajo o que se hayan formado durante el tratamiento al vapor, y que pueden ser posibles inhibidores de microorganismos.

El líquido fue utilizado directamente para la obtención de hidroxitirosol y el sólido para las pruebas de fertilización. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su utilización.

4. Recuperación de hidroxitirosol

A la fracción líquida obtenida del proceso de explosión al vapor, una vez filtrada en membrana de 0,45 μm , se les cuantificará el hidroxitirosol presente mediante sistema cromatográfico HPLC (Heredia *et al.*, 1987). Se utiliza para ello el sistema de cromatografía líquida a alta presión Hewlett-Packard serie 1100, con detector de ultravioleta-visible y con un inyector de Rheodine de 20 μl de loop. Se mide a una longitud de onda de 280 nm. La columna cromatográfica, Spherisorb ODS-2 (250 x 4,6 nm de diámetro interior, 5 μm de tamaño de partícula), operó a temperatura ambiente. El caudal de elución fue de 1,0 ml/min, usando una fase móvil de ácido trifluoroacético (0,4 mM) en agua a pH 2,5, y acetonitrilo. El gradiente fue desde 5 hasta 25% de acetonitrilo, en 30 min. En estas condiciones el hidroxitirosol se eluye con un tiempo de retención de 9,19 min. Próximo a él lo hace el hidroxitirosol-4- β -D-glucósido con un tiempo de retención de 8,6 min, compuesto que está presente en cantidades considerables (Romero *et al.*, 2002).

El patrón del hidroxitirosol usado en la cuantificación del compuesto, se obtuvo a partir de la hidrólisis ácida de la oleuropeína, tratando 15 mg de esta con 1 ml de HCl 3 N, a 100°C durante 10 min. El hidrolizado se diluye con un volumen igual de metanol, y se lleva hasta 10 ml con una mezcla 1:1 de metanol-agua. En estas condiciones se consigue de forma cuantitativa la hidrólisis, de cada mol de oleuropeína original se obtiene un mol de hidroxitirosol, un mol de glucosa y otro de ácido elenólico (Graciani y Vázquez, 1980).

Tras el tratamiento al vapor no sólo se obtiene este compuesto en forma libre sino también unido a otra serie de moléculas formando conjugado. La medida directa de la fracción líquida de hidroxitirosol por cromatografía líquida

(HPLC), muestra la cantidad de antioxidante en forma libre. Para analizar el presente en forma de conjugados es necesaria la hidrólisis lo suficientemente fuerte como para hidrolizarlos. Para ello se parte de una alícuota de 0,2 ml del líquido una vez separado el sólido tras el tratamiento al vapor, y se le adicionan 1,8 ml de una disolución de HCl 3 N, manteniendo la mezcla en una placa calefactora a 100°C durante una hora. Transcurrido ese tiempo, se deja enfriar y se le añaden 8 ml de agua destilada, diluyendo con ello cincuenta veces la muestra inicial, finalmente se analiza la muestra por HPLC, y la diferencia entre la cantidad de hidroxitirosol obtenida con y sin posthidrólisis muestra la cantidad del compuesto que está formando complejos.

5. Determinación de la fertilidad del alpeorujó

5.1. Características del suelo empleado

Como soporte para el crecimiento de las plantas se utilizó suelo procedente de la propia Estación Experimental del Zaidín (EEZZ), CSIC, Granada. Se trata de un suelo franco que presenta las características descritas en el cuadro siguiente:

Características analíticas del suelo	
Ph	8.1
Arena	35,8%
Arcilla	20,6%
Limo	43,6%
Materia orgánica	1,8%
Nitrógeno	0,3 mg/kg
Fósforo	6.2 mg/kg
Potasio	132 mg/kg

Este suelo antes de ser utilizado, se sometió a un doble tamizado, el primero se realizó con una criba de 1 cm de luz de malla para eliminar partes gruesas y el segundo con 4 mm de luz de malla. Este suelo se esterilizó y se mezcló con arena para su posterior uso.

5.2. Plantas

Se utilizó plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* variedad *Muchamiel*) para la realización de los ensayos.

5.3. Esterilización de semillas

Las semillas se esterilizaron en superficie durante 15 min con una solución al 50% de agua e hipoclorito de sódico al 3,5%. Pasado este tiempo se lavaron varias veces con agua estéril para eliminar posibles restos y se le añadió H₂O₂ al 7% durante 15 min. Posteriormente se volvieron a lavar con agua estéril hasta la completa eliminación del H₂O₂ y se dejaron en imbibición una hora y media.

5.4. Cultivos en maceta

Pasado el tiempo de inhibición tras la esterilización, las semillas se cultivaron durante dos semanas en un semillero con vermiculita estéril y se mantuvieron en una cámara a 25°C hasta su germinación. Tras su crecimiento las plántula se transplantaron a las macetas siendo seleccionadas cuidadosamente en base a un desarrollo homogéneo de la parte aérea y radical.

Los test de fertilidad se hicieron con las plantas de tomate, cultivadas en suelo:arena (2:3 v/v), en macetas de 300ml de capacidad. Las distintas muestras de alpeorujo obtenidas de la explosión al vapor, así como el alpeorujo sin tratar utilizado como control se añadió a las macetas con una plántula a las concentraciones de 2.5 y 5%.

Las plantas se cultivaron en un invernadero controlando luz, temperatura, humedad (400µmol m⁻²s⁻¹, 400-700 nm; 16/8 h luz/oscuridad; 25/19°C día/noche; 50% humedad relativa) y se regaron por capilaridad para no alterar las propiedades físicas del suelo. Para mejorar la fertilidad del suelo se incluyo previamente en la mezcla de suelo/arena un abono llamado Osmocote®Exact®Mini abono CE, abono muy similar a la solución nutritiva

propuesta por Long Asthon (Hewitt, 1952), y cuya composición se detalla a continuación:

Abono NPK con magnesio y oligoelementos

16% Nitrógeno total (N)

8,2% Nitrógeno nítrico

7,6% Nitrógeno amoniacal

8% Anhídrido fosfórico (P_2O_5)

Soluble en citrato amónico neutro y agua

5,7% Soluble en agua

11% Óxido de potasio (K_2O)

Soluble en agua

2,0% Óxido de Magnesio (MgO)

1,4% Soluble en agua

0,2% Boro (B) soluble en agua

0,050% Cobre (Cu) 0,038% soluble en agua

0,40% Hierro (Fe) 0,20% quelatado ETDA

0,06% Manganeso (Mn)

0,020% Molibdeno (Mo)

0,014% Soluble en agua

0,015% Zinc (Zn) 0,068% soluble en agua

SE AÑADE 1 g POR KILO DE MEZCLA DE SUELO.

Después de 30 días las plantas se cosecharon y se les determinó el peso húmedo y seco tras secarlas a 70°C durante 48 h.

6. Determinaciones analíticas

6.1. Determinación de polifenoles totales extractables

El contenido de fenoles del alpeorujó seco y extractado se realizó mediante una determinación colorimétrica por el método de Ribereau-Gayon (1968) basado en la reducción en medio alcalino de una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico (reactivo de Folin-Ciocalteu) por los compuestos fenólicos y la consiguiente formación de una mezcla de óxidos azules de wolframio y

molibdeno que absorben la luz en una franja de 620 nm a 750 nm. La medida de la absorción a 725 nm es proporcional a la concentración del compuesto.

Para la determinación de polifenoles se extractaron de cada muestra a analizar tomando alícuotas de 0,2 g de alpeorujo a las que se le añadió 10 ml de una mezcla de acetona:agua (1:1) con ácido fórmico al 0.5%. Los tubos con la mezcla se mantuvieron en hielo y se sonicaron en un baño de ultrasonido durante 10 min. A continuación se mantuvieron en agitación a 4 °C durante 24 h.

Transcurrido este tiempo la mezcla se volvió a sonicar durante 10 min y finalmente se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min a 4° C. El extracto fenólico se filtro a través de papel Whatman nº4 y se mantuvo a 4°C para su posterior medición.

La determinación de los polifenoles del alpeorujo se llevó a cabo en tubos con 880 µl de agua a los que se le añadieron 120 µl del extracto de alpeorujo o de la solución de ácido tánico que se utilizó para hacer la curva patrón (0 a 150 µg/ml). La reacción se inició añadiendo 500 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu y 2,5 ml de Na₂CO₃ al 20% (p:v). Tras 35 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia de la mezcla de reacción en el espectrofotómetro a 725 nm. Los datos obtenidos se expresaron en µg/ml de fenoles por kg de alpeorujo.

7. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos se sometieron a un análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas. Tras éste análisis, ante la ausencia de diferencias significativas se efectuó un análisis de varianza (ANOVA). Las letras representan valores estadísticamente distintos mediante el test de Duncan`s para comparaciones múltiples ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

1. Recuperación de hidroxitirosol a partir de alpeorujó.

Objetivo

En estos ensayos se pretende estudiar la recuperación de hidroxitirosol libre a partir de alpeorujó mediante dos tratamientos: uno térmico y posteriormente un tratamiento biológico con determinados hongos saprobios. El tratamiento al vapor relajaría la matriz del alpeorujó para una mejor accesibilidad a un posterior tratamiento biológico. Los hongos saprobios más tarde podrán incrementar la cantidad de hidroxitirosol libre debido a su capacidad de hidrolizar el hidroxitirosol glucosilado presente en dicho residuo mediante la acción de la β -glucosidasa presente en su maquinaria enzimática.

Materiales y métodos

Para alcanzar el objetivo previsto se realizaron dos ensayos, en un primer lugar muestras de alpeorujó tratadas al vapor a 150°C se trataron biológicamente con los hongos *C. rigida*, *F. oxysporum* y *P. farinosus* durante 2 y 10 semanas tal y como se ha descrito en el apartado general de materiales y métodos, para determinar que hongo era más efectivo en la recuperación de hidroxitirosol libre.

Posteriormente se realizó otro ensayo donde las muestras de alpeorujó antes de su incubación con el hongo saprobio más efectivo se trataron al vapor a distintas temperaturas 150°C o 170°C para determinar las mejores condiciones de tratamiento térmico para recuperar una mayor cantidad de hidroxitirosol.

A las muestras de alpeorujó resultantes en ambos ensayos del tratamiento de explosión al vapor y de la combinación del tratamiento al vapor y la incubación con los hongos saprobios se les determinó la cantidad de hidroxitirosol presente mediante cromatografía en HPLC según la técnica descrita por Heredia *et al.* (1987).

Resultados

Las gráficas de la Fig. 1 muestran la cantidad de hidroxitirosol obtenida en el alpeorujó tratado al vapor a 150°C durante 5 min e incubado biológicamente con los hongos *C. rigida*, *F. oxysporum* y *P. farinosus*. La incubación del alpeorujó tratado al vapor sin hongo durante 10 semanas provocó en general un descenso de la cantidad de hidroxitirosol obtenida del residuo tanto en forma libre, glucosilada o total respecto al de 2 semanas. Los niveles de las distintas formas de hidroxitirosol, liberado tras el tratamiento al vapor y la incubación durante dos semanas con los hongos *C. rigida* y *F. oxysporum*, fueron inferiores a los alcanzados por el tratamiento control sin hongo a todos los tiempo de incubación. Sin embargo el contenido en hidroxitirosol libre y total del alpeorujó tratado al vapor e incubado con *P. farinosus* aumentó un 70% respecto al control del alpeorujó tratado al vapor y sin tratamiento fúngico. El aumento en el tiempo de incubación del alpeorujó tratado al vapor e incubado con el hongo *P. farinosus* no provocó diferencias significativas en cuanto a la cantidad de recuperación de hidroxitirosol se refiere (Fig. 1).

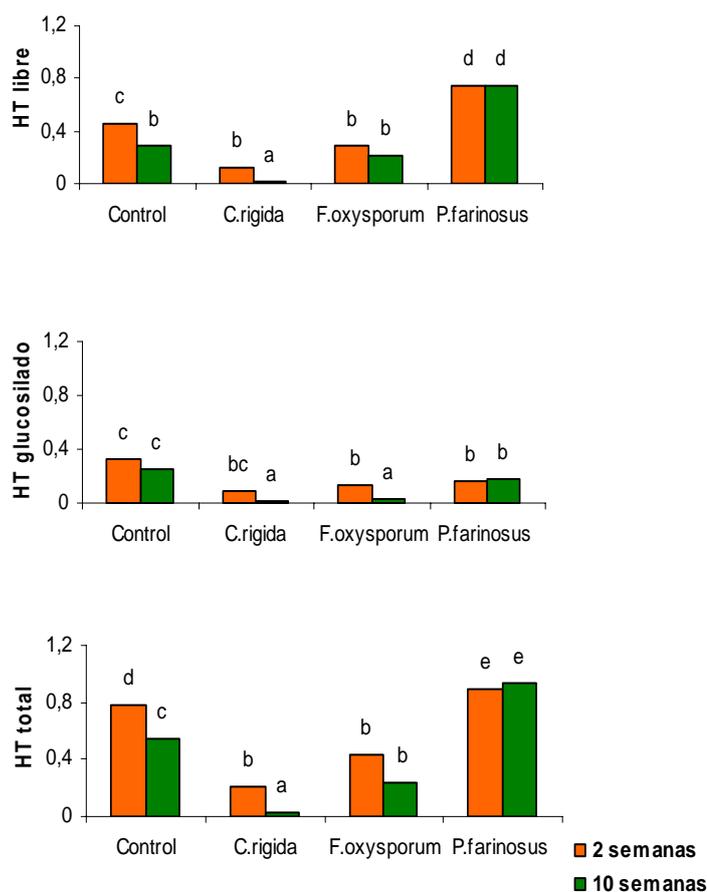


Fig. 1. Contenido de hidroxitirosol (g) presente en 100 gramos de alpeorujó seco tratado al vapor a 150°C durante 5 min e incubado con distintos hongos saprobios o sin hongo (Control) durante dos y diez semanas. Letras distintas en cada gráfica denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($P=0,05$; $gl=23$; $n=3$).

Una vez seleccionado el hongo *P. farinosus* por su capacidad de incrementar la cantidad de hidroxitirosol libre y total del alpeorujó tras el tratamiento al vapor se trató de optimizar la recuperación de dicho compuesto modificando la temperatura del tratamiento al vapor.

El alpeorujó tratado al vapor e incubado con *P. farinosus*, como vimos anteriormente, provocó un aumento significativo del contenido de la fracción libre y total del hidroxitirosol (Fig. 2). Sin embargo, el distinto tratamiento del

alpeorujos al vapor a 150 o 170°C previo a la incubación con *P. farinosus* no produjo diferencias significativas en los niveles de recuperación de hidroxitirosol.

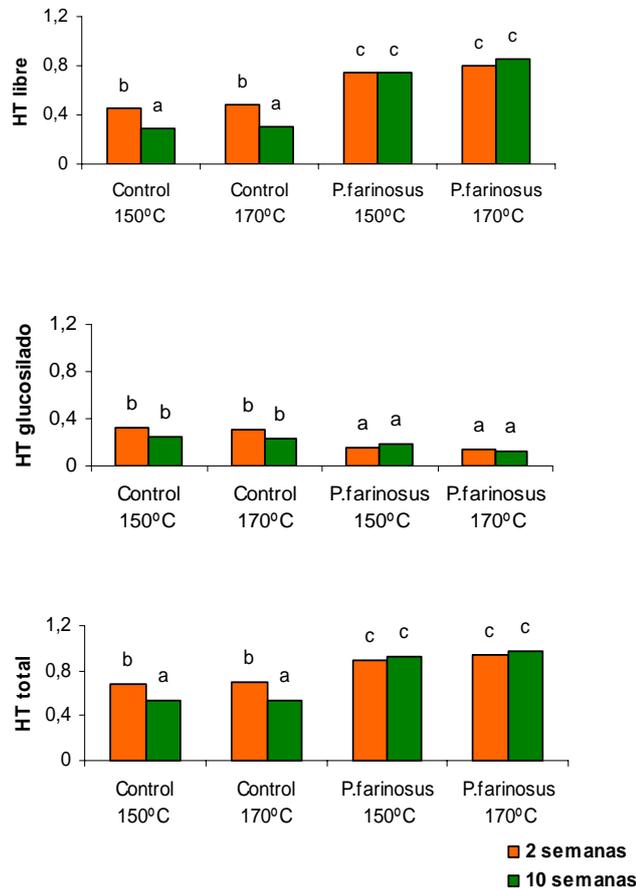


Fig. 2. Contenido de hidroxitirosol (g) presente en 100 gramos de alpeorujos seco tratado al vapor a 150 y 170°C e incubado con *P. farinosus* o sin hongo (Control) durante dos y diez semanas. Letras distintas en cada gráfica denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p=0,05$; $gl= 23$; $n=3$).

2. Efecto del uso del alpeorujó transformado térmica y biológicamente sobre el desarrollo de plantas

Objetivo

Mediante estos ensayos, se estudió el efecto de un tratamiento integrado del residuo, térmico y biológico, sobre la disminución de la fitotoxicidad y contenido fenólico del alpeorujó. Se pretende ver los efectos de ambos tratamientos en el alpeorujó sobre el crecimiento de plantas cultivadas en condiciones de invernadero.

Materiales y métodos

El experimento se diseñó con dos factores de variación, que fueron el lavado o no del residuo después del tratamiento al vapor. Cada factor contenía cuatro variables, la primera fue el peso seco de parte aérea y raíz, la segunda fue la proporción de alpeorujó añadido a las plantas (2,5 y 5%), el tercero fue la temperatura a la que se trató el alpeorujó 150 y 170°C, y el cuarto consistió en el factor de inoculación de los alpeorujos con los hongos saprobios tras el tratamiento al vapor que contenía cuatro tratamientos: plantas sin alpeorujó (Control), plantas con alpeorujó incubado sin hongo (DOR) o con los hongos saprobios *C. rigida* o *F. oxysporum*. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Las muestras de alpeorujó tratadas al vapor a 150 y 170°C, tal y como se describe en el apartado general de materiales y métodos anteriormente, se autoclavaron a 121°C durante 20 min y posteriormente se incubaron con los hongos saprobios *C. rigida* y *F. oxysporum* seleccionados por su capacidad de disminuir la fitotoxicidad del alpeorujó.

Las muestras de alpeorujó, una vez incubado y esterilizado, se sembraron con tres o cuatro granos de cebada donde había crecido el inóculo del hongo objeto de estudio y se incubaron estáticamente a 28°C en oscuridad durante 2 semanas. Terminado este proceso, el alpeorujó transformado se autoclavó y se

llevaron a cabo: pruebas de fitotoxicidad en el invernadero y determinación del contenido fenólico del alpeorujó siguiendo en ambos casos la metodología descrita en el apartado general de materiales y métodos.

Para la determinación de la fitotoxicidad del alpeorujó se emplearon semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) esterilizadas en superficie y pregerminadas en semillero. Cuando las semillas alcanzaron un tamaño adecuado se transfirieron a macetas de 300 ml de capacidad que contenían una mezcla de suelo:arena (2:3) y 1g/kg de abono Osmocote®Exact®Mini. Las plantas se cultivaron en condiciones controladas de invernadero durante un mes, tras el cual se determinó el peso seco de la parte aérea y raíz de las plantas de tomate después de secarlas en estufa durante 48 h a 70°C.

Resultados

Tal y como se observa en la Fig. 3 el alpeorujó sin lavar y sin tratar presenta marcados efectos tóxicos para las plantas. Se puede apreciar claramente que a medida que se aumenta la dosis de dicho residuo disminuye el peso seco de la planta tanto en su parte aérea como de raíz. El tratamiento biológico con *F. oxysporum* y *C. rigida* no produjo descenso de la fitotoxicidad del alpeorujó.

También se observa que los tratamientos del alpeorujó al vapor a 150 y 170°C no generaron incremento en el peso de la planta de tomate con respecto al tratamiento del alpeorujó control (Fig. 3).

Se ha podido observar que la integración del tratamiento térmico y biológico del alpeorujó si provocó en algunos casos un descenso de las propiedades fitotóxicas del alpeorujó. Así, el tratamiento al vapor a 150°C seguido de la incubación con *C. rigida* y *F. oxysporum* en concentraciones de 2,5% logró no solo disminuir la fitotoxicidad del alpeorujó en plantas de tomate sino eliminarla. En el caso del alpeorujó tratado al vapor a 150°C e incubado con *C. rigida* a concentraciones de 5% solo produjo un descenso de fitotoxicidad sin llegar a eliminarla.

Cuando se aplicó a plantas de tomate alpeorujó previamente tratado a 170°C e inoculado con *C. rigida* a las diferentes proporciones, no se observaron

cambios relevantes del crecimiento de la parte aérea y raíz de tomate respecto a las observadas con el alpeorujito control. Sin embargo, cuando se trataron con *F. oxysporum* a dosis del 2,5% si se aprecia una eliminación de la fitotoxicidad del residuo para el peso de raíz de tomate, efecto que no se mantuvo al aumentar la concentración del residuo a 5%

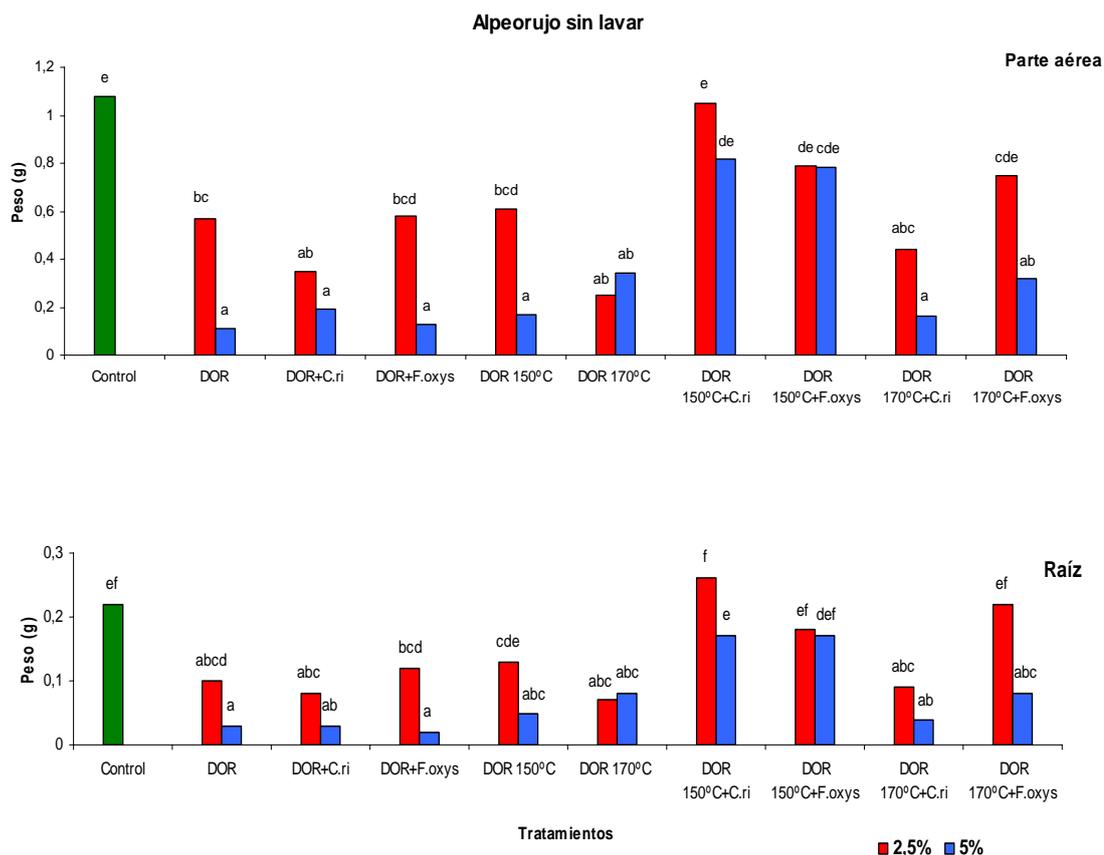


Fig. 3. Peso seco de parte aérea y raíz de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivadas sin alpeorujito (Control) y en presencia de distintas concentraciones (2,5 y 5%) de alpeorujito (DOR) sometido a diferentes tratamientos de explosión (150 y 170°C) e incubación durante dos semanas con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri) y *F. oxysporum* (F.oxys). Letras distintas en cada gráfica denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p=0,05$; $gl=56$; $n=3$).

El alpeorujito tratado térmicamente tanto a 150 como a 170°C y sometido a un posterior lavado, cuando se aplicó a las plantas a la concentración del 2,5% no modificó el crecimiento de tomate. El aumento de la proporción de alpeorujito añadido si provocó una disminución del peso seco de tomate (Fig. 4).

El tratamiento al vapor a 150°C seguido de la incubación con *C. rigida* no produjo efecto alguno en el crecimiento de plantas de tomate respecto al control del alpeorujito tratado al vapor. Sin embargo la incubación de este alpeorujito tratado al vapor a 150°C con *F. oxysporum* a la dosis de 2,5% disminuyó considerablemente el peso de la planta respecto al control del alpeorujito tratado al vapor, efecto que no se mantuvo cuando se administró el alpeorujito tratado a dosis de 5% (Fig. 4).

Cuando el alpeorujito tratado al vapor a 170°C, se lavó e inoculó con *C. rigida* o *F. oxysporum* y se añadió a dosis de 2,5% a plantas de tomate se consiguió eliminar su efecto tóxico ya que el crecimiento de la planta fue igual al control sin alpeorujito. Cuando la proporción de alpeorujito tratado e incubado con *F. oxysporum* que se añadió a las plantas de tomate fue del 5% se observó una reducción significativa en el peso de la parte aérea y raíz (Fig. 4).

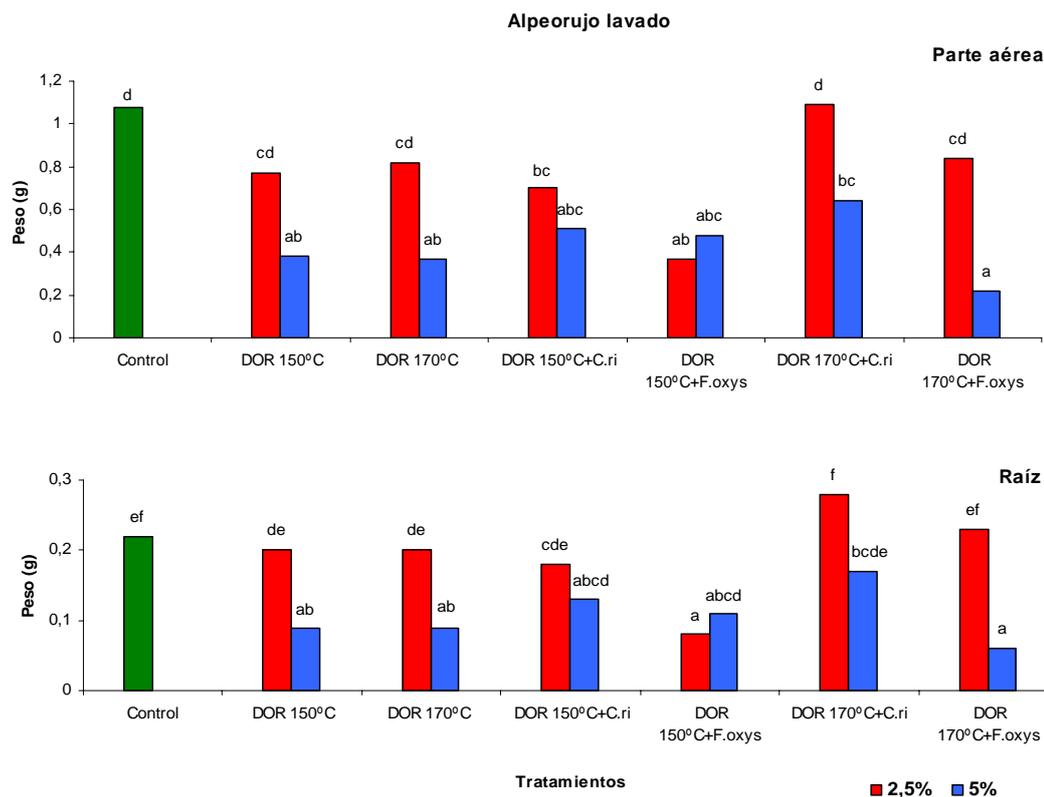


Fig. 4. Peso seco de parte aérea y raíz de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) cultivadas sin alpeorujito (Control) y en presencia de distintas concentraciones (2,5 y 5%) de alpeorujito (DOR) sometido a diferentes tratamientos de explosión al vapor (150 y 170°C) e incubado durante dos semanas con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri) y *F. oxysporum* (F.oxys). Letras distintas en cada gráfica denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p=0,05$; $gl=38$; $n=3$).

El contenido fenólico del alpeorujito control fue de 33.07g/kg (Fig. 5). Se observa que el proceso de incubación del alpeorujito con los dos hongos saprobios disminuye considerablemente el contenido fenólico del residuo con respecto al control.

Cuando el alpeorujito se sometió a tratamiento térmico tanto a 150 como a 170°C con o sin posterior lavado no disminuyó significativamente la cantidad de

fenoles del mismo salvo en el caso del alpeorujillo tratado al vapor a 150°C y lavado posteriormente.

Al combinar el tratamiento térmico al vapor y la posterior incubación con los hongos de este estudio se ha observado que en general se descende el contenido fenólico del alpeorujillo. Las muestras de alpeorujillo tratadas térmicamente a 150 o a 170°C e inoculadas con *C. rigida* con o sin posterior lavado, reducen la proporción de fenoles notoriamente. Sin embargo se ha observado que cuando el alpeorujillo se inoculó con *F. oxysporum*, solamente se observó reducción de fenoles en residuo tratado al vapor a 150 o a 170°C y posteriormente lavado.

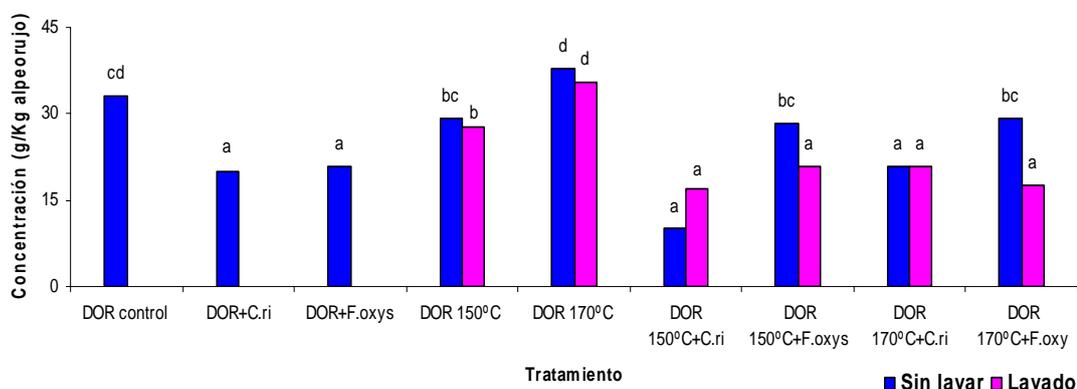


Fig. 5. Contenido fenólico del alpeorujillo lavado y sin lavar tras diferentes tratamientos al vapor a 150 y 170°C e incubaciones con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri) y *F. oxysporum* (F.oxys) durante dos semanas. Letras distintas en la gráfica denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p=0,05$; $gl=44$; $n=3$).

DISCUSIÓN

La contaminación que produce el alpeorujó, subproducto generado anualmente tras el proceso de extracción del aceite oliva, genera tal interés que se esta llevando acabo numerosos estudios sobre el mismo. La generación de alpeorujó exige la búsqueda de soluciones que permitan su valorización, entre las mas importantes están: (1) el uso en la agricultura para lo cual debe ser previamente estabilizado y biotransformado, (2) la recuperación de potentes antioxidantes de importancia industrial, (3) la cogeneración de energía eléctrica y térmica.

Se ha descrito que el alpeorujó es un residuo lignocelulósico compuesto fundamentalmente de materia orgánica, macro y micronutrientes y una gran proporción de fenoles que le confiere su toxicidad. (Martin *et al.*, 2002). Diversos estudios muestran que el hidroxitirosol y el p-tirosol son dos de los principales fenoles detectados en el alpeorujó (Lesage-Meessen *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2004; Allouche *et al.*, 2004) y su concentración puede variar dependiendo de las condiciones de la aceituna (Romero *et al.*, 2002). El hidroxitirosol, compuesto de alto valor añadido en la industria, generalmente se encuentra en estos residuos en forma conjugada, por lo que es necesario convertirlo en su forma libre para que su extracción y purificación se pueda llevar a cabo. Se ha descrito que el hongo *P. farinosus* tiene un comportamiento singular en la incubación del alpeorujó ya que gracias a la producción de β -glucosidasa puede hidrolizar los fenoles glucósidos en sus respectivos fenoles simples (Sampedro, 2005). Se ha descrito que mediante el tratamiento al vapor del alpeorujó se puede obtener un 46% del hidroxitirosol presente en el alpeorujó (Rodríguez, 2005). Por otro lado también se ha observado que el tratamiento biológico del alpeorujó con *P. farinosus* es capaz de incrementar la proporción de hidroxitirosol libre en gran medida (Sampedro, 2005). En nuestros ensayos hemos detectado que el hongo *P. farinosus* incubado en alpeorujó tratado al vapor es capaz de hidrolizar el glucósido del hidroxitirosol, recuperando casi un 70 u 80% de hidroxitirosol libre del alpeorujó. La integración del tratamiento térmico y biológico del alpeorujó permite obtener casi la totalidad de la proporción de hidroxitirosol libre presente en el mismo.

La recuperación del hidroxitirosol en los tratamientos al vapor muestran que a pesar de las altas temperaturas, altas presiones y presencia de oxígeno, no se degrada apreciablemente dicho antioxidante durante el tratamiento (Rodríguez, 2005). Sin embargo no fue necesario un tratamiento al vapor más severo para optimizar la recuperación de hidroxitirosol ya que con el tratamiento al vapor a 170°C no se obtuvo mayor concentración de hidroxitirosol.

Dos semanas de tratamiento biológico tras el tratamiento al vapor del alpeorujo, fue suficiente para la obtención de una alta proporción de hidroxitirosol libre. De hecho Sampedro detectó hidrólisis del enlace glucosídico catalizada por la enzima β -glucosidasa tras la incubación del alpeorujo con *P. farinosus* durante dos semanas. (Sampedro, 2005).

El alpeorujo, tal y como lo muestran algunos estudios, no puede aplicarse directamente al suelo por los efectos fitotóxicos que provoca en las plantas y el efecto perjudicial en la estabilidad estructural del mismo derivados principalmente de sustancias como los fenoles (Martín *et al.*, 2002, Sampedro *et al.*, 2004b). Por ello es necesario un tratamiento de dicho residuo antes de su uso para eliminar su toxicidad (Ruiz *et al.*, 1997).

El uso de hongos saprobios de la madera dada su capacidad de producir enzimas ligninolíticas (Kissi *et al.*, 2001; Fenice *et al.*, 2003; D'Annibale *et al.*, 1998) y de saprobios del suelo han mostrado ser eficaces en la disminución de la fitotoxicidad de ciertos contaminantes (Regalado *et al.*, 1997). Estos hongos además contribuyen a un mejor uso de los nutrientes por las plantas (Fracchia *et al.*, 2000). Estudios recientes demuestran que la incubación del alpeorujo con determinados hongos saprobios disminuye y en algunos casos elimina la fitotoxicidad de este en un periodo de cinco meses (Sampedro *et al.*, 2005). Sin embargo estos tratamientos, a pesar de su efectividad, requieren largos periodos de tiempo. Por otro lado el tratamiento al vapor es capaz de reducir la fitotoxicidad del alpeorujo, aunque a niveles bastante bajos y solo en determinadas condiciones (Rodríguez, 2005).

Se ha descrito que para llegar a romper las distintas interacciones entre los componentes estructurales del alpeorujo y acceder más fácilmente a ciertos

compuestos, se recurre normalmente a pretratamientos de tipo químico, físico y biológicos (Garrote *et al.*, 1999). De hecho al tratar el alpeorujó térmicamente a 150°C e incubarlo con *C. rigida* en tan solo dos semanas se logra eliminar la fitotoxicidad que presentaba este residuo sobre las plantas de tomate. En diversos ensayos realizados anteriormente demuestran que la incubación con *C. rigida* es muy efectivo en la disminución de la fitotoxicidad de diversas fracciones físicas del alpeorujó (Aranda, 2006). Hemos observado en nuestros estudios también que la incubación con *F. oxysporum* fue menos efectiva en la disminución de la fitotoxicidad del alpeorujó. De hecho se sabe que los hongos saprobios no funcionan igual ya que poseen diferencias en la maquinaria enzimática de cada hongo implicada en la degradación de compuestos fenólicos (Camarero *et al.*, 1994; Giovannozzi-Sermanni *et al.*, 1994).

El lavado del alpeorujó tras su tratamiento al vapor provocó un descenso de la fitotoxicidad, efecto que descrito anteriormente por Aranda (2006). El mayor efecto de reducción de fitotoxicidad en el alpeorujó lavado se consiguió tras la explosión a 170°C y la incubación con los distintos hongos saprobios.

A la vista de los resultados obtenidos se puede decir que la aplicación del tratamiento térmico al alpeorujó se puede utilizar para la detoxificación del alpeorujó y así reducir sustancialmente los largos periodos de incubación de los hongos saprobios.

Las propiedades fitotóxicas que se han observado en el alpeorujó, son atribuidas principalmente a los compuestos fenólicos que a concentraciones de 50g/kg afectan el crecimiento de la planta (Wang *et al.*, 2002). Cuando el alpeorujó es tratado con determinados hongos saprobios se demuestra que el contenido fenólico disminuye considerablemente (Madrid *et al.*, 1996). En nuestros ensayos hemos podido observar que la incubación con *C. rigida* y *F. oxysporum* durante dos semanas desciende el contenido fenólico en un 38%. Si se integra el tratamiento térmico y el biológico la cantidad de fenoles también disminuye con respecto a la muestra inicial, aunque este descenso fue similar al observado cuando el alpeorujó se trata solo con los hongos saprobios. Es cierto, que existe relación entre el descenso del contenido fenólico y la disminución de la fitotoxicidad (Blum *et al.*, 2000; Caspersen *et al.*, 2000), pero dicha propiedad es

muy compleja y pueden existir otros componentes presentes en este residuo, que bien directamente o a través de una acción sinérgica con los fenoles, contribuyen a su toxicidad (Rodríguez *et al.*, 1988; Capasso *et al.*, 1992). De hecho se han encontrado que otras sustancias como ácidos grasos, ácidos orgánicos de bajo peso molecular, ácidos volátiles, sales y su bajo pH pueden ser también responsables de la fitotoxicidad de residuos procedentes de la extracción del aceite de oliva (Pérez *et al.*, 1980; Saviozzi *et al.*, 1991).

La combinación de los tratamientos físico y biológico, permitirá, por un lado, la utilización de sustancias de interés industrial como es el hidroxitirosol, y por otro, acortar el tiempo de detoxificación del residuo ya que los elementos fitotóxicos al ser muy recalcitrantes era necesario al menos un periodo de 20 semanas de incubación con hongos saprobios únicamente para reducirlos o eliminarlos. La integración de ambos tratamientos permite conseguir la eliminación de los efectos fitotóxicos del alpeorujo tras solo dos semanas de incubación con los hongos saprobios.

CONCLUSIONES

1. El alpeorujó tratado al vapor a 150°C, e incubado con *Paecilomyces farinosus* durante dos semanas permite una recuperación de hidroxitirosol libre prácticamente total.
2. La integración del tratamiento térmico y el biológico del alpeorujó contribuye a la disminución de la fitotoxicidad del alpeorujó seco y extractado.
3. El tratamiento del alpeorujó a 150°C y la incubación con *Corioloopsis rigida* detoxifica el alpeorujó en solo dos semanas de incubación

RECOMENDACIONES

En este trabajo de investigación con el fin de reducir o eliminar la fitotoxicidad del alpeorujó y obtener compuestos de alto valor añadido como lo fue el hidroxitirosol, se utilizó el tratamiento térmico del residuo a temperaturas de 150 y 170°C junto con el biológico con hongos saprobios como lo fueron *C. rigida*, *F. oxysporum* y *P. farinosus*, dejándonos resultados muy interesantes para su posible aplicación.

El alpeorujó es un residuo que aunque posee características agroquímicas de interés, genera problemas medioambientales por lo que necesita su estabilización para alcanzar su aprovechamiento y valoración total. La mayoría de estudios realizados hasta la fecha se han aplicado tratamientos tanto físicos como biológicos por separado, pero de nuestros ensayos se deduce que la combinación del tratamiento y el posterior tratamiento biológico con hongos mejoran en gran medida y poco tiempo la detoxificación. Estos ensayos han generado resultados muy esperanzadores aunque habría que tratar de optimizar el proceso para poder obtener los mejores resultados en el menor tiempo posible

Por otro lado como también vimos en nuestros resultados que el lavado del residuo después de la explosión disminuye en gran medida la fitotoxicidad del residuo sobre plantas de tomate, sin embargo, debemos tener en cuenta que para una buena optimización del proceso se debería intentar la valorización mas completa del alpeorujó con el menor tratamiento posible.

El alpeorujó se pretende utilizar como enmendante de suelos agrícolas por lo que sería útil probar el efecto fitotóxico de este residuo tratado térmica y biológicamente en otras variedades de plantas de interés agrícola. También sería interesante ver los efectos de este alpeorujó tratado en plantas colonizadas con hongos formadores de micorrizas, ya que se sabe que este tipo de simbiosis mutualista mejora las condiciones de crecimiento de las plantas y que existen mecanismos específicos propios de los hongos arbusculares o inducidos en la planta, implicados en la mayor tolerancia de las mismas a elementos tóxicos ambientales.

Como podemos ver este trabajo es un inicio de lo que supondría una completa valorización y aprovechamiento de este residuo industrial, sin embargo es necesario más estudios para optimizar el proceso.

REFERENCIAS

- Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., Suárez, A., Guerra, V., Lizama, C., Bernasar, A., Ramos-Cormenzana, A. 2001. *Paenibacillus jamilae* sp nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. In. J. Sys. Evol. Microbiol. 51: 1687-1692.
- Alba, J., Ruíz, M.A., Hidalgo, F. 1992. Control de elaboración y características analíticas de los productos obtenidos en una línea continua ecológica. Dossier Oleo 2: 43-48.
- Albarran, A., Celis, R., Hermosin, M.C., López-Pineiro, A., Cornejo, J. 2004. Behaviour of simazine in soil amended with final residue of the olive-oil extraction process. Chemosphere 54: 717-724.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. Biores. Technol. 91: 195-200.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2006a. Measuring detoxification and maturity in compost made from "alperujo", the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. Chemosphere 64: 470-477.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, J., Cegarra, J. 2006b. Composting of a solid olive-mill by-product ("alperujo") and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. Waste Manag. 26: 620-626.
- Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S. 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. J. Agricul. Food Chemis. 52: 267-273.
- Alvarez, P., Santamaría, R., Blanco, C., Granda, M. 2005. Thermal degradation of lignocellulosic materials treated with several acids. J. Anal. Appl. Pyrolysis 74: 337-343.
- Aragón, J.M., Palancar, M.C. 2001. Improlive 2000. Present and future of alpeorujo; Ed Complutense, S.A., Madrid.
- Aranda, E. 2006. Fraccionamiento físico del alpeorujo como base para desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios y arbusculares para la eliminación de su fitotoxicidad. Universidad de Granada, España.
- Arjona, R., Ollero, P., Vidal, B. 2005. Automation of an olive waste industrial rotary dryer. J. Food. Engin. 68: 239-247.

- Aruoma, O.I. 2003. Methodological considerations for characterizing potencial antioxidant actions of bioactive components in plant food. *Mut. Res.* 523: 9-20.
- Asada, C., Nakamura, Y., Kobayashi, F. 2004. Waste reduction system for production of useful materials from un-utilized bamboo using steam explosion followed by various conversion methods. *Biochem. Engin. J.* 23: 131-137.
- Barreto, C., Rozas, M., López-Piñero, A., Numnes, J.M., García, A. 2000. Efectos de la aplicación de residuos de almanzara en el fósforo asimilable y otras propiedades edáficas de un olivar en regadío. *Edafología* 7: 29-38.
- Bellapart, C. 1988. Agricultura biológica en equilibrio con la agricultura química. Fertilización natural. La agricultura del Futuro, Mundi-Prensa.
- Bianchi, G. 2003. Lipids and phenols in table olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105: 229-242.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crsafi, G., Uccellam, N., Saija, A. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 971-974.
- Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M., Boskou, D. 2002. Biophenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3688–3692.
- Blum, U., Staman, K.L., Flint, L.J., Shafer, S.R. 2000. Oxidation of phenantrene by fangal laccase in the presence of 1-hydroxy-benzotriazole and unsaturated lipids. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 244: 233-238.
- Borja, R., Alba, J., Mancha, A., Martín, A., Alonso, V., Sánchez, E. 1998. Comparative effect of different aerobic pretreatments on the kinetics and macroenergetic parameters of anaerobic digestion of olive mill wastewater in continuous mode. *Bioproc. Eng.* 18: 127-134.
- Brenes, M., García, A., Ríos, J.J., García, P., Garrido, A. 2002. Use of 1-EtOAcxypinoresinol to authenticate picual olive oils. *Internt. Journ. Food. Scien. Techn.* 37: 615-625.
- Cabrera, F., Madejón E., Romero S.A., López R. 2002. Diagnóstico y estudio de alpechines, orujos y alpeorujos. *Jornadas de investigación y transferencia tecnología al sector oleícola.* Córdoba. pp. 195-199.
- Camarero, S., Galletti, G.C., Martínez, A.T. 1994. Preferential degradation of phenolic lignin units by 2 white-rot fungi. *Appl. Enviro. Microb.* 60: 4509-4516.

- Cánovas, A., Hilgers, M., Jimenez, R., Mendizabal, M., Sanchez, F. 1993. Tratado de Agricultura Ecológica. Instituto de Estudios Almerienses. Departamento de Ecología y Medio Ambiente. Almería.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, F. 1992. Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste-waters. *Phytochem.* 31: 4125-4128.
- Caputo, A.C., Scacchia, F., Pelagagge, P.M. 2003. Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Appl. Therm. Eng.* 23: 197-214.
- Cardoso, S.M., Coimbra, M.A., Lopes da Silva, J.A. 2003. Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydr. Polym.* 52: 125-133.
- Carluccio, M.A., Siculella, L., Ancora, M.A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distanti, A., De Caterina, R. 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 622-629.
- Caspersen, S., Alsanus, B.W., Sundin, P., Jensen, P. 2000. Bacterial amelioration of ferulic acid toxicity to hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Soil Biol. Biochem.* 32: 1063-1070.
- Cegarra, J., Amor, J.B., González, J., Bernal, M.P., Roig, A. 2000. Characteristics of a new solid olive-mill-by-product (“alpeorajo”) and its suitability for composting. *Proceeding of the International Composting Symposium ICS 99*, pp. 124-140.
- D’Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V., Sermanni, G.G. 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *J. Biotechnol.* 61: 209-218.
- Davies, L.C., Novais, J.M., Martins-Dias, S. 2004. Influence of salts and phenolic compounds on olive mill wastewater detoxification using superabsorbent polymers. *Biores. Technol.* 95: 259-268.
- Deiana, M., Aruoma, O.I., Bianchi, M.L., Spencer, J.P., Kaur, H., Haliwell, B., Aeschbach, R., Banni, S., Dessì, M.A., Corongui, F.P. 1999. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA based modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 762-769.
- Della Greca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., Temussi, F. 2001. Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 67: 352-359.

- Dick, W.A., Tabatabai, M.A. 1993. Significance and potential uses of soil enzymes. En: Soil microbial ecology. Application in agricultural and environmental management (F. Blaine, ed.) Marcel Dekker. New York. pp. 95-127.
- Fabiáni, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G.F., Morozzi, G. 2002. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur. J. Cancer Prev.* 11: 351-358.
- Felizón, B., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A., Guilén, A. 2000. Steam-explosion pretreatment of olive cake. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 15-22.
- Fenice, M., Sermanni, G.G., Federici, F., D'Annibale, A. 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *J. Biotech.* 100: 77-85.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillen, R., Jiménez, A. 2002a. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "alperujo" *J. Agric. Food Chem.* 50: 6804-6811.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillen, R., Jiménez, A. 2002b. Procedimiento de obtención de hidroxitiroso purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo. Patente Internacional N° PCT/ESO2/00058.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Gómez, E., Guillen, R., Jiménez, A., Heredia, A., Rodríguez, R. 2004. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: Isolation of added-value compounds. *J. Agric. Food Chem* 52: 5849-5855.
- Field, J.A., De Jong, E., Feijoo-Costa, G., De Bont, J.A.M. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11: 44-49.
- Filippi, C., Bedini, S., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Saviozzi, A. 2002. Cocomposting of olive oil mill by-products: Chemical and microbiological evaluations. *Comp. Sci. Util.* 10: 63-71.
- Fracchia, S., García-Romera, I., Godeas, A., Ocampo, J.A. 2000. Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant Soil* 223: 175-184.
- Furcht, P. W., Sille, H. 1990. Comparison of simultaneous wet milling and enzymatic hydrolysis of cellulose in ball and attrition mill reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 630-645.

- Furneri, P.M., Piperno, A., Sajia, A., Bisignano G. 2004. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(12): 4892-4894.
- Galli, C., Visioli, F. 1999. Antioxidant and other activities of phenolics in olives olive oil, typical components of the mediterranean diet. *Lipids* 34: 23-26.
- García-Gómez, A., Bernal, M.P., Roig, A. 2005. Organic matter fractions involved in degradation and humification processes during composting. *Compos. Sci. Util.* 13: 127-135.
- García-Gómez, A., Roig, A., Bernal, M.P. 2003. Composting of the soil fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Biores. Technol.* 86: 59-64.
- Garrote, G., Dominguez, H., Pajaro, J.C. 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz. Roh. Werkst.* 57: 191-202.
- Giannoutsou, E.P., Meintanis, C., Karagouni, A.D. 2004. Identification of yeast strain isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation. *Biores. Technol.* 93: 301-306.
- Ginos, A., Manios, T., Mantzavinos, D. 2006. Treatment of olive mill effluents by coagulation-flocculation-hydrogen peroxide oxidation and effect on phytotoxicity. *J. Hazard. Materials* 133: 135-142.
- Giovanozzi-Sermanni, G., D'Annibale, A., Di Lena, G., Vitale, N.S., Di Mattia, E., Minelli, V. 1994. The production of exoenzymes by *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. *Biores. Technol.* 48: 173-178.
- Graciani, E., Vásquez, A. 1980. Estudio de los componentes del aceite de oliva por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). II Cromatografía en fase inversa. *Grasas y Aceites* 31: 237-243).
- Guillen, R., Heredia, A., Felizón, B., Jiménez, A., Montano, A., Fernández-Bolaños, J. 1992. Fiber fraction carbohydrates in *Olea-Europaea* (Gordal and Manzanilla Var). *Food Chem.* 44: 173-178.
- Guneyusu, S., Aydin, S., Arayici, S. 2004. Removal of some organic acids from water using olive mill wastes as adsorbent. *Fresen. Environ. Bull.* 13: 1006-1009.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free radicals in Biology and Medicine.* 3 Ed. Oxford university press. Oxford, RU. pp 936.
- Haluk, J.P., Trojanowski, J. 1986. Delignification du bois de peuplier par ozonolyse en milieu aqueux. *Holzforschung* 40: 237-248.

- Hamilton, T.J., Dale, B.E., Ladisch, M.R., Taso, G.T. 1984. Effect of ferric tartrate/sodium hydroxyde solvent pretreatment on enzyme hydrolysis of cellulose in corn residue. *Biotechnol. Bioengin.* 26: 781-787.
- Hamman, O.B., De la Rubia, T., Martínez, J. 1999. Decolorization of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete flavido-alba*. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 2410-2415.
- Harley, R.D., Deschard, G., Keene, A.S. 1985. Effect of ammonia on the phenolics and other chemical constituents of cell walls cereal straws in relation to wall biodegradability and digestion by ruminants. En “*New approaches to research on cereal carbohydrates*”. Ed. Hil, R.D., Munck, L. Elsevier science. Amsterdam. pp. 319-321.
- Heredia, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., Rivas, M. 1987. Olives stones a source of fermentable sugars. *Biomass* 14: 143-148.
- Hewitt, E.J. 1952. Sand and water culture methods used in study of plant nutrition. *Tech Commun.* nº 22, Farnham Royal, Commonwealth Agriculture Bureau, Bucks. Gran Bretaña. pp. 547.
- Holtzapple, J. 1984. The effect of organosolv-pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnol. Bioengin.* 26: 670-676.
- Jiménez, A., Rodríguez, R., Fernández-Caro, I., Guillen, R., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A. 2001. Olive fruit cell wall: Degradation of pectic polysaccharides during ripening. *J. Agric. Food Chem.* 49: 409-415.
- Kabel, M.A., Carvallheiro, F., Garrote, G., Avegerinos, E., Koukios, E., Parajó, J.C., Gírio, F.M., Scols, H.A., Voragen H.A.J. 2002. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr. Pol.* 50: 47-56.
- Karapiar, M., Worgan, M.J.T. 1983. Bioprotein production from the waste products of olive oil extraction. *J. Chem. Technol. Biotech.* 33: 185-188.
- Kessler, R., Beker, U., Kohler, R., Goth, B., 1998. Steam explosion of flax. A superior technique for upgrading value. *Biomass Bioenerg.* 14: 237-249.
- Khan, A.W., Labrie, J.P., Mckeown, J. 1986. Effect of electron-bean irradiation pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotech. Bioeng.* 28: 1449-1453.
- Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P., Sannia, G. 2001. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl. Micro. Biotech.* 57: 221-226.

- Lahdesmaki, P., Piispanen, R. 1988. Degradation products and the hydrolytic enzyme-activities in the soil humification processes. *Soil Biol. Biochem.* 20: 287-292.
- Lesage-Meessen, 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 Chem.* 75: 501-507.
- López, M., Nichols, N., Dien, B., Moreno, J., Bothast, R. 2004. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic material. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 125-131.
- Lyu, S.W., Blum, U. 1990. Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on net P, K, and water-uptake by cucumber seedlings in a split-root system. *J. Chem. Ecol.* 16: 2429-2439.
- Lyu, S.W., Blum, U., Gerig, T.M., O'Brien, T.E. 1990. Effects of mixtures of phenolic-acids on phosphorus uptake by cucumber seedlings. *J. Chem. Ecol.* 16: 2559-2567.
- Madejón, E., Galli, E., Tomati, U. 1998. Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica* 42: 173-183.
- Madrid, F., De la Rubia, T., Martínez, J., 1996. Effect of *Phanerochaete flavidoalba* on aromatic acids in olive mill waste waters. *Tech. Environ. Chem.* 51: 161-168.
- Manna, C., Della Ragione, F., Cucciolla, V., Borriello, A., D'Angelo, S; Galletti, P., Zappia, V. 1999. Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 472: 115-130.
- Martín, J., Sampedro, I., García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A. 2002. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues. *Soil Biol. Biochem.* 34: 1769-1775.
- Martín, A.I., Moumen, A., Yañez, D.R., Molina, E. 2003. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Sci. Technol.* 107: 61-74.
- Martín-García, I., Yañez-Ruiz, D., Moumen, A., Molina-Alcaide, E. 2004. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal supply on two-stage olive cake fermentation. *Animal Res.* 53: 245-257.
- Masghouni, M., Hassairi, M. 2000. Energy applications of olive-oil industry by-products: I. The exhaust foot cake. *Biomass Bioenerg.* 18: 257-262.

- Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., Rios, J.J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert. A. 2001. Determination of phenols, flavones and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2185-2192.
- Miró-Casas, E., Covas, M-I., Farre, M., Fito, M., Ortuño., Weinbrenner, T., Roset, P., De la Torre, R. 2003. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin. Chem.* 49: 945-951.
- Molina, E., Nefzaoui, A. 1996. Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *Int. Biodet. Biodegr.* 38: 227-235.
- Ordoñez, R., González, P., Giráldez, J.V., García-Ortiz, A. 1999. Efecto de la enmienda con alpeorajo sobre los principales nutrientes de un suelo agrícola. *Estudios de la zona no saturada*. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón. ICIA. pp. 123-126. ISBN: 84-66-99-1258-5.
- Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. 2003. Isolation, structure, elucidation and antioxidant potencial of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem. Toxicol.* 41: 703-717.
- Owen, R.W., Haubner, R., Wurtele, G., Hull, E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. 2004. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.* 13(4): 319-26.
- Palliotti, A., Proietti, P. 1992. Ulteriori indagini sull'influenza delle acque reflue di frantoi oleari sull'olivo. *L'Informatore Agrario* 39: 72-76.
- Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., Bernal, M.P. 1999. Characterization of olive mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes. *Biores. Technol.* 67: 111-115.
- Paul, D., Jacopian, V., Tiersch, B., Philpp, B. 1986. Morphological changes in sugar cane bagasse by mild alkali treatment. *Cellulose Chem. Technol.* 20: 357-367.
- Pérez, J.D., Gallardo-Lara, F., Esteban, E. 1980. Aspectos a considerar en el empleo del alpechín como fertilizante . I. Evaluación de su efecto fitotóxico inhibidor de la germinación de semillas. *Cuaderno de Ciencias Biológicas*. pp. 59-67.
- Perez-Jimenez, F., Alvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L. 2005. Internacional conference on the healthy effect of virgen olive oil. Consensus report, Jaen (Spain) 204. 35: 421-424.

- Quiles, J.L., Farquharson, A., Simpson, J.D.K., Grant, I., Wahle, K.W.J. 2002. Olive oil phenolics: Effect on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Brit. J. Nutrit.* 88: 225-234.
- Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M. 2000. Potencial biofarmacéutico de los residuos de la industria oleícola. *Ars Pharma.*
- Rasmussen, J.A., Einhellig, F.A. 1977. Synergistic inhibitory effects of para-coumaric and ferulic acids on germination and growth of grain-sorghum. *J. Chem. Ecol.* 3: 197-205.
- Regalado, V., Rodríguez, A., Perestelo, F., Carnicero, A., De la Fuente, G., Falcon, M.A. 1997. Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*. *App. Environ. Microbiol.* 63: 3716-3718.
- Reynolds, T. 1989. Comparative effects of heterocyclic-compounds on inhibition of lettuce fruit germination. *J. Exp. Bot.* 40: 391-404.
- Ribereau-Gayon, P. 1968. Les composés Phenoliques des Vegetaux. Dumond. Paris.
- Rodríguez, G. 2005. Aprovechamiento integral del alpeorajo tratado térmicamente. Desarrollado de un sistema viable para la purificación del antioxidante natural hidroxitirosol. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, España
- Rodríguez, M., Pérez, J., Ramos, A., Martínez, J. 1988. Effect of extracts obtained from olive oil mill wastewaters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *J. Appl. Bacteriol.* 64: 219.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero M.A. 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manage.* 26: 960-969.
- Romero, C., Brenes, M., García, P., Garrido, A. 2002. Hidroxitirosol-beta-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 3935-3939.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A., Garrido, A. 2004. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.* 52: 479-484.
- Ruiz, J.L., Dobao, M.M., Tejada, M., Benítez, M.C., González, J.L. 1997. Evolución de las propiedades químicas de un suelo tras la adición de distintos tipos de orujo de aceitunas. II Congreso Iberoamericano de Ciencias Hortícolas. Vilamoura, Portugal. pp. 475-481.

- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. Sc. Hortic. 92: 147-176.
- Ryan, D., Robards, K. 1998. Phenolic compounds in olives. Analyst. 123: 31R-44R.
- Sampedro, M.I. 2005. Disminución de la fitotoxicidad de alpeorujo seco y extractado por hongos saprobios y arbusculares. Tesis doctoral, Universidad de Granada, España.
- Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J.A., Stazis, S.R., García-Romera, I. 2005. Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. Quemosphere 60: 1393-1400.
- Sampedro, I., Romero, C., Ocampo, J.A., Brenes, M., García-Romera, I. 2004a. Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. J. Agric. Food Chem. 52: 4487-4492.
- Sampedro, I., Aranda, E., Martín, J., García-Garrido, J.M., García-Romera, I., Ocampo, J.A. 2004b. Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. App. Soil Ecol. 26: 149-156.
- Sarika, R., Kalogerakis, N., Mantzavinos, D. 2005. Treatment of olive mill effluents. Part II. Complete removal of solids by direct flocculation with poly-electrolytes. Environ. Int. 31: 297-304.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Riffaldi, R., Lupetti, A. 1991. Effects of waste-water from olive processing on agricultural soil. Agrochem. 35: 135-148.
- Siracusa, G., La Rosa, A.D., Siracusa, V., Trovato, M. 2001. Eco-compatible use of olive husk as filler in thermoplastic composites. J. Polym. Environ. 9: 157-161.
- Stockberger, P. 1993. An overview of near-commercial and commercial solvent-based pulping processes. TAPPI J. 76: 71-74.
- Sun J., Mao F., Sun X., Sun R. 2004. Comparative study of hemicelluloses isolated with alkaline peroxide from lignocellulosic materials. J. Wood Chem. Technol. 24: 239-262.
- Uceda, M., Hermoso, M., Gonzáles, J. 1995. Evolución de la tecnología del aceite de oliva, nuevos sistemas ecológicos, ensayos y conclusiones. Alimentación, Equipos y tecnología 5: 92-98.
- Vierhuis, E., Servili, M., Baldioli, M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Montedoro, G. 2001. Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive

-
- oil on phenolic compounds and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1218-1223.
- Visioli, F., Vinceri, F., Galli, C. 1995. Wastewaters from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia* 51: 32-34
- Visioli, F., Grande, S., Bogani, P., Galli, C. 2004. The role of antioxidants in the Mediterranean diets: focus on cancer. *Eur. J. Cancer prev.* 13: 337-343.
- Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., Sirtori, C., Galli, C. 2005. Virgin olive oil study (VOLVOS): Vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur. J. Nutr.* 44: 121-127.
- Wang, X., Wang, Y., Chunsheng, Y., Wang, L., Han, S. 2002. Mechanism-based quantitative structure-phytotoxicity relationships comparative inhibition of substituted phenols on root elongation of *Cucumis sativus*. *Archiv Environ. Contamin. Toxicol.* 42: 29-35.
- Widden, P., Bisset, J. 1972. An automatic multichamber soil washing apparatus for removing fungal spores from soil. *Can. J. Microbiol.* 18: 1399-1404.