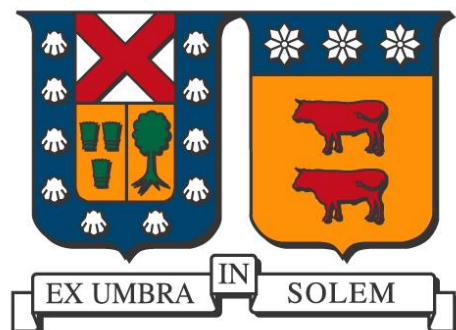


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
SANTIAGO-CHILE



**“PROPUESTA DE BIORREFINERÍA OLIVÍCOLA:
ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN DE FENOLES Y
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS”**

CONSTANZA ARACELLY GARCÍA ARAYA

**MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO**

PROFESOR GUÍA: DRA. ANDREA CARVAJAL GUEVARA
PROFESOR CORREFERENTE (1): DRA. CAROLYN PALMA TOLOZA
PROFESOR CORREFERENTE (2): DR. GONZALO NÚÑEZ MONTOYA

Agosto 2020

Agradecimientos

Agradezco a la profesora Andrea Carvajal por el apoyo y paciencia durante este trabajo y a Victoria Riquelme por ayudarme durante el proceso de experimentación en el laboratorio.

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional en cada paso durante la universidad y a lo largo de mi vida. También a mi pololo Félix por ayudarme durante la carrera y subirme el ánimo siempre. Agradezco a mis compañeros de universidad y amigos, quienes me acompañaron en esta larga etapa; Naira, Carla, Víctor, Javier, Felipe e Isa por formar este grupo tan bacán. Carlitos mi compañero de la vida en los laboratorios. Isabel y Angela por esos catanes para despejar la mente.

Resumen

El concepto de biorrefinería incluye una amplia gama de tecnologías capaces de separar los recursos de biomasa en sus componentes básicos. En el caso de la industria olivícola, el 80 % de lo que se genera es un residuo llamado alperujo, el que está compuesto principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa. El alperujo es un residuo dañino para el medio ambiente, debido a los efectos fitotóxicos que provocan un problema ambiental. En los últimos años, se han propuesto distintos métodos de valorización del alperujo, como la producción de biofertilizantes agrícolas, aditivos en la alimentación animal y producción de biogás y de etanol; sin embargo, a la fecha no existe una propuesta de valorización del residuo que incorpore el concepto de biorrefinería. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar una propuesta de biorrefinería valorizando el residuo de la industria olivícola a través de la extracción de fenoles y producción de enzima lacasa.

Para alcanzar el objetivo de estudio, el trabajo se dividió en tres etapas: en la primera etapa se realizó un pretratamiento térmico al alperujo donde se sometió a 120 °C durante 30 min. En la segunda etapa se realizó una extracción de compuestos orgánicos al alperujo comparando dos tipos de extractantes (agua y una mezcla de metanol/agua). En ambas etapas se evaluó el efecto sobre la capacidad de extracción de fenoles totales y azúcares reductores. Finalmente, en la tercera etapa, se realizó un tratamiento biológico durante 30 d a los distintos tipos de alperujos previamente tratados usando el hongo *Trametes versicolor*, donde se estudió la producción de lacasa.

Como principales resultados, se obtuvo que el pretratamiento térmico solubilizó el 50 % de los fenoles totales y el 40 % de los azúcares reductores extraíbles del alperujo, además de ser una etapa importante de esterilización del residuo para el posterior tratamiento biológico. En la etapa de extracción de compuestos orgánicos, se obtuvo que la mezcla metanol/agua extrajo un 15 % más de fenoles totales que sólo la extracción con agua. En la tercera etapa de tratamiento biológico se obtuvo que el alperujo utilizado sin una etapa previa de extracción de compuestos orgánicos produjo una mayor actividad enzimática, alcanzando $12,87 \pm 0,84$ U/g luego de 21 d de cultivo. Además, se observó que la presencia de azúcar en el medio sólido favoreció el crecimiento del hongo, pero no así su actividad enzimática. Por otra parte, la presencia de fenoles totales provocó que el hongo produjera una mayor actividad enzimática.

Como conclusión general, es posible indicar que para esta propuesta de biorrefinería que incluye la extracción de compuestos orgánicos y posterior producción de enzimas, es necesario primero extraer sólo una fracción de los fenoles totales presentes en el alperujo, para luego estimular la producción de enzimas con el hongo.

Contenido

1. Introducción	1
1.1. Biorrefinería	1
1.2. Industria olivícola	2
1.2.1. Aceite de oliva en Chile	3
1.2.2. Mercado Nacional	3
1.2.3. Residuo olivícola	4
1.2.4. Valorización	5
1.2.5. Compuestos fenólicos	8
1.3. Producción de enzimas	11
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo general	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. Materiales y métodos	16
3.1. Materias primas	16
3.1.1. Residuo	16
3.1.2. Hongo	16
3.2. Procedimiento experimental	16
3.2.1. Pretratamiento térmico	17
3.2.2. Extracción de compuestos orgánicos	17
3.2.3. Tratamiento biológico	18
3.3. Análisis químicos y estadísticos	20
Análisis estadístico:	22
4. Resultados y discusión	23
4.1. Pretratamiento térmico	23
4.1.1. Efecto de pretratamiento térmico	24
4.2. Etapa de extracción de compuestos orgánicos	28
4.2.1. Balance de materia	¡Error! Marcador no definido.
4.2.2. Extracción de compuestos fenólicos	30
4.3. Tratamiento biológico	32
4.3.1. Azúcar reductor residual	32
4.3.2. Compuestos fenólicos	35
4.3.3. Actividad enzimática de enzima lacasa	37

5. Conclusiones.....	44
6. Referencias	45
A. Análisis estadístico.....	51

Índice de tablas

Tabla 1. Caracterización de diferentes alperujos.....	24
Tabla 2. Caracterización alperujo pretratado térmicamente.....	25
Tabla 3. Actividad enzimática de diferentes residuos.....	40
Tabla 4. Se muestra las imágenes del hongo <i>Trametes versicolor</i> , para cada experimento donde se midió la máxima actividad enzimática.....	42

Índice de Figuras

Figura 1. Ejemplos de fuentes de residuos adecuadas para las biorrefinerías.....	2
Figura 2. Procesos de producción del aceite de oliva.....	4
Figura 3. Procedimiento experimental general realizado.....	17
Figura 4. Metodología de extracción de compuestos orgánicos.....	18
Figura 5. Procedimiento del tratamiento biológico realizado.....	20
Figura 6. Concentración de fenoles totales sin pretratamiento y con pretratamiento térmico.....	26
Figura 7. Concentración de azúcares reductores sin pretratamiento y con pretratamiento térmico.....	26
Figura 8. Relación sólido volátil-sólido total sin pretratamiento y con pretratamiento térmico.....	27
Figura 9. Balance de materia en el proceso de extracción de compuestos orgánicos utilizando como solvente agua, con pretratamiento térmico a 121 °C durante 30 min.....	28
Figura 10. Balance de materia en el proceso de extracción de compuestos orgánicos, sin pretratamiento térmico, utilizando como solvente agua.....	29
Figura 11. Concentración de fenoles totales recuperados utilizando dos tipos de solventes....	30
Figura 12. Concentración de azúcares reductores recuperados utilizando dos tipos de solventes.....	32
Figura 13. Caracterización de azúcares reductores residuales para cuatro condiciones durante 30 d.....	35
Figura 14. Caracterización de compuestos fenólicos para los cuatro experimentos durante 30 d.....	37
Figura 15. Actividad enzimática de lacasa para alperujo pretratado térmicamente y sometido a cuatro condiciones distintas de extracción de compuestos orgánicos.....	39
Figura 16. Actividad enzimática de lacasa en alperujo lavado con mezcla metanol/agua.....	39
Figura 17. Análisis de varianzas de un factor.....	51

1. Introducción

1.1. Biorrefinería

La biorrefinería ha surgido como un modelo de gestión de residuos, donde la materia prima utilizada es la biomasa para la producción de bioenergía y biomateriales (Serrano et al., 2017a). De esta forma se reduce el consumo de materias primas debido a la amplia gama de tecnologías utilizadas, que son capaces de separar la biomasa en sus componentes básicos para luego convertirlos en productos con un valor agregado. Con el objetivo de realizar la biorrefinería, se pueden aplicar distintos procesos tecnológicos como; termoquímicos, bioquímicos, mecánicos/físicos y químicos (Cherubini, 2010).

El proceso sostenible de la biomasa que ocurre en una biorrefinería se puede observar en la gama de productos comercializados como alimentos, materiales, productos químicos; además de energía, ya sean combustibles, energía eléctrica y térmica. Desde otro punto de vista, la biomasa para las biorrefinerías puede provenir de residuos municipales, residuos de animales, residuos forestales y residuos industriales; como se muestra en la Figura 1. Un ejemplo es la caña de azúcar, la cual es utilizada para la producción de azúcar o etanol, mientras que su residuo se utiliza en calderas para producir energía eléctrica y térmica. Este concepto asociado al aprovechamiento de los residuos de forma integral también es llamado economía circular, ya que prolonga la vida útil de los productos, utilizando los mismos residuos como parte de las materias primas en nuevos procesos (Forster-Carneiro et al., 2013).



Figura 1. Ejemplos de fuentes de residuos adecuadas para las biorrefinerías (Nizami et al., 2017).

1.2. Industria olivícola

Actualmente, 900 millones de olivos cubren más de 10 millones de hectáreas en todo el mundo y el 98 % se encuentran en la cuenca del Mediterráneo. Cada olivo produce de 15 a 40 kg/año de aceitunas, dependiendo de las condiciones climáticas.

El aceite de oliva es uno de los aceites comestibles más consumidos, con volúmenes de producción que aumentan constantemente desde el año 2005. La agricultura y la industria del aceite de oliva tienen importancia tanto económica como social, especialmente en los países mediterráneos donde se produce más del 98 % del aceite de oliva del mundo. Los principales productores de aceite de oliva a nivel mundial son España, Italia, Grecia y Portugal (Dermeche et al., 2013).

Los primeros olivos que llegaron a América fueron traídos desde Sevilla al Caribe y más tarde se propagaron por el resto del continente. En 1560 ya existían plantaciones de olivo en México, Perú, California, Argentina y Chile. La industria olivícola chilena se formó recién en 1952, cuando Don José Canepa Vaccarezza, incorporó a su empresa tecnología traída desde Italia y de esta forma descubrió el potencial de la olivicultura nacional (Chile Oliva, 2019).

1.2.1. Aceite de oliva en Chile

Chile posee más de 24.000 ha plantadas de olivos para la extracción de aceite de oliva y anualmente aumenta dicha producción. En 2016 se estima que la producción nacional fue de 17.500 ton (Chile Oliva, 2019). Además, las nuevas tendencias alimentarias y la importancia por el cuidado de la salud han servido de apoyo a la producción de aceite de oliva en Chile. La producción en el país ha tenido un incremento de 33 % en los últimos cinco años, alcanzando 22 mil toneladas durante la temporada 2018. Lo anterior, pese a que las plantaciones se han mantenido estables en las 25.000 ha desde 2014 (Chile Oliva, 2018).

1.2.2. Mercado Nacional

Con tecnología de punta en el proceso de extracción y un clima favorable, similar a los grandes países productores del mediterráneo, Chile ha conseguido producir aceite de oliva premium con una acidez de 0,2-0,3 %. Lo anterior ha generado que nuestro país se posicione como productor de aceite de oliva de calidad 100 % extra virgen. Independientemente de que la producción nacional de este producto sea menor en comparación con otros países, el potencial exportador del aceite de oliva chileno ha cobrado relevancia. En 2018 se exportaron 14.878 ton de aceite de oliva, ubicando a Chile en el séptimo lugar en el ranking de exportaciones a nivel mundial. Por lo anterior, pese a que el producto local no destaca en volumen, su calidad es valorada de manera positiva en los mercados externos.

Durante el año 2018 la superficie nacional de plantaciones de olivos se distribuye entre la región de Atacama y la región del Maule, la mayor parte se encuentra en las regiones de Coquimbo y del Maule.

Aproximadamente, 9.600 ton de aceite de oliva son consumidas en el país, donde el 74 % corresponde a aceite de oliva de origen natural, mientras que el 26 % que resta es aceite de oliva importado. El consumidor nacional prefiere el aceite de oliva extra virgen por sobre otros aceites vegetales y dentro de la oferta de aceites tiene preferencia por el de origen nacional (Chile Oliva, 2018).

1.2.3. Residuo olivícola

El proceso de extracción del aceite de oliva comienza con la cosecha de las aceitunas, las cuales son transportadas a la almazara, donde son lavadas para su posterior paso a la molienda donde son trituradas, luego como resultado se obtiene una pasta y esta pasa a la última etapa que es la centrifugación. Esta etapa de centrifugación puede ser de dos o tres fases dependiendo si se separa el aceite de los otros dos componentes juntos o los tres por separado. Si se extrae aceite de oliva en dos fases, es decir en una centrifuga horizontal que separa el aceite de oliva del resto de los componentes de la aceituna, se genera un residuo semisólido llamado alperujo (pulpa de aceituna, carozo y agua), por otra parte si la extracción es en tres fases, es decir en una centrifuga horizontal que separa el aceite de oliva del agua y del resto de los componentes de la pulpa, se genera alpechín y orujo (pulpa de aceituna más carozo) por separado, ver Figura 2 (Foods from Chile, 2015).

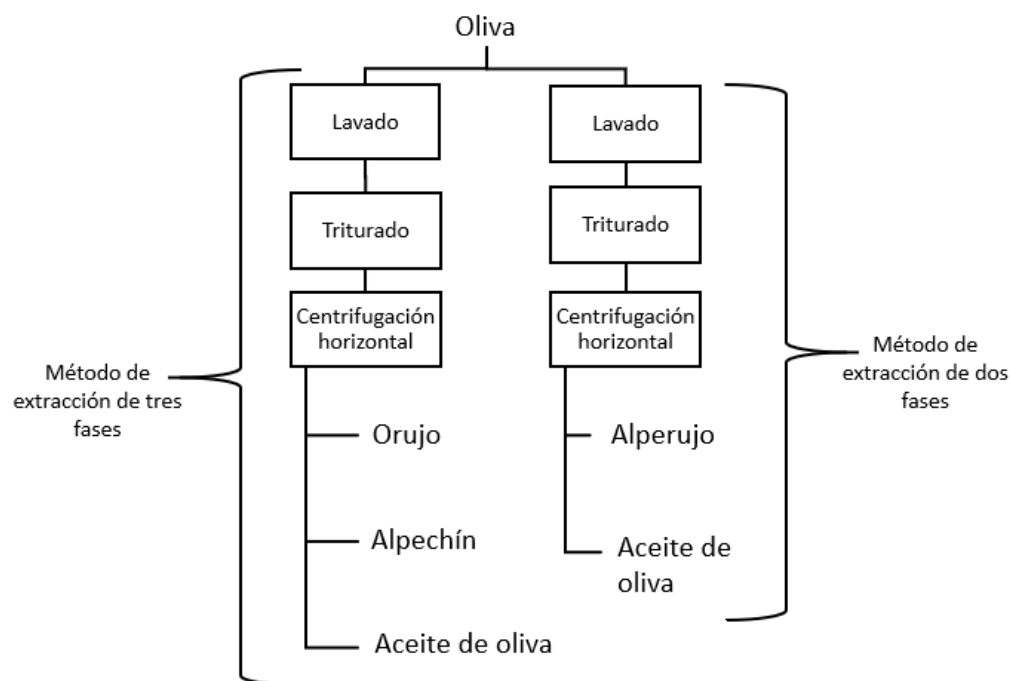


Figura 2. Procesos de producción del aceite de oliva (Elaboración propia, 2019)

El alperujo corresponde a una mezcla de alpechín y orujo, al cual no se le añade agua externa, y tiene un 75 % de humedad aproximadamente. En Chile, el sistema de extracción

predominante es el sistema de dos fases, con un 76 % del total de almazaras o plantas de extracción de aceite, utilizando este método (Segura, 2016).

Los residuos de almazara de dos fases (alperujo) están compuestos principalmente por agua (60-70 %), lignina (13-15 %), celulosa y hemicelulosa (18- 20 %), aceite de oliva retenido en la pulpa (2,5-3 %) y sólidos minerales (2,5 %). Los principales componentes orgánicos son azúcares, ácidos grasos volátiles, polialcoholes, proteínas, polifenoles y otros pigmentos (Rincón et al., 2013).

El alto volumen de residuo generado produce problemas ambientales importantes, ya que varios estudios han demostrado los efectos negativos que tiene sobre las poblaciones microbianas del suelo, ecosistemas acuáticos y aire a través de las emisiones de fenol y de dióxido de azufre. Los principales contaminantes provenientes de la oliva son los fenoles debido a su efecto fitotóxico e inhibición microbiana, además de un alto contenido de sales y de aceite (Dermeche et al., 2013).

1.2.4. Valorización

Debido a que el rendimiento del proceso de obtención de aceite de oliva corresponde a un 20 % del total procesado, lo que quiere decir que el 80 % que se genera es residuo (Segura, 2016), razón por la cual se necesita manejar y valorizar este subproducto. A continuación se presentan algunos métodos de aprovechamiento del residuo que se aplican en la actualidad:

- Abono orgánico

El alperujo 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, pero tiene una alta proporción C/N que provoca una reacción de demanda del nitrógeno del cultivo el cual puede ser mejorado adicionando una fuente externa de este. Sin embargo, los niveles elevados de fenoles del alperujo producen síntomas de fitotoxicidad en los cultivos ya que el uso directo de éste en el suelo tiene un efecto perjudicial, por lo que se debe optar por un pretratamiento del residuo antes de su uso para eliminar su toxicidad (Usaquen, 2008).

Un posible pretratamiento para aplicar el alperujo como abono es el compostaje, proceso biológico de fermentación en presencia de oxígeno. Durante este proceso existen varias etapas caracterizadas por la actividad de distintos organismos, existiendo una estrecha relación entre la temperatura, el pH y el tipo de microorganismos que se establecen en cada etapa (Sánchez, 2000). Se han realizado distintas investigaciones sobre la producción de compost a partir de alperujo, donde una de ellas se realizó en una planta piloto mediante aireación forzada combinada con control de retroalimentación de temperatura y nivel de humedad semanalmente agregándole agua para mantener un contenido de humedad entre 45 % y 55 %. Como resultado obtuvieron un compost rico en materia orgánica y libre de toxicidad, el cual pudo ser utilizado como enmienda orgánica eficiente para el cultivo de pimientos. Adicionalmente, el compost producido a partir de alperujo fue comparado con un compost de estiércol de ganado, donde los rendimientos obtenidos fueron similares, lo que confirmó el rendimiento del compostaje de alperujo (Alburquerque et al., 2006).

- Piensos y alimentos para animales

El alperujo es una fuente potencial de azúcares fermentables y sacáridos específicos (Dermeche et al., 2013), por lo que podría ser utilizado como pienso para animales. En Chile, se ha incorporado el alperujo en la dieta de caprinos, donde primero se debe deshidratar para disminuir la astringencia, el picor y el aroma a oliva, adquiriendo un sabor neutro. La forma de secarlo a menor costo es al aire libre, mediante su disposición en plástico extendido en el suelo y para apurar el proceso se dispone en bandejas más pequeñas. Una vez deshidratado, éste puede ser utilizado como ingrediente de dietas peletizadas o molido, como una alternativa de alimentación de caprinos, ovinos y eventualmente vacunos, sobre todo si se mezcla con diferentes ingredientes (Meneses & Cerda, 2016).

- Energía térmica

La generación de energía mediante el aprovechamiento de residuos se considera una fuente de energía renovable y limpia. La combustión en calderas de biomasa es una forma sencilla de aprovechar los subproductos obtenidos de la producción del aceite de oliva, para la producción de energía. Tanto el cuesco seco (semilla) obtenido del proceso de separación de cuesco-pulpa, como el orujillo seco obtenido de un proceso de decantación o centrifugación del alperujo, son un excelente combustible para su empleo en calderas de biomasa debido a

su poder calorífico de 4.000 kcal/kg aproximadamente (Consejo Nacional de Producción Limpia, 2012). Sin embargo, este método de aprovechamiento tiene un inconveniente que corresponde a la posible inducción de formación de productos químicos en la combustión que son tóxicos, tal como dioxinas y furanos (Usaquen, 2008).

Para la valorización de alperujo mediante combustión, las tecnologías más utilizadas a escala comercial son la caldera de parrilla y la tecnología de lecho fluidizado; cuya ventaja es que se trabaja a temperaturas cercanas a los 800 °C lo que disminuye las emisiones de óxidos de nitrógeno, la formación de aglomerados y escorias producidas durante el proceso de combustión (Consejo Nacional de Producción Limpia, 2012). Una desventaja que presenta este método es la inversión de un sistema de control de la contaminación atmosférica asociado a la cámara de combustión, además de los costos asociados al secado.

- Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es una fermentación microbiana en ausencia de oxígeno que da lugar a una mezcla de gases (principalmente metano y dióxido de carbono) conocida como biogás y una suspensión acuosa que contiene los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica. El biogás es una mezcla gaseosa de metano y dióxido de carbono, con pequeñas cantidades de otros componentes (nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, sulfuro de hidrógeno) cuya composición depende de la materia prima y del proceso. La materia prima utilizada para ser sometida a este tratamiento es cualquier biomasa residual que posea un alto contenido de humedad, un ejemplo de ello es el alperujo; el cual puede ser degradado bajo condiciones anaeróbicas para obtener como producto biogás que puede ser aprovechado en motores de gas natural para generar energía térmica y eléctrica y un lodo estabilizado que se puede usar como abono agrícola (Obaya Abreu, 2005).

- Pirólisis/Gasificación

La pirólisis se refiere a la conversión de biomasa en fracciones líquidas, sólidas y gaseosas calentando la biomasa en ausencia de aire. El proceso de pirólisis se puede clasificar de acuerdo con las condiciones de funcionamiento como la temperatura y la velocidad de calentamiento, como lento, rápido o flash. Los productos de pirólisis lenta son principalmente biocombustibles sólidos mientras que en la pirólisis rápida y flash los productos se utilizan

para la producción de líquido (bio-aceite) y biocombustibles gaseosos (Christoforou & Fokaides, 2016).

La gasificación es la conversión de biomasa en una mezcla de combustible gaseoso llamado gas de síntesis por la oxidación parcial del carbono contenido en la biomasa a altas temperaturas en un medio de gasificación como aire, oxígeno o vapor. La composición y las propiedades del gas dependen de la biomasa, el tipo de gasificador y las condiciones de funcionamiento del gasificador, como la temperatura, el tiempo de residencia y el oxidante utilizado (Christoforou & Fokaides, 2016).

- Compuestos químicos

También el alperujo puede ser una fuente económica de compuestos inorgánicos y orgánicos, debido a que tiene capacidad para transformarse en productos que se pueden utilizar en la industria agrícola, alimentaria y farmacéutica. Actualmente, se han realizado investigaciones sobre las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos que contiene el alperujo, ya que pareciera ser una fuente accesible y abundante de sustancias fenólicas biológicamente activas que tienen un potencial como antioxidante, antiinflamatorio y agente microbiano (Dermeche et al., 2013).

1.2.5. Compuestos fenólicos

La existencia y cantidad de fenoles específicos en la aceituna y por ende en el alperujo, depende de la variedad, estado de madurez, condiciones climáticas, estacionales y geográficas. Por ejemplo, la oleuropeína es el principal compuesto fenólico presente en aceitunas verdes, la cual disminuye con la maduración del fruto (Lama Muñoz, 2011). En el caso del alperujo, este contiene el 98 % de los compuestos fenólicos totales en el fruto del olivo, tales como el hidroxitirosol (HT) y 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) que tiene un alto interés económico debido a las propiedades que presenta. Específicamente, el HT se utiliza como un producto cosmético y farmacéutico debido a su actividad antioxidante y antiinflamatoria, mientras que el DHPG es un fenol simple con una mayor capacidad antioxidante que el hidroxitirosol (Lama Muñoz, 2011).

Se han propuesto diferentes métodos de extracción para la recuperación y aislamiento de fenoles de la aceituna y de los subproductos del proceso de aceite de oliva, por ejemplo la

extracción sólido-líquido, los métodos cromatográficos, la extracción de fluido supercrítico y métodos de separación de membranas (Lama-Muñoz et al., 2019).

- Extracción sólido-líquido

La separación de sustancias a partir de matrices vegetales se clasifica como extracción sólido-líquido y se puede llevar a cabo mediante técnicas clásicas basadas en la capacidad de extracción de diferentes disolventes y/o aplicación de calor y agitación. Este método de extracción tiene como ventaja el bajo costo del montaje de la unidad extractora y como desventaja los altos tiempos de extracción, el uso de grandes cantidades de disolvente y su baja selectividad (Naranjo, 2016).

Una investigación realizada en Valencia propuso la extracción de tirosol con dos extractantes: agua y metanol. Se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempo y se obtuvo como resultado un mayor rendimiento con el etanol debido a la afinidad de los compuestos fenólicos con sustancias menos polares que el agua, como el etanol por lo que aumenta la solubilidad y extracción. Se obtuvo 22 meqTY/g (miliequivalentes de tirosol por gramo de alperujo seco) (Arenas Nemogá, 2019).

- Método cromatográfico

La cromatografía es el conjunto de técnicas analíticas donde ocurre la separación que se produce cuando una mezcla de compuestos es arrastrada por una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria. La técnica de purificación consiste en separar mezclas de compuestos en función de su diferente afinidad entre una fase estacionaria y una móvil. Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla (Esther et al., 2005).

Según un estudio en España se realizó una recuperación de hidroxitirosol a partir de alperujo, para ello se aplicaron dos pretratamientos: uno térmico a 150 °C y uno biológico con hongos saprobios como *Coriolopsis rigida*, *Fusarium oxysporum* y *Paecilomyces farinosus* durante 10 semanas. A las muestras resultantes se les determinó la cantidad de hidroxitirosol mediante cromatografía en HPLC. El contenido en hidroxitirosol libre y total del alperujo tratado al vapor e incubado con *Paecilomyces farinosus* aumentó un 70% respecto al control tratado al vapor y sin tratamiento biológico (Usaquen, 2008).

- Extracción con fluidos supercríticos

Los fluidos supercríticos son usados en la extracción de compuestos de diferentes matrices alimentarias. Uno de los fluidos más utilizados es el dióxido de carbono, ya que es seguro, no es tóxico, tiene un alto poder de solubilización y proporciona altas tasas de transferencia de masa. Tiene como ventaja su amplia disponibilidad y alta pureza y como desventaja de este método es su alto costo de inversión en la construcción de equipos y mantenimiento (Naranjo, 2016).

Un estudio realizado en España aplicó la extracción con fluido supercrítico utilizando CO₂ en distintos residuos de aceituna (podas, hojas y orujo). En esto se usó etanol al 60% como codisolvente a tres niveles de presión 200, 250 y 300 bar. Los resultados muestran que 300 bar fue la mejor presión para extracción de fluido supercrítico en términos de actividad antioxidante de los extractos además de identificar como principal compuesto polifenólico el hidroxitirosol (Caballero et al., 2018).

- Método de separación de membranas

El proceso de membrana se diseña para llevar a cabo separaciones físicas y físico-químicas donde la membrana funciona como una pared de separación selectiva, ciertas sustancias pueden atravesar la membrana, mientras otras quedan atrapadas en ella (Lenntech, 2020). Una de las ventajas de utilizar este método es que la separación se produce en la misma fase, lo que resulta energéticamente favorable con respecto a una destilación. Otra ventaja es que no se produce acumulación, por lo que la unidad puede funcionar en continuo sin necesidad de ciclos de generación a diferencia de procesos de adsorción y por último no se requiere la adición de reactivos (Ures et al., 2015).

Se realizó un estudio de la recuperación de compuestos fenólicos presentes en la salmuera residual del proceso de fermentación de las aceitunas de mesa. Para ello se emplearon diferentes tipos de disoluciones modelo de menor a mayor complejidad (tipo I: solución acuosa de tirosol, tipo II: solución acuosa de tirosol y cloruro sódico, tipo III: solución acuosa de tirosol, cloruro sódico y materia orgánica) y tres membranas de nanofiltración NF 270, NF 245, NF 90, a distintas condiciones de operación (5 bar, 10 bar, 15 bar de presión) y (0.5 m/s, 1.0 m/s y 1.5 m/s de velocidad tangencial). La membrana con mejores prestaciones

para recuperar compuestos fenólicos es la NF 270 a 15 bar de presión y 1.5 m/s de velocidad tangencial ya que obtuvo un alto rechazo al cloruro sódico (19.63%) y a la DQO (56.85%) y un bajo rechazo a los compuestos fenólicos (4.63%) (Cazares Carrión, 2016).

1.3. Producción de enzimas

La producción de enzimas modificadoras de lignina se realiza mediante dos métodos principales: fermentación sumergida (SmF) y en estado sólido (SSF) de materiales lignocelulósicos; principalmente por hongos de pudrición blanca (Elisashvili et al., 2018).

La SmF se puede definir como un cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede no ser aireado por medios mecánicos. La forma más utilizada en los laboratorios de investigación es el matraz agitado (Díaz, 2009). La SmF se produce en grandes fermentadores líquidos que deben ser estériles y con un control de los factores de crecimiento, lo que hace aumentar los costos de producción. Por esta razón, se tiene que la SSF es una alternativa emergente para la producción de enzimas endógenas capaces de mejorar la hidrólisis de las matrices lignocelulósicas en aplicaciones ambientales (Mansour, 2015).

La SSF se define como un cultivo de microorganismos en un material sólido y húmedo, siendo el material sólido la fuente energética, el sustrato también puede ser de un material sólido inerte y húmedo. En el cual se produce el crecimiento microbiano en partículas sólidas húmedas sin la presencia de agua libre (Díaz, 2009). La principal fuerza impulsora para el desarrollo de los procesos de SSF es la gran necesidad de producción de enzimas a gran escala y bajo costo. Por lo tanto, la producción de estas enzimas bajo SSF a partir de biomasa lignocelulósica podría ser una estrategia rentable, debido a que se utilizarían sustratos más baratos. Una de las ventajas de SSF es que consume menos energía ya que no se necesita agitación porque se prefieren las condiciones estáticas para mantener intacto el crecimiento de micelios de los hongos, otra ventaja es que se requieren bajos volúmenes de equipo por lo que los costos son menores (Mansour, 2015).

Las principales desventajas de SSF son el riesgo de altas temperaturas en el cultivo, debido a una mala eliminación del exceso de calor debido a la baja conductividad térmica del sustrato sólido que actúa como soporte. También se tiene como desventaja la dificultad del control de

variables de crecimiento como el pH, el contenido de agua libre y en algunos caso, el pretratamiento del material sólido (Mansour, 2015).

1.3.1. Hongos de pudrición blanca

Los hongos de pudrición blanca han sido los más estudiados en el ámbito de la producción de enzimas, debidos a que son reconocidos por su capacidad para metabolizar una gran variedad de compuestos orgánicos y por demostrar una elevada capacidad degradativa; debido a que toleran altas concentraciones de contaminantes. Estos hongos han desarrollado un sistema enzimático extracelular que permite la degradación de los componentes químicos y estructurales de la madera. Tienen la capacidad de sintetizar enzimas como la lacasa, la manganeso peroxidasa y la lignina peroxidasa. Estos hongos han sido efectivos en la degradación de contaminantes ambientales tóxicos (Camacho-Morales et al., 2017).

1.3.2. Lacasa

Las lacasas son enzimas multicobre con actividad fenoloxidasa. Se distinguen de la mayoría de las fenoloxidasas debido a que en la reducción del oxígeno producen agua en lugar de peróxido de hidrógeno. La mayoría de las lacasas tienen un peso molecular entre 60 y 100 kDa, del 10 al 50 % del peso molecular es atribuido a la glicosidación, siendo la manosa el carbohidrato que se encuentra unido a dichas enzimas. El contenido de carbohidratos está relacionado con la estabilidad estructural de la enzima y con su protección frente a procesos de proteólisis e inactivación por radicales (Márquez, 2003).

Las principales características de las lacasa son las siguientes: se consideran enzimas termoestables, donde el intervalo óptimo de temperatura varía entre 50 y 70 °C, presentan una actividad óptima en un intervalo de pH entre 2,0 y 8,5, catalizan la oxidación de sustratos como compuestos fenólicos, aminas aromáticas, iones orgánicos e incluso pueden llevar a cabo desmetilaciones y deshalogenaciones en el caso de compuestos sustituidos (Márquez, 2003). Las enzimas lacasa se distribuyen ampliamente en los hongos que degradan la madera, como *Tratemetes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerrena maxima*, *Phlebia radiata*, *Ceriporiopsis. subvermispora* y *Pleurotus eryngii*. Aunque, la mayoría de las lacasas producidas por hongos que degradan la madera son glucoproteínas extracelulares, también se han reportado lacasas intracelulares.

La lacasa fúngica juega un papel en varios procesos, incluida la degradación de la lignina, la morfogénesis y la patogénesis (Abdel-Hamid et al., 2013).

- Aplicaciones industriales de lacasas

Las enzimas lacasas tienen distintos tipos de aplicaciones en la industria, por ejemplo: en la industria papelera se utiliza para la despolimerización de la lignina, en la industria textil se utiliza para la remoción de colorantes, en la industria alimentaria; diversos alimentos y bebidas contienen fenoles que pueden servir como sustratos para la lacasa y de esta manera se obtienen productos alimenticios modificados, también en la industria vinícola la principal función de la lacasa es la oxidación de los polifenoles, por lo que se reduce el sabor a corcho y/o astringencia en los vinos embotellados, en la industria cervecera y de jugos se utiliza como clarificante ya que los principales compuestos que causan la turbidez son los compuestos fenólicos (Márquez, 2003).

En resumen, se tienen varias formas de valorizar este residuo, donde las más utilizadas son: abono orgánico, alimento para animales y energía térmica. Por otro lado, el alperujo es una fuente de compuestos orgánicos e inorgánicos un ejemplo de ello son los compuestos fenólicos que tienen un gran potencial como antioxidante.

Existen varios métodos de extracción de compuestos fenólicos como la extracción sólido-líquido, extracción mediante cromatografía, extracción con fluidos supercríticos y extracción por membrana. La extracción sólido-líquido tiene como ventaja el bajo costo del montaje y como desventaja el uso de grandes cantidades de disolventes, pero aún no se tiene claro el efecto que tiene cada disolvente en el proceso de extracción de estos compuestos. Por otra parte, el método de extracción con fluidos supercríticos tiene como ventaja que se obtiene un producto con alta pureza, pero como desventaja el alto costo de la inversión de los equipos.

Otra forma de valorizar el alperujo es utilizarlo como sustrato en la producción de enzimas, con hongos de pudrición blanca. Para ello existen dos formas, fermentación sumergida y en estado sólido, la primera presenta altos costos operativos ya que se utilizan grandes fermentadores y se debe tener un control de todas las variables operacionales, en cambio la segunda que es la fermentación en estado sólido utiliza sustratos más baratos como por

ejemplo la biomasa. Lo que no se conoce de este proceso es cómo afecta la producción de enzimas en la concentración de compuestos orgánicos.

Una de varias investigaciones que se proponen como biorefinería, es la obtención de aceites esenciales, extractos ricos en fenoles y pectina, además de la producción de celulosa bacteriana a partir de cáscaras de naranja. Se utilizan dos métodos de extracción de estos compuestos, donde se concluyó que en el proceso de separación de pectina, si el extracto líquido rico en pectina derivado del tratamiento con HCl se concentra antes con etanol se obtuvo un 62 % menos de consumo de energía (Tsouko et al., 2020). En esta investigación se cumple el objetivo de lo que representa una biorefinería, que es obtener productos a partir de biomasa utilizando procesos que requieran la menor energía posible.

También existen varios proyectos en España sobre biorefinerías donde utilizan principalmente residuos de la industria vitivinícola y olivícola para la obtención de polifenoles y productos derivados, que antes eran desechos o lo utilizaban para generar energía. El objetivo que tienen estos proyectos es minimizar el consumo energético, disminuyendo los tiempos de extracción y maximizando el rendimiento, además de obtener productos biodegradables y biocompatibles (BioPlat et al., 2017).

Por lo tanto en función de lo dicho anteriormente, el concepto de biorefinería que propongo es combinar un proceso de extracción de fenoles con un tratamiento biológico, con el fin de obtener compuestos fenólicos como hidroxitirosol y enzimas como lacasa; ya que tienen un alto valor añadido.

2. Objetivos

Objetivo general

El objetivo de esta memoria fue estudiar la factibilidad técnica de una biorrefinería olivícola a través de la extracción de fenoles y la producción de enzima lacasa.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto del pretratamiento térmico en la concentración de fenoles extraíbles desde el residuo olivícola.
2. Optimizar la recuperación de fenoles mediante la aplicación de solventes orgánicos en el proceso de extracción y en el tratamiento biológico, desde el residuo olivícola.
3. Estudiar el efecto de la concentración de compuestos fenólicos y azúcar residual luego del proceso de extracción en la producción de enzima lacasa utilizando el hongo *Trametes versicolor*.

3. Materiales y métodos

3.1. Materias primas

3.1.1. Residuo

El residuo olivícola que se utilizó en esta investigación corresponde a alperujo, el cual tiene procedencia de olivas de variedad arbequina y fue facilitado por la Sociedad Agrícola y Ganadera Río Negro Ltda. de la región de Coquimbo, Ovalle. Se almacenó en cámara fría a 4 °C hasta su utilización.

3.1.2. Hongo

Se utilizó el hongo *Trametes versicolor*, hongo de pudrición blanca, preservado en placas Petri con medio de cultivo de extracto de malta y agar (MEA) a una temperatura de 4 °C. La proliferación del hongo se realizó mediante un cultivo estático, cortando 10 cilindros de micelio en crecimiento activo y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 2 L con 200 mL de medio de cultivo líquido (Salvachúa et al., 2011). Se dejó en incubación de forma estática a una temperatura de 30 °C durante 15 d, donde el cultivo se dio por finalizado debido a que se observó una película de hongo que cubría la totalidad de la superficie del medio de cultivo.

Para almacenar el micelio producido en los matraces de 1 L, se realizó un licuado y se trasvasijó a un frasco ISO con capacidad de 1 L, todo esto fue realizado bajo la campana de flujo laminar, con todos los materiales previamente esterilizados para prevenir la contaminación y se guardó a temperatura de 4 °C hasta el momento de su utilización.

3.2. Procedimiento experimental

Se ha dividido el proceso propuesto en tres etapas, donde la primera corresponde a un pretratamiento térmico, la segunda a una extracción de compuestos orgánicos y la tercera a un tratamiento biológico. Para evaluar condiciones operacionales en cada etapa el procedimiento experimental también se dividió en tres etapas (Figura 3), donde en la primera se aplica un pretratamiento térmico al alperujo fresco. En la segunda etapa se estudió la extracción de compuestos orgánicos utilizando dos extractantes agua y una mezcla metanol/agua. Finalmente, en la tercera etapa se estudió el tratamiento biológico sobre los distintos tipos de alperujos previamente tratados (con distintos procesos de extracción y sin esa etapa).

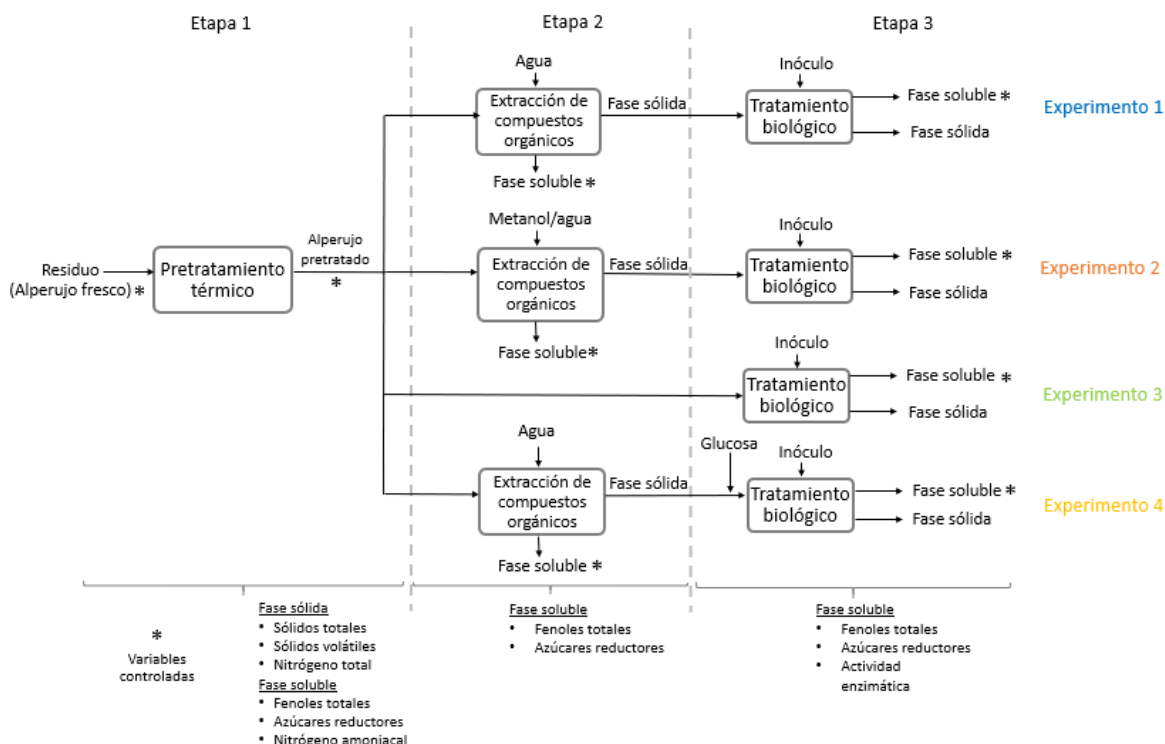


Figura 3. Procedimiento experimental general realizado.

A continuación se presenta el detalle de cada uno de los tratamientos realizados:

3.2.1. Pretratamiento térmico

El alperujo en los matraces fue sometido a un tratamiento térmico a 120 °C durante 30 min en un autoclave, Phoenix, AV-50 Plus.

3.2.2. Extracción de compuestos orgánicos

Para la extracción de compuestos fenólicos se utilizaron dos tipos de solventes: 1) agua destilada tipo II y 2) mezcla metanol/agua (1:1 %v/v). Donde, a 10 g de alperujo que se agregaron inicialmente en el matraz Erlenmeyer de 100 ml (con o sin aplicar pretratamiento térmico), se le agregó 40 mL del solvente correspondiente y se homogenizó mediante 1 h de agitación orbital a 250 rpm y 10 °C en Shaker, Cientec. Luego, el contenido del matraz se traspasó a un tubo de 50 mL para centrifugar la muestra a 5000 rpm, a 10 °C durante 10 min. Una vez finalizada la centrifugación se procedió a la separación de las fases para su posterior caracterización de fenoles totales y azúcares reductores en la fase soluble, ver Figura 4.

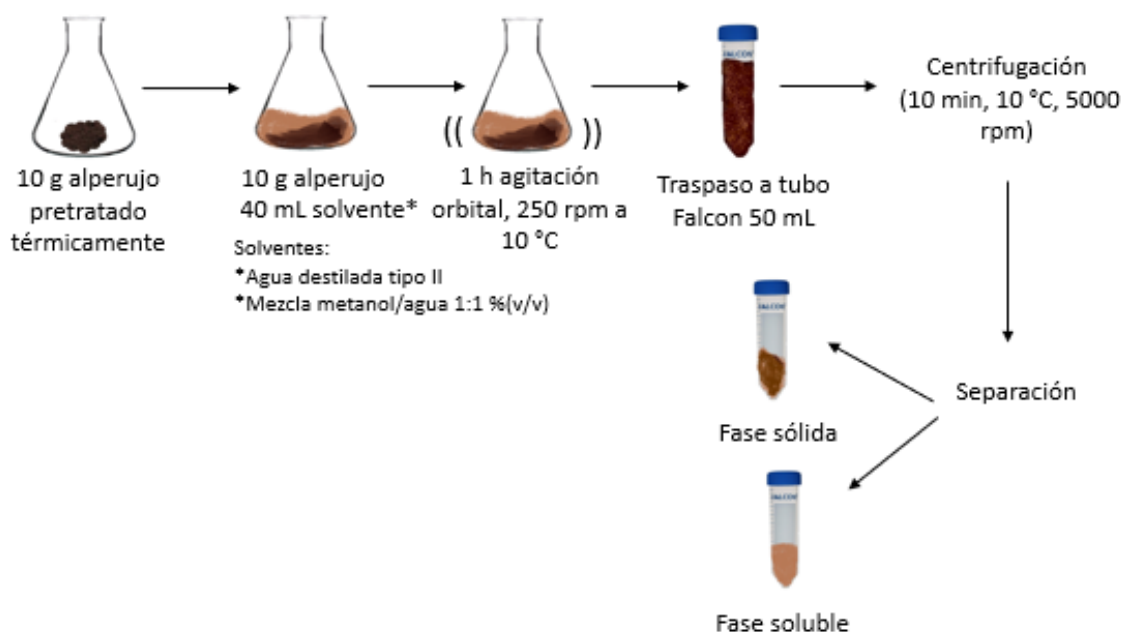


Figura 4. Metodología para la extracción de compuestos orgánicos.

3.2.2.1. Razón sólido/líquido

Se realizó la medición y cálculo de un balance de materia a los compuestos involucrados en el proceso de extracción de compuestos orgánicos, con el objetivo de determinar la cantidad de compuestos orgánicos presentes en cada una de las dos fases involucradas en la etapa de extracción como se muestra en la ecuación (1). Como consecuencia, en el proceso de extracción se masó la cantidad de alperujo agregado a cada tubo Falcon al inicio y al final del proceso de extracción.

$$n = \frac{\text{masa sólida (g)}}{\text{masa líquida (g)}} \quad (1)$$

3.2.3. Tratamiento biológico

El tratamiento biológico se aplicó a 4 tipos de alperujo según el pretratamiento aplicado previamente: 1) alperujo al que se le extrajo los compuestos orgánicos utilizando como extractante agua, 2) alperujo al que se le extrajo los compuestos orgánicos utilizando una

mezcla de metanol/agua, 3) alperujo al que no se le realizó extracción de compuestos orgánicos y 4) alperujo al que se le extrajeron los compuestos orgánicos usando agua como extractante y se le adicionó azúcar (Figura 3).

El tratamiento biológico se realizó mediante la adición de 7,5 mL de micelio de *Trametes versicolor* a los 10 g de alperujo previamente dosificado en los matraces y pretratado térmicamente. Además, se prepararon 2 matraces sólo con hongo (ausencia de alperujo) y 4 matraces sólo con alperujo (ausencia de hongo), para ser utilizados como controles (biótico y abiótico). Los matraces con alperujo y hongo se cultivaron de forma estática en una incubadora a 30 °C. Para monitorear el crecimiento del hongo se retiraron 2 matraces cada 3 d durante 30 d (ensayo destructivo). Al retirar los matraces se adicionó 40 mL de agua destilada, se homogeneizó con una espátula manualmente y luego en agitador orbital durante 1 h, para luego separar las fases líquida y sólida en tubos de 50 ml para centrifuga, donde se obtuvo la fase soluble luego de filtrar la fase líquida por un poro de 0,45 µm (ver Figura 5). El extracto filtrado fue caracterizado por medio de la cuantificación de azúcares reductores, fenoles totales y actividad enzimática de lacasa.

Para alcanzar una concentración de 1,68 mg/mL en la fase soluble, concentración original del residuo en estudio se preparó una solución de glucosa con una concentración de 138 mg/mL, donde a cada matraz se agregaron 500 µL de esta solución previo a ser inoculado.

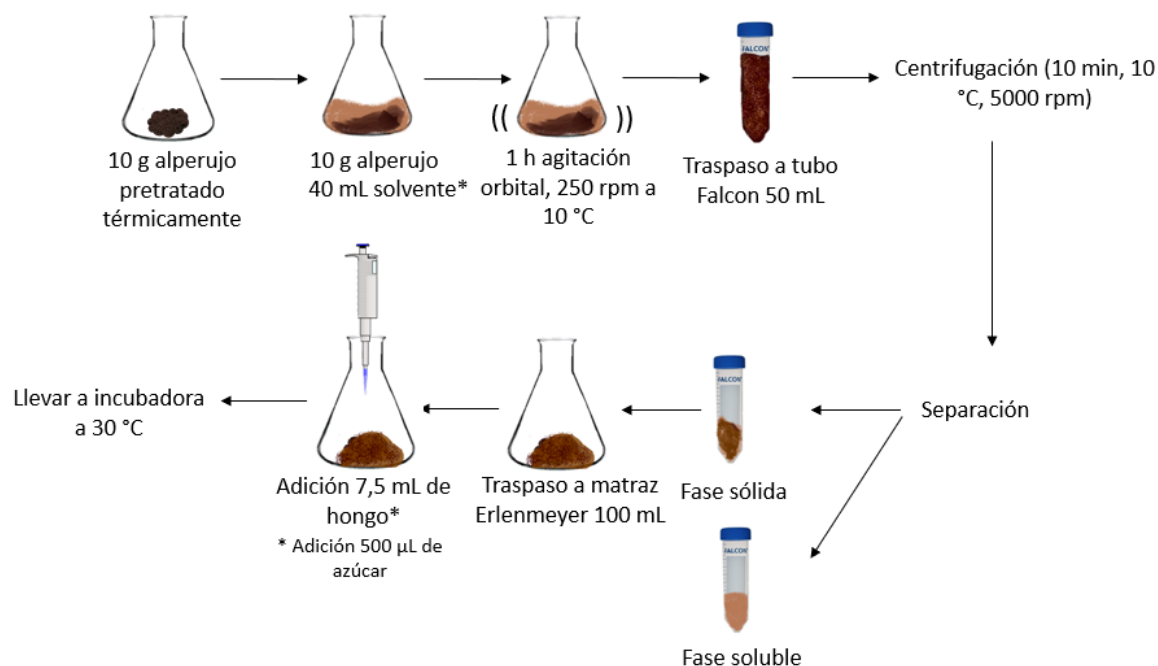


Figura 5. Procedimiento del tratamiento biológico realizado.

3.3. Análisis químicos y estadísticos

La caracterización del alperujo y los efectos provocados en las distintas etapas de la biorrefinería propuesta se realizó mediante la utilización de métodos analíticos tales como:

- Al alperujo sólido se le midió sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y nitrógeno total Kjeldahl (NTK).
- A la fase soluble del alperujo fue necesario preparar un extracto, donde a cada matraz se agregó 50 mL de agua destilada, se agitó durante 1 h en agitador orbital a 250 rpm a 10 °C y luego se traspasó a tubos de 50 mL para centrifugarlo y separarlo en fases. La fase líquida se filtró por poro 0,45 μm , donde su producto es llamado fase soluble, a la que se le caracterizó con fenoles totales, azúcares reductores y nitrógeno amoniacal.

A continuación se describen en detalle cada una de las técnicas analíticas utilizadas:

Sólidos totales y volátiles:

Para determinar el contenido de sólidos totales y sólidos volátiles del alperujo, se utilizó la metodología de APHA (American Public Health Association, 1992), esta consiste en masar

5 g de muestra, introducirlo a una estufa a 105 °C durante 24 h y finalmente masar para determinar la pérdida de masa. Para la medición de sólidos volátiles se introduce la muestra seca, proveniente de la estufa en una mufla a 550 °C durante 24 h y luego se masa.

Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK):

Para cuantificar la cantidad de nitrógeno presente en el alperujo se utilizó el método de NTK (Association of Official Analytical Chemists, 2000). El proceso comienza agregando 2 g de muestra a un tubo para el proceso de digestión de nitrógeno, se añaden 15 mL de H_2SO_4 98 % y una tableta catalizadora. Luego se calienta a 75 °C por 15 min, 150 °C por 30 min, 250 °C por 30 min y la digestión a 420 °C por 60 min.

Al terminar la digestión, los tubos se dejan enfriar a temperatura ambiente para seguir con el proceso de destilación, para ello se adicionan 50 mL de hidróxido de sodio 6 N y 25 mL de agua destilada durante 4 min. El producto obtenido se recoge en matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de ácido bórico al 2 % y finalmente se cuantificó el nitrógeno total mediante titulación con H_2SO_4 0,1 N.

Fenoles totales:

Para la cuantificación de fenoles, se implementó el método de colorimetría de Folin-Ciocalteu (FC) a micro-escala (Rover & Brown, 2013). Se colocó en cubetas de 3 mL las siguientes soluciones: 200 μ L de muestra, 2,5 mL de agua y 175 μ L de solución FC.

Luego, se agitó manualmente y se guardó por 8 min en oscuridad. Pasado el tiempo se agregó 525 μ L de carbonato de sodio al 20 % se agitó manualmente y se dejó en oscuridad durante 2 h, para luego medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 765 nm.

Azúcares reductores:

Para la cuantificación de azúcares reductores se utilizó el método de Miller, el cual utiliza el reactivo 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS). Se agregó a tubos 0,1 mL de muestra, 0,9 mL de agua y 3 mL de reactivo DNS. Luego se calientan en agua a 100 °C durante 5 min. Pasado el tiempo se enfrían rápidamente en una fuente con hielo, luego se esperó a que llegaran a una temperatura ambiente para realizar la lectura en el espectrofotómetro a 640 nm (Miller, 1959).

Nitrógeno amoniacal:

Para determinar la cantidad de nitrógeno amoniacal se utilizó el método de determinación directa con electrodo ión selectivo de amonio. Este mide iones de amonio por conversión a gas amoníaco al añadir solución ISA ajustador de fuerza iónica. Se utilizó una membrana hidrófoba permeable al NH_3 . El $NH_{3(ac)}$ y el NH_4^+ se convierten a NH_3 elevando el pH sobre 11 con base fuerte. El gas difunde a través de la membrana cambiando el pH de la solución interna detectado por el electrodo.

Actividad enzimática:

Para medir la actividad enzimática se utilizó el método ABTS, este método consiste en la oxidación ABTS [2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] al catión ABTS⁺ con un volumen de reacción de 1000 μ L que comprende a 250 μ L de ABTS 5 mM, 250 μ L de buffer acetato de sodio 100 mM, pH 5 y 500 μ L de extracto enzimático (Muñoz et al., 1997). La absorbancia se tomó a una longitud de onda de 436 nm en un espectrofotómetro (Analytik Jena, SPECORD 200 PLUS). El extracto enzimático corresponde a la fase soluble que se obtiene a partir de los ensayos destructivos.

Análisis estadístico:

Los ensayos para la etapa de extracción de compuestos orgánicos se realizaron por triplicado, los valores fueron promediados y se informaron junto con la desviación estándar. Los ensayos para la etapa de tratamiento biológico se realizaron en duplicado, informando el valor promedio junto con su desviación estándar correspondiente. Los datos obtenidos fueron analizados con el método ANOVA que utiliza las varianzas para ver si existen diferencias significativas entre cada tratamiento ver Anexo A. Todo lo anterior se realizó utilizando el programa Excel® de Office.

4. Resultados y discusión

4.1. Pretratamiento térmico

Para estudiar el efecto del pretratamiento térmico se caracterizó el alperujo fresco (sin pretratamiento) mencionado en el punto 3.1.1. Los resultados obtenidos se pueden observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, donde el contenido de sólidos totales y sólidos volátiles fueron 31,18 % y 29,05 %, respectivamente. Lo que indica que un 93,18 % de los sólidos totales corresponden a sólidos volátiles, es decir, son materia orgánica.

Este residuo se compone principalmente de agua con una humedad de 68,82 %, que es un factor importante en la siguiente etapa propuesta de tratamiento biológico, debido a que se necesita suficiente agua para permitir la actividad biológica del hongo (crecimiento y desarrollo). En general, la cantidad ideal de humedad para hongos de podredumbre blanca creciendo en estado sólido varía entre el 30 % y 80 % (Oriol et al., 1988). Por otro lado, demasiada agua disponible en el sistema puede inhibir el crecimiento del hongo en estado sólido, principalmente al reducir el oxígeno disponible (Bobadilla et al., 2005).

Los compuestos fenólicos determinados por el método de Folin-Ciocalteu descrito en el punto 3.3. fueron 1,8 mg/g, esta cantidad varía en función de la variedad, estado de madurez y condiciones climáticas de la aceituna (Romero et al., 2004). Existe una variedad de estos compuestos en el alperujo, donde principalmente son tirosol e hidroxitirosol, por otro lado algunos compuestos fenólicos como la oleuropeína y el ácido elenólico se hidrolizan durante el proceso de maduración de la aceituna dando lugar al tirosol e hidroxitirosol los cuales poseen una actividad antioxidante.

La cantidad de azúcares reductores fue de 4,304 mg/g de alperujo, esta es una fuente importante de energía para el hongo y para la producción enzimática. El contenido de nitrógeno Kjeldahl fue de 8,84 mg/g de alperujo lo que indica que es un contenido suficiente de nitrógeno orgánico para el crecimiento del hongo (Blair, 2018) además de ser utilizado para la formación de componentes celulares como proteínas y ácidos nucleicos (López Rodríguez et al., 2008).

Para evaluar la calidad del residuo utilizado se comparan los resultados obtenidos con otros resultados reportados en literatura (Tabla 1). En esta comparación, se observa que la cantidad

de sólidos totales y volátiles se encontraron dentro del rango reportado en la literatura para alperujos de distintas partes del mundo; desde otro punto de vista, la humedad medida fue mayor a la reportada en la literatura. Lo anterior se puede deber a que la cantidad de agua contenida en la oliva y en el residuo correspondiente varía según el grado de madurez o por exceso de riego (Tapia & Astorga, 2003), o también puede ser que se deba a que el almacenamiento del residuo en un estanque de gran capacidad dificultaba su homogeneización y se observaba separación en dos fases, por lo tanto al momento de tomar una muestra esta pudo no estar completamente homogeneizada.

Tabla 1. Caracterización de diferentes alperujos.

Residuo	Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Alperujo del norte de Chile	ST	31,18 ± 0,563	%	Valores obtenidos en esta memoria
	SV	29,05 ± 0,545	%	
	Fenoles totales	1,819 ± 0,167	mg/g	
	Azúcares reductores	4,304 ± 0,254	mg/g	
	NTK	8,84	mg N/g	
	Humedad	68,82	%	
Alperujo del norte de Chile	ST	36	%	(Garrido, 2017)
	SV	31	%	
	Humedad	64	%	
	Azúcar	11,2	mg/g	
	NTK	2,94	mg N/g	
Alperujo del norte de Chile	ST	33	%	(Barrera, 2016)
	SV	31	%	
	NTK	2,94	mg N/g	
Alperujo de Sevilla	ST	26,50	%	(Rincón et al., 2013)
	SV	22,8	%	
	NTK	3,6	mg N/g	
Alperujo	Fenoles	4 – 24,3	mg/g	(Dermeche et al., 2013)
	Azúcar	8,3 - 193	mg/g	
Alperujo de Grecia	Humedad	56,8	%	(Vlyssides et al., 2004)
	Fenoles	24,3	mg/g	
	Azúcar	8,3	mg/g	
	NTK	0,43	%	

4.1.1. Efecto de pretratamiento térmico

En la Tabla 2, se presentan los resultados obtenidos luego de realizar el pretratamiento térmico a 121 °C durante 30 min en el autoclave.

Tabla 2. Caracterización alperujo pretratado térmicamente.

Parámetro	Valor	Unidad
ST	34,87 ± 1,274	%
SV	32,68 ± 1,324	%
Fenoles	2,736 ± 0,113	mg/g
Azúcar	6,015 ± 0,047	mg/g
NTK	9,48	mg N/g

Un parámetro importante que se cuantificó fueron los compuestos fenólicos totales, ya que se han demostrado que son fitotóxicos, un problema al momento de la disposición final del residuo. De forma particular, el hidroxitirosol y la oleuropeína son compuestos fenólicos presentes en el alperujo que han demostrado inhibir o retrasar la tasa de crecimiento de varios microorganismos (Pereira et al., 2007), no se sabe cómo podría afectar la siguiente etapa de tratamiento biológico. Desde el punto de vista técnico, el pretratamiento térmico realizado al alperujo aumentó de manera significativa ($p = 0,023$) el contenido de fenoles totales en un 50 % respecto al alperujo no pretratado (ver Figura 6), lo que se debe principalmente a la solubilización de estos compuestos debido al aumento de la temperatura, según han reportado estudios anteriores (Serrano et al., 2017b). Según estudios, uno de los compuestos fenólicos principales presentes en el alperujo es el hidroxitirosol, se realizó un tratamiento térmico al residuo y dio como resultado un aumento de 2 veces más con respecto al residuo no tratado (Serrano et al., 2017a), este compuesto presenta características como antioxidante ya que retrasa la desaparición de vitamina E presente en las lipoproteínas de baja densidad y previene la formación de lipoperóxidos al retrasar la oxidación de los ácidos grasos (Moreno et al., 2003) por esta razón se considera como uno de los compuestos principales a recuperar en el proceso de valorización.

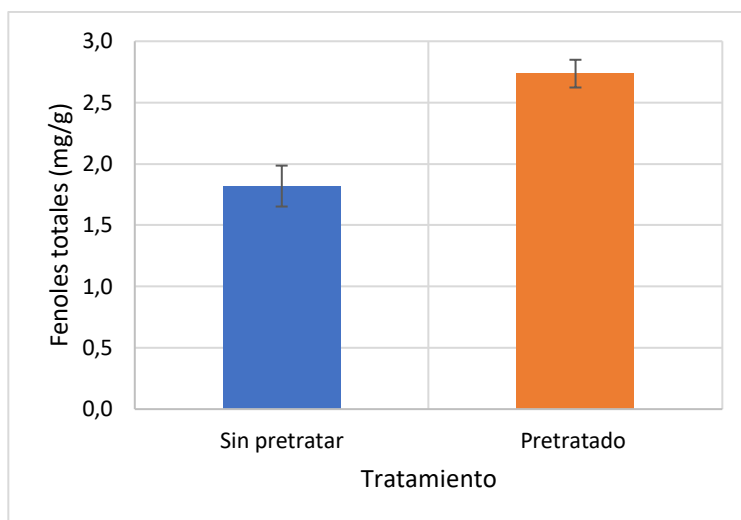


Figura 6. Concentración de fenoles totales sin pretratamiento y con pretratamiento térmico.

Otro parámetro que fue afectado debido al pretratamiento térmico fue la cantidad de azúcares reductores, los que son utilizados como fuente de energía por el hongo en el crecimiento. El tratamiento térmico provocó un aumento significativo ($p = 0,011$) del 40 % respecto al alperujo sin pretratar (Ver Figura 7). El aumento observado se debe principalmente a la solubilización de estos azúcares debido al aumento de temperatura; además, se ha reportado que durante el pretratamiento el agua puede penetrar en la estructura celular de la biomasa, hidratando la celulosa y solubilizando hemicelulosa (Serrano et al., 2017a).

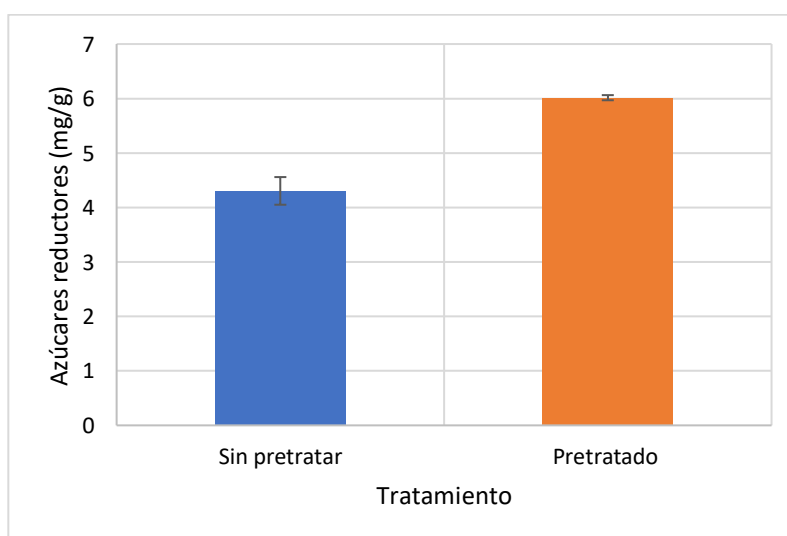


Figura 7. Concentración de azúcares reductores sin pretratamiento y con pretratamiento térmico.

El ratio entre sólido volátil y sólido total es otro de los parámetros utilizados para comparar el efecto del pretratamiento térmico, dando como resultado un aumento del 0,6 % con respecto al valor sin pretratar (Figura 8), este aumento no fue significativo ($p = 0,15$). Esto se refiere a que aumentó la cantidad de materia orgánica disponible en el residuo, siendo este un sustrato potencial para el crecimiento del hongo. Esta podría ser consecuencia de la hidrólisis de la materia fibrosa del residuo, pero como el aumento no fue significativo, se traduce en que al estar el sistema cerrado durante el pretratamiento, se evitó la liberación de estos compuestos orgánicos (Serrano et al., 2017a).

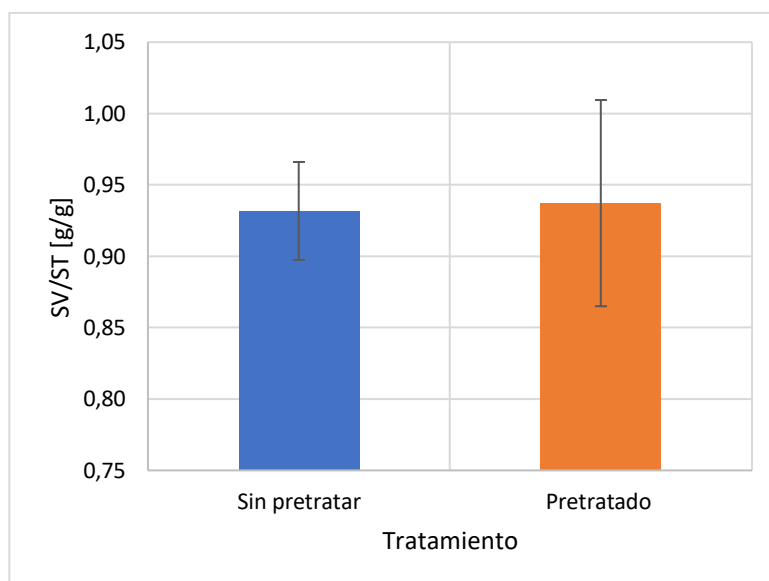


Figura 8. Relación sólido volátil-sólido total sin pretratamiento y con pretratamiento térmico.

Según los resultados obtenidos, el pretratamiento térmico tuvo un efecto significativo en la cantidad de compuestos fenólicos y azúcares reductores, ya que aumentaron en un 50 % y 40 % respectivamente; esto es debido principalmente a la solubilización de estos compuestos y en el caso de los azúcares reductores también puede deberse a que el agua puede penetrar en la estructura celular de la biomasa, hidratando la celulosa y solubilizando hemicelulosa. En el caso del ratio de sólidos volátiles y sólidos totales, el pretratamiento aplicado no tuvo efecto significativo.

4.2. Etapa de extracción de compuestos orgánicos

Luego de la etapa de pretratamiento térmico se realizó una etapa de extracción de compuestos orgánicos, donde se cuantificó fenoles totales, con la finalidad de medir la capacidad de obtener un subproducto con alto interés económico y azúcares reductores.

4.2.1. Razón sólido/líquido

Al realizar el balance de materia utilizando agua destilada como solvente se obtuvo una relación sólido/líquido igual a 0,31. En la Figura 9 se presenta un diagrama con el balance de materia propuesto para el proceso de extracción de fenoles totales a partir de alperujo fresco, donde desde de 1 kg de residuo se obtuvo una fracción líquida correspondiente al 69 % de la materia total, con una concentración de 3,76 g/kg de compuestos fenólicos y 4,92 g/kg de azúcares reductores; y por otro lado una fracción sólida con un contenido de sólido seco de 0,19 g/kg, el cual podría ser utilizada potencialmente para la producción de metano mediante digestión anaerobia o directamente carbonización. Por lo tanto, es posible indicar que a partir de 1 kg de residuo se podría obtener 3,76 g de fenoles totales y 4,92 g de azúcares reductores.

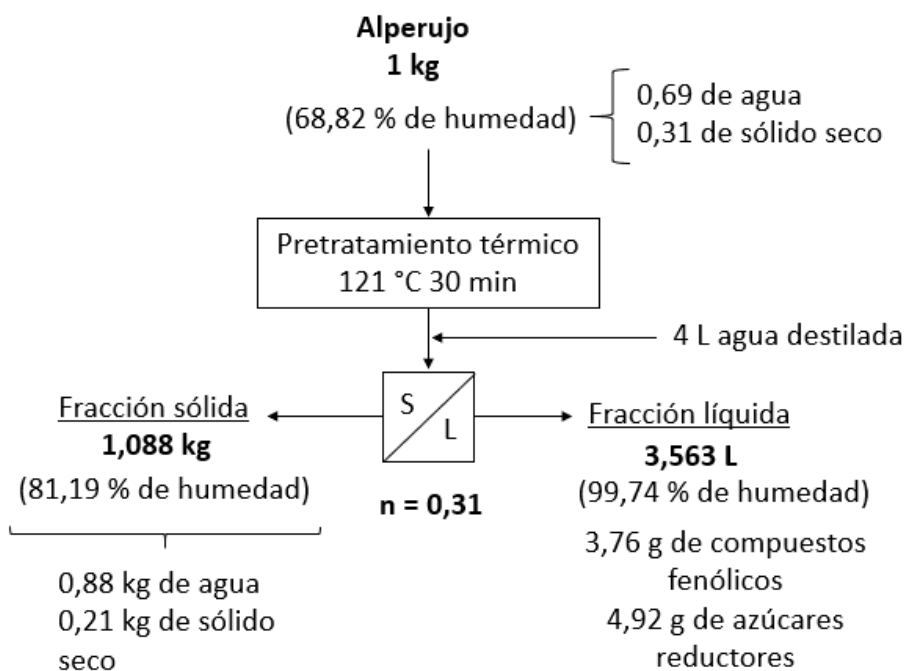


Figura 9. Balance de materia en el proceso de extracción de compuestos orgánicos utilizando como solvente agua, con pretratamiento térmico a 121 °C durante 30 min.

De la misma forma se realizó el balance de materia al proceso de extracción de compuestos orgánicos, sin la etapa de pretratamiento térmico y usando agua como solvente, donde se obtuvo una relación sólido/líquido igual a 0,35. En la Figura 10 se presenta el diagrama del balance de materia para el proceso de extracción de fenoles sin pretratamiento térmico, donde a partir de 1 kg de residuo se obtuvo una fracción líquida que corresponde a un 65 % de la materia total, con una concentración de 2,26 g/kg de compuestos fenólicos y 3,50 g/kg de azúcares reductores. Por otra parte, se obtuvo una fracción sólida que posee un contenido de sólido seco de 0,22 g/kg. De esta manera es posible decir que a partir de 1 kg de residuo se podría obtener 2,26 g de compuestos fenólicos y 3,50 g de azúcares reductores.

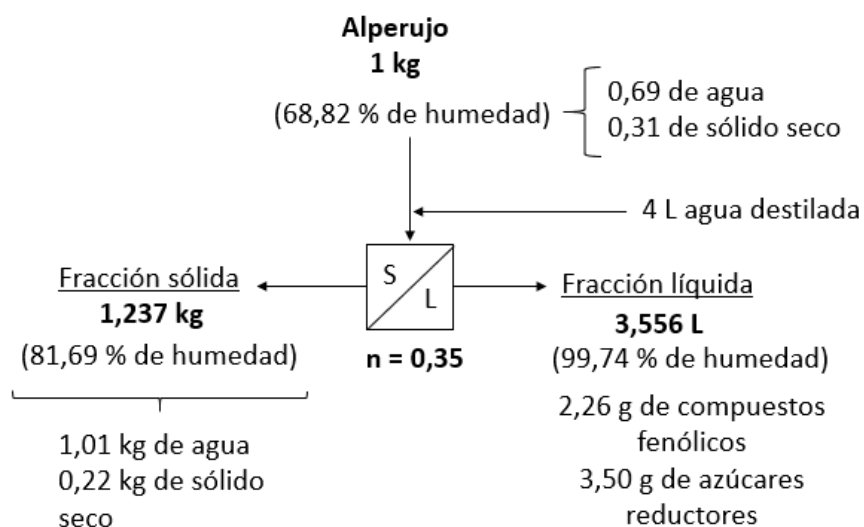


Figura 10. Balance de materia en el proceso de extracción de compuestos orgánicos, sin pretratamiento térmico, utilizando como solvente agua.

De lo anterior, se puede ver que al realizar el pretratamiento térmico se obtiene una fracción líquida mayor en un 4 % con respecto al que no fue pretratado, donde además el contenido de compuestos orgánicos fue mayor. Esto se debe a que varios compuestos orgánicos presentes en el residuo fueron solubilizados al aplicar este pretratamiento térmico, debido a la hidrólisis de la materia fibrosa donde el agua puede penetrar en la estructura celular del residuo hidratando la celulosa y solubilizando la hemicelulosa, también puede ocurrir la

hidrólisis de la hemicelulosa, lo que da como resultado oligosacáridos solubles y luego en azúcares monoméricos (Serrano et al., 2017a). Por lo tanto, como consecuencia del pretratamiento, todos estos compuestos se desplazaron a la fase líquida y aumentó su capacidad de recuperación.

4.2.2. Extracción de compuestos fenólicos

Para el proceso de extracción se obtiene que la concentración de compuestos fenólicos extraídos utilizando como solvente agua fue igual a 3,76 mg/g, mientras que al utilizar la mezcla de metanol agua 1:1 se obtuvo 4,33 mg/g. En base a los resultados obtenidos, es posible indicar que el tipo de solvente usado en la recuperación de fenoles totales aumentó un 15 %, siendo esta diferencia significativa ($p = 0,001$) (Figura 11).

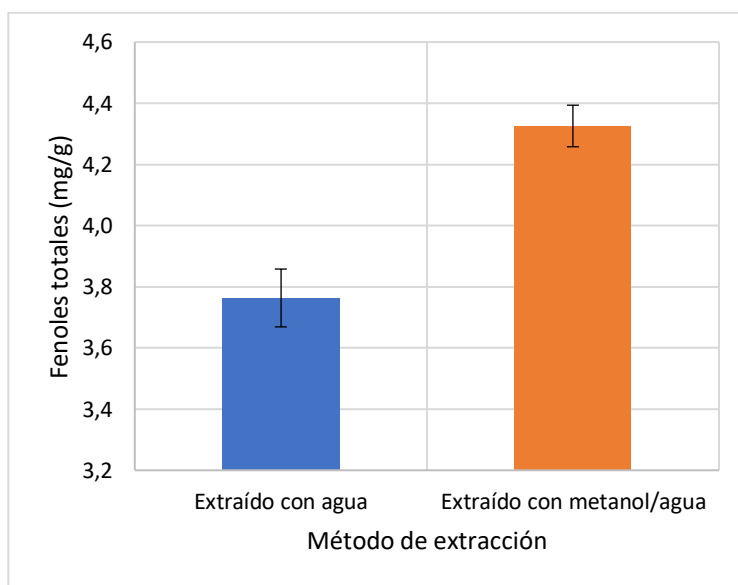


Figura 11. Concentración de fenoles totales recuperados utilizando dos tipos de solventes.

La diferencia de concentración obtenida de fenoles totales se debe principalmente a las propiedades químicas de los solventes utilizados. El agua y el metanol son solventes polares en los que son solubles diferentes solutos polares e iónicos, estos (de forma individual y en mezcla) se han utilizado comúnmente para la extracción de compuestos fenólicos de productos frescos a diferentes concentraciones en agua. Desde este punto de vista, la recuperación de fenoles se ve influenciada por la solubilidad de estos compuestos fenólicos

en el solvente específico utilizado, y por la polaridad del solvente; por lo general, los solventes menos polares se consideran adecuados para la extracción de fenoles lipofílicos (Alothman et al., 2009). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de lo esperado, ya que la mezcla de metanol/agua hace que se solubilizan tanto fenoles hidrofílicos como lipofílicos, aumentando la capacidad de recuperación respecto al agua.

Un factor adicional a considerar y que afecta la cantidad extraída de fenoles es el tiempo de extracción, este estudio se realizó con esta variable bloqueada, donde siempre utilizó un tiempo de extracción de 1 h, pero un tiempo de extracción mayor aumentaría la cantidad extraída de compuestos fenólicos (Lafka et al., 2011).

Por otra parte, el metanol no es un disolvente de grado alimenticio debido a su alta toxicidad, por lo que pueden quedar trazas del solvente en el extracto y ser tóxico para el uso humano, por lo que para valorizar estos compuestos se debería utilizar otro solvente por ejemplo el etanol debido a la baja toxicidad para consumo humano (Soto-García & Rosales-Castro, 2016).

4.2.3. Extracción de azúcares reductores

Para el proceso de extracción se obtiene que la concentración de azúcares reductores extraídos utilizando como solvente agua fue igual a 4,92 mg/g, mientras que al utilizar la mezcla de metanol agua 1:1 se obtuvo 4,27 mg/g. En base a los resultados obtenidos, es posible indicar que el tipo de solvente usado en la recuperación de azúcares reductores aumentó un 15 %, pero esta diferencia no fue significativa ($p = 0,11$) (Figura 12).

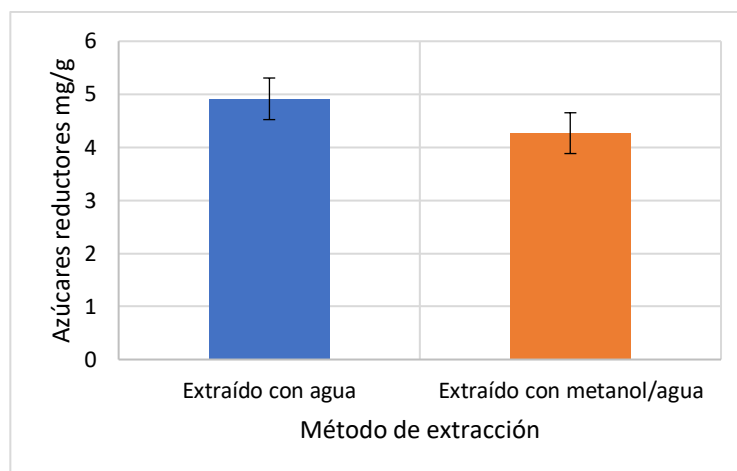


Figura 12. Concentración de azúcares reductores recuperados utilizando dos tipos de solventes.

La recuperación de azúcares reductores se debe a la solubilidad de estos en agua y solventes polares debido al peso molecular de estos azúcares. Los que tienen peso molecular bajo, que son monosacáridos y oligosacáridos, son solubles en agua, alcoholes y solventes polares; mientras que presentan una baja solubilidad en etanol y son insolubles en disolvente poco polares. Los polisacáridos son menos solubles, siendo alguno de ellos (como la celulosa) insolubles en agua (Ruiz, 2015). Por lo tanto, como se obtuvo una mayor extracción de azúcares usando agua como solvente quiere decir que existe una mayor cantidad de azúcares de bajo peso molecular, pero esto no se puede asegurar debido a que la diferencia no fue significativa.

4.3. Tratamiento biológico

Para estudiar el efecto de la etapa de extracción en la siguiente etapa de tratamiento biológico, y así poder relacionar las concentraciones de fenoles y azúcares residuales en la capacidad de crecimiento del hongo, se monitorearon tres variables durante el tiempo de cultivo: la actividad enzimática de la enzima lacasa, la concentración de los compuestos fenólicos totales y por último la concentración de los azúcares reductores. A continuación se presenta el detalle de los resultados obtenidos.

4.3.1. Azúcar reductor residual

Los azúcares reductores son una fuente de carbono disponible para el crecimiento del hongo, por lo que se cuantificó su concentración durante el tratamiento biológico. Se observa en la

Figura 13 que la concentración de azúcares reductores disminuyó en función del tiempo de cultivo para las cuatro condiciones experimentales estudiadas, variando en función del tipo de extracción de compuestos orgánicos aplicado. Por lo tanto, inicialmente es posible indicar que se confirmó que el hongo utilizó estas concentraciones de compuestos residuales como fuente de energía para su crecimiento y desarrollo.

Para los experimentos realizados sobre alperujo con recuperación de compuestos orgánicos se obtuvo una oscilación de la concentración de azúcares reductores entre 0 y 2 mg/g. De forma más específica: en el primer experimento que se observa de color azul (Figura 13) comenzó con una concentración de azúcar reductor inicial de $1,50 \pm 0,185$ mg/g a los 0 d debido a que la mayor parte se solubilizó y fue extraída en conjunto con compuestos orgánicos, luego su concentración disminuyó y se mantuvo en un rango entre 0 y 2 mg/g, por lo que se obtuvo una reducción de azúcares reductores del 72 % durante 30 d de tratamiento.

Para el segundo experimento que se muestra de color naranja (Figura 13) se obtuvo una concentración inicial de azúcares reductores de $1,88 \pm 0,10$ mg/g, luego de 3 d de tratamiento disminuyó su concentración a un rango de 0-2 mg/g y se mantuvo constante a lo largo del tratamiento, se obtuvo una reducción de la concentración de azúcares reductores de un 44 %. La tendencia de la concentración de azúcares reductores fue similar al primer experimento y esto se debe a que el alperujo en ambos casos fue sometido a la etapa de extracción de compuestos orgánicos.

En el tercer experimento que se observa de color verde (Figura 13) se obtuvo una concentración inicial de azúcares reductores de $8,42 \pm 0,08$ mg/g, el valor es mayor que en los dos experimentos anteriores debido a que al residuo no se le aplicó el tratamiento de extracción de compuestos orgánicos (donde también se solubilizaron estos azúcares reductores) y luego de 12 d de tratamiento la concentración de azúcares reductores disminuyó considerablemente a un rango entre 3,00 y 4,00 mg/g, donde se mantuvo constante, por lo que se obtuvo una reducción del 64 % de los azúcares reductores. Este valor de concentración fue mayor que en todos los experimentos y se debe a que el hongo tenía una mayor disponibilidad de sustrato, tanto de azúcares reductores como de fenoles totales.

Finalmente, en el último experimento que se presenta de color amarillo (Figura 13), donde se agregó glucosa, se obtuvo una concentración inicial de azúcares reductores de $11,00 \pm 0,26$

mg/g y después de 9 d de tratamiento la concentración disminuyó hasta llegar a un rango donde se mantuvo constante entre 0 y 2,00 mg/g este rango es el mismo que en el experimento 1 y 2 y se debe a que el hongo no tenía el suficiente alimento por lo que consume mayormente el azúcar que hay disponible llegando a un límite donde ya deja consumir este compuesto, llegando a una reducción del 93 % de los azúcares reductores.

Para los cuatro experimentos realizados, se observa que luego de 3 d de tratamiento biológico comienza una reducción de los azúcares reductores, lo cual es un resultado esperado ya que el hongo utiliza el azúcar como fuente de alimento, por lo que a medida que transcurren los días la concentración de azúcares reductores disminuyó. En el experimento 4 se logró una mayor reducción de estos compuestos y se debe principalmente a que el azúcar se encontraba disponible para que el hongo lo utilice ya que esta se agregó sobre el alperujo antes de inocular.

El resultado de la disminución de los azúcares reductores en función del tiempo coincide con estudios realizados, como es el caso donde se realizó un tratamiento con el hongo *Flammulina velutipes* sobre el residuo trigo, este estudio indica que el contenido total de azúcar disminuyó durante el tratamiento con diferentes contenidos de humedad del trigo, donde se observó que con un contenido de humedad del 65 % se obtuvo una reducción de azúcares reductores del 48,29 %, además indica que la reducción del rendimiento de azúcar está relacionado con la eliminación de la lignina (Lalak et al., 2016).

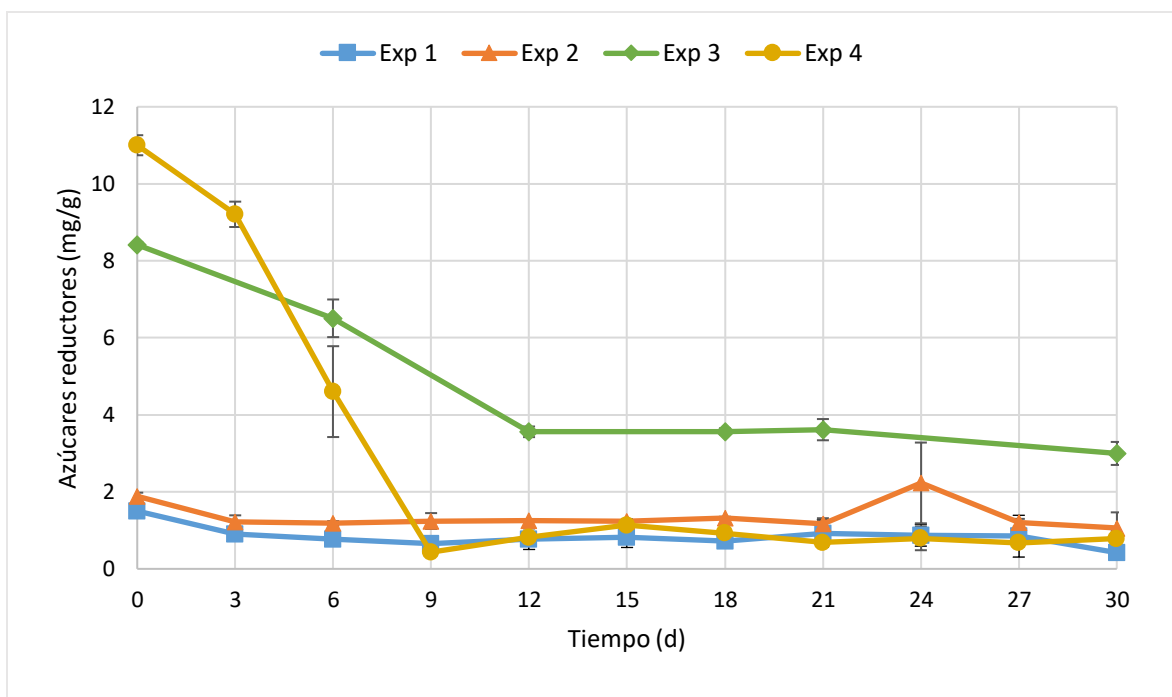


Figura 13. Caracterización de azúcares reductores residuales para cuatro condiciones durante 30 d.

4.3.2. Compuestos fenólicos

Como se mencionó anteriormente los compuestos fenólicos presentes en el alperujo tienen tanto efectos fitotóxicos como pueden actuar como antioxidantes, dependiendo del compuesto y su concentración (Lama, 2011), por lo que se cuantificó su concentración durante el tratamiento biológico para evaluar su posible efecto en el crecimiento del hongo y expresión de actividad enzimática (Figura 14).

En el primer experimento, donde ya se habían extraído los compuestos orgánicos, se observó que el residuo contenía fenoles totales con $0,396 \pm 0,005$ mg/g al inicio del tratamiento, lo que luego disminuyó y se mantuvo en un rango entre 0,15 y 0,30 mg/g, por lo que se obtuvo una reducción de contenido de fenoles totales de 59 % durante 30 d de tratamiento.

El segundo experimento contenía fenoles totales por $0,523 \pm 0,096$ mg/g al inicio del tratamiento biológico, lo que también fue disminuyendo hasta un rango donde se mantuvo constante entre 0,2 y 0,3 mg/g; alcanzando una reducción del 65 %.

En el tercer experimento, donde no se realizó la etapa de extracción de compuestos orgánicos, contenía $1,756 \pm 0,015$ mg/g de fenoles totales al inicio del tratamiento y luego disminuyó

hasta mantenerse constante en los 0,60 mg/g, aproximadamente; siendo una reducción de 69 % de fenoles totales.

Finalmente, el cuarto experimento, donde se extrajo los compuestos orgánicos al alperujo y se le adicionó azúcar, se obtuvo una concentración de fenoles totales residuales de $0,779 \pm 0,012$ mg/g que luego de 6 d de tratamiento disminuyó considerablemente, manteniéndose en 0,2 mg/g, aproximadamente; siendo una reducción del 91 %.

Para los cuatro experimentos realizados luego de 6 d de tratamiento se observó una disminución considerable de la concentración de fenoles totales, lo cual era esperado ya que estos compuestos fenólicos pueden ser utilizados por el hongo como un tipo de sustrato, además se observó que en los experimentos 1, 2 y 4 no hay diferencias en los valores finales ya que se mantienen en un rango de 0,3 mg/g de fenoles totales. En el caso particular del tercer experimento (color verde) se obtuvo una mayor concentración de fenoles totales iniciales, por lo que esto explicaría que el hongo se demoraría más tiempo en reducir estos compuestos.

Finalmente se obtuvo que la mayor reducción de la concentración de fenoles totales se produjo en el cuarto experimento donde no se realizó la etapa de extracción de compuestos orgánicos con un valor de 91 %. Este resultado es mayor que lo reportado por la literatura donde se realizó un tratamiento biológico al residuo de almazara sólido (orujo) usando *Coriolopsis rigida* logrando una reducción del contenido de fenoles totales de 73 % luego de 20 d de tratamiento (Aranda et al., 2006). En otra investigación se trató el alpechín con lacasa de *Trametes versicolor* donde se obtuvo una reducción del contenido de fenoles totales entre el 55 % y 67 % (Elisashvili et al., 2018). También se han reportado reducciones muy altas (> 80 %) en el contenido de fenoles totales utilizando hongos de pobredumbre blanca, entre ellos *Trametes versicolor* en el alpechín (Ntougias et al., 2015).

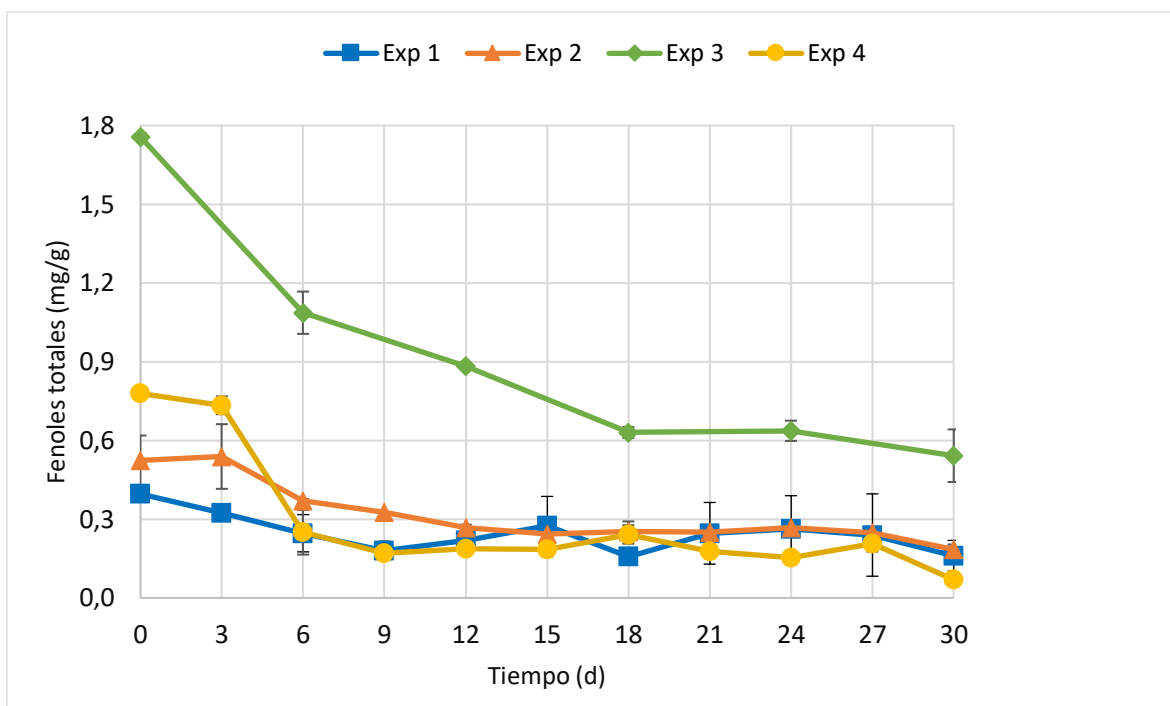


Figura 14. Caracterización de compuestos fenólicos para los cuatro experimentos durante 30 d.

4.3.3. Actividad enzimática de enzima lacasa

En el caso particular de la enzima lacasa, es importante destacar que esta proteína sería el producto de valor agregado que se podría obtener en esta etapa del proceso. En la Figura 15 se presenta la producción de enzima lacasa durante 30 d de tratamiento biológico, para los cuatro experimentos estudiados.

El primer experimento realizado, corresponde al alperujo pretratado térmicamente y con recuperación de fenoles totales utilizando como extractante agua (datos en color azul). Se observa que la actividad enzimática comenzó luego de 6 d de tratamiento y después se mantuvo en un rango entre 4 y 5 U/g, donde el valor máximo obtenido fue luego de 18 d de tratamiento biológico, siendo un valor de $4,85 \pm 0,36$ U/g. Posterior a este tiempo de cultivo, se observó una disminución de la actividad enzimática.

El segundo experimento realizado se presenta de color naranja (Figura 15), donde al alperujo utilizado se le han extraído los fenoles utilizando la mezcla de metanol/agua (1:1 %v/v). En este caso, se observa una línea recta paralela al eje x, debido a la baja actividad enzimática medida. El detalle se puede observar en la Figura 16, donde se presenta el cambio de escala correspondiente y se aprecia que la actividad enzimática no alcanzó un valor de 1 U/g, donde

la mayor actividad detectada fue de $0,038 \pm 0,002$ U/g luego de 6 d de tratamiento. Esta baja actividad enzimática se debe principalmente al uso del solvente metanol/agua ya que este es un solvente tóxico, además al utilizar este método de extracción se retiró una mayor cantidad de compuestos orgánicos solubles que en la primera condición, por lo tanto el hongo se encuentra con una menor cantidad de sustrato disponible lo que dificulta su crecimiento.

El tercer experimento en estudio se presenta en color verde (Figura 15), donde al alperujo utilizado sólo se le realizó el proceso de tratamiento térmico y sin la etapa de extracción de compuestos orgánicos. Es posible observar que la actividad enzimática comenzó luego de 6 d de tratamiento biológico y se mantuvo en un rango de 10 a 14 U/g, donde la máxima actividad enzimática fue de $12,87 \pm 0,84$ U/g luego de 21 d de tratamiento. Este resultado de actividad enzimática máxima es mayor que en los dos experimentos anteriores y se debe a que al alperujo no se le realizó la etapa de extracción de compuestos orgánicos, por lo que el hongo tiene disponible aquellos compuestos como azúcares y fenoles, que le permiten crecer y favorecen la expresión de enzimas, respectivamente.

En el cuarto experimento estudiado se presenta en color amarillo (Figura 15), donde al alperujo utilizado se le extrajeron los compuestos orgánicos utilizando agua destilada como solvente, pero antes de comenzar el tratamiento biológico se restituyó el azúcar removida durante la extracción siendo 138 mg/ml. Se observa que luego de 3 d de tratamiento biológico comenzó a aumentar la actividad enzimática llegando a un rango de 4 a 6 U/g, donde luego de 15 d se produjo la mayor actividad enzimática con un valor de $6,38 \pm 0,87$ U/g de alperujo. Estos resultados están dentro de lo esperado ya que la actividad enzimática máxima fue menor al tercer experimento que se muestra de color verde, donde no se le extrajeron los compuestos orgánicos al alperujo, pero es mayor que el primer experimento (color azul), donde sí se extrajeron los compuestos orgánicos. Esto se debe a que el hongo esta vez solo tiene azúcar disponible y no los otros compuestos orgánicos como lo son los fenoles, por lo que tiene una menor cantidad de sustrato disponible para alimentarse que en el tercer experimento.

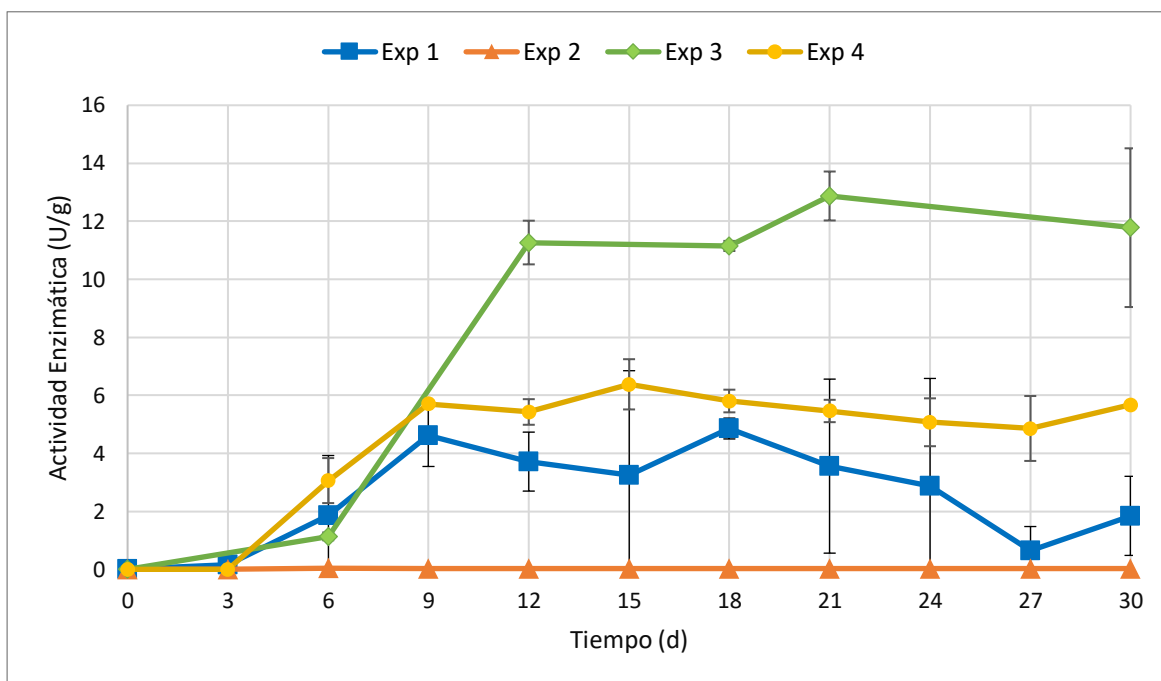


Figura 15. Actividad enzimática de lacasa para alperujo pretratado térmicamente y sometido a cuatro condiciones distintas de extracción de compuestos orgánicos.

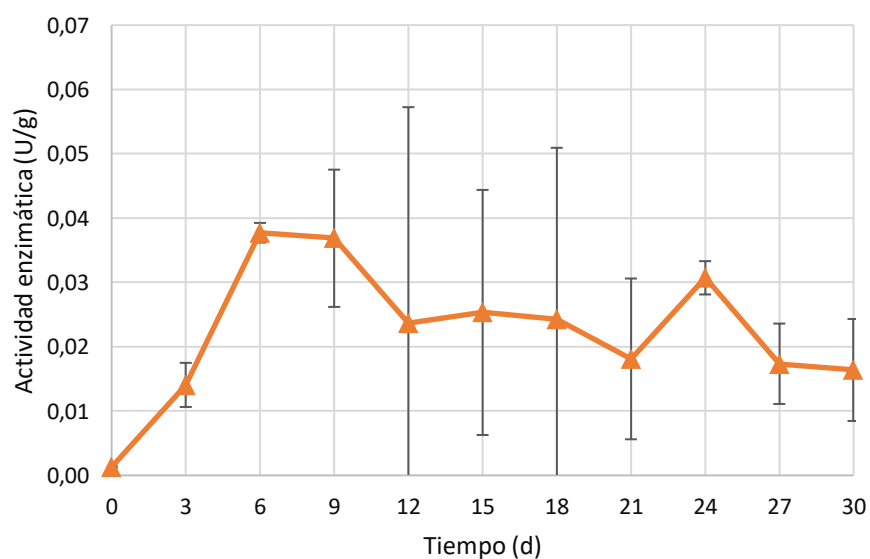


Figura 16. Actividad enzimática de lacasa en alperujo lavado con mezcla metanol/agua.

A continuación, se presentan valores máximos de actividad enzimática obtenidos para diferentes residuos reportados en la literatura (Tabla 3). El máximo valor que se obtuvo en este trabajo para el residuo alperujo fue de 12,87 U/g lo cual es mayor que los datos reportados en la literatura, por ejemplo en la paja de trigo donde se presenta el mayor valor

siendo 3,07 U/g se tiene que el valor obtenido de actividad enzimática máxima en este trabajo es 4 veces mayor que el de la paja de trigo, estas diferencias pueden deberse a los componentes de cada residuo, por ejemplo a la cantidad de humedad del residuo ya que el utilizado en este trabajo tiene una humedad del 68 % que puede ser mayor a la humedad del salvado de trigo o paja de trigo, también puede depender de la cantidad de material lignocelulósico, cantidad de compuestos solubles como los fenoles y pH.

Tabla 3. Actividad enzimática con diferentes residuos (García & Torres, 2003).

Sustrato	Valor máximo de actividad enzimática de lacasa
	U/g
Salvado de trigo	0,94
Tuza de mazorca	1,58
Bagazo de caña	0,11
Cereza de café	$3,61 \cdot 10^{-3}$
Cacota de cacao	$2,9 \cdot 10^{-3}$
Tamo de arroz	0,94
Paja de trigo	3,07

Finalmente se tiene que de los cuatro experimentos estudiados se obtuvo la máxima actividad enzimática en el tercer experimento (color verde) donde no se realizó la etapa de extracción de compuestos orgánicos con un valor de $12,87 \pm 0,84$ U/g, esto se debió a que en esta condición el hongo tenía una mayor disponibilidad y cantidad de compuestos orgánico tales como los fenoles y azúcares, los cuales son los principales sustratos del hongo.

En la Tabla 4 se presentan imágenes del hongo crecido sobre alperujo cuando se produjo la máxima actividad enzimática para cada condición de extracción de compuestos orgánicos estudiada.

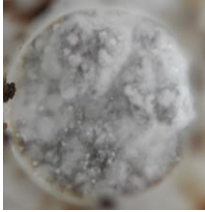
En el primer experimento se observa que luego de 18 d el hongo cubrió toda la superficie formando una capa de color blanco y esponjoso, este fue el momento donde se midió la mayor actividad enzimática. En esta condición se extrajeron los compuestos orgánicos utilizando agua como solvente, por lo que el hongo quedó con una menor cantidad disponible de sustrato por lo que su crecimiento fue más lento.

En el segundo experimento no se observó a simple vista el crecimiento del hongo, se aprecia solo el color inicial del alperujo. La actividad enzimática fue menor con respecto a los demás experimentos , y tiene relación a que se extrajeron los compuestos orgánicos usando la mezcla metanol/agua, por lo tanto como se dijo anteriormente este solvente inhibió el crecimiento del hongo y esto concuerda con la imagen que se muestra en la Tabla 4.

En el tercer experimento se observa el crecimiento del hongo luego de 21 d donde presenta pintas blancas en los bordes y no alcanzó a cubrir toda la superficie del residuo, se midió la mayor actividad enzimática de todos los experimentos, esto se debe a que en esta condición no se extrajeron compuestos orgánicos, así que el hongo cuenta con todos estos compuestos que están presentes en el residuo para alimentarse y crecer.

Finalmente, el cuarto y último experimento se observa el crecimiento del hongo que cubre por completo la superficie de color blanco a los 15 d de tratamiento donde se obtiene la mayor actividad enzimática, también se observa el crecimiento del hongo en aglomeraciones, esto se debe principalmente a que en esta condición se adicionó azúcar por lo que el hongo se encontraba con este sustrato disponible y listo para usar, así que es consumido rápidamente durante los primeros días de cultivo.

Tabla 4. Se muestra las imágenes del hongo *Trametes versicolor*, para cada experimento donde se midió la máxima actividad enzimática.

Experimento	1) Alperujo con extracción de compuestos orgánicos con agua	2) Alperujo con extracción de compuestos orgánicos con metanol/agua	3) Alperujo sin extracción de compuestos orgánicos	4) Alperujo con extracción de compuestos orgánicos con agua y adición de glucosa
Imagen				
Tiempo correspondiente a la máxima actividad enzimática (d)	18	6	21	15
Valor de máxima actividad enzimática (U/g)	$4,85 \pm 0,36$	$0,038 \pm 0,002$	$12,87 \pm 0,84$	$6,38 \pm 0,87$

Finalmente, se tiene que a una mayor concentración inicial de azúcares reductores mayor es el crecimiento del hongo, de manera que en el experimento 4 donde tiene una mayor concentración de azúcares reductores inicial el hongo cubrió por completo la superficie del matraz, formando aglomeraciones de color blanco y se veía más esponjoso.

Al comparar los resultados de fenoles totales (Figura 11) con los de actividad enzimática (Figura 15) se tiene que a partir de los 6 d de tratamiento que es donde se llegó al mínimo de concentración de fenoles totales coincide con el tiempo en donde comienza a aumentar la actividad enzimática, esto puede significar que en ese momento ya le queda una concentración mínima disponible al hongo por lo que este entra en un periodo de estrés al no encontrar la energía suficiente y comienza la expresión enzimática.

Finalmente, como se mencionó anteriormente en la sección 1.2.3. los fenoles presentan un efecto negativo sobre las poblaciones microbianas del suelo debido a su efecto fitotóxico e inhibición microbiana (Dermeche et al., 2013) por lo que debido a esto no se sabía cómo iba

a afectar la concentración de fenoles totales en este tratamiento biológico. El mayor valor de concentración de fenoles totales inicial que se midió en este tratamiento fue de 0,396 mg/g el cual no presentó efectos negativos al momento de realizar el tratamiento biológico ya que se logró el crecimiento del hongo y de producción de enzimas.

4.4. Biorefinería

En este trabajo se propuso una biorrefinería a partir de residuos de la industria olivícola a través de la extracción de compuestos fenólicos mediante un proceso de extracción donde se utilizó como solvente agua para continuar con un tratamiento biológico y producir enzimas como lacasa; sin embargo, para maximizar la producción de enzimas se recomienda extraer sólo una parte de los compuestos fenólicos para así lograr una mayor actividad enzimática.

Por lo que las biorrefinerías de residuos es un camino que se debe seguir para lograr una gestión de residuos sostenible, generando beneficios económicos como la recuperación de energía y productos de valor agregado, y beneficios ambientales como la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, ahorro de tierra, suelo y energía. Sin embargo, se tiene que analizar la disponibilidad de biomasa, la tecnología existente y la evolución del mercado, por lo que se requiere de una evaluación social, financiera, técnica y ambiental (Nizami et al., 2017).

5. Conclusiones

El pretratamiento térmico realizado al alperujo afectó en la concentración de fenoles extraíbles aumentando en un 50 % con respecto al alperujo no tratado, debido a la solubilización de estos compuestos.

La extracción de fenoles totales mediante solventes orgánicos se ve favorecida con la mezcla metanol/agua ya que se obtuvo una concentración de 4,33 mg/g, un 15 % más que utilizando agua como solvente, esto se debe a que la mezcla de metanol/agua hace que se solubilizan tanto fenoles hidrofílicos como lipofílicos.

Los azúcares reductores favorecen el crecimiento del hongo, debido a que con una mayor concentración de azúcares reductores se observó una mayor velocidad en el crecimiento del hongo.

La no extracción previa de compuestos orgánicos favorece la actividad enzimática con un valor mayor de 12,87 U/g, esto se debe a la presencia de compuestos fenólicos y azúcares reductores.

Se estudió una propuesta de biorrefinería olivícola a través de la extracción de fenoles los cuales son una fuente importante de antioxidantes por lo que es un producto de valor agregado, se propone un proceso de extracción de fenoles totales utilizando como solvente agua para continuar con un tratamiento biológico y producir enzimas como lacasa que se utilizan en la biorremediación de ambientes contaminados por compuestos tóxicos; sin embargo, para maximizar la producción de enzimas se recomienda extraer sólo una parte de los compuestos fenólicos para así lograr una mayor actividad enzimática.

6. Referencias

- Abdel-Hamid, A. M., Solbiati, J. O., & Cann, I. K. O. (2013). *Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications*. *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 82). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>
- Alburquerque, J. A., González, J., García, D., & Cegarra, J. (2006). Composting of a solid olive-mill by-product (“alperujo”) and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. *Waste Management*, 26(6), 620–626. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.04.008>
- Allothman, M., Bhat, R., & Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785–788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>
- American Public Health Association. (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Retrieved from http://www.fwspubs.org/doi/suppl/10.3996/082016-JFWM-068/suppl_file/10.3996082016-jfwm-068.s6.pdf
- Aranda, E., Sampedro, I., Ocampo, J. A., & García-Romera, I. (2006). Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 58(3–4), 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.006>
- Arenas Nemogá, S. A. (2019). *Extracción de compuestos fenólicos mediante el uso de disolventes orgánicos a partir del subproducto obtenido en la elaboración de aceite de oliva virgen (alperujo)*. Máster Universitario en Seguridad Industrial y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia.
- Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official Methods of Analysis*, 1(Volume 1).
- Barrera, A. (2016). *Estudio Comparativo De Pretratamientos Para Digestión Anaerobia Sobre El Residuo Agrícola Alperujo*. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico. Universidad Técnica Federico Santa María.
- BioPlat., SusChem., Ministerio de Economía., & Competitividad, I. y. (2017). Manual sobre Biorrefinerías en España. *Ministerio De Economía, Industria Y Competitividad*, 1–92.
- Blair, J. (2018). *Inmovilización de lacasa en residuos agroforestales y su posterior uso en biodegradación de oxitetraciclina*. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Químico, Universidad Técnica Federico Santa María.
- Bobadilla, E. A., Pereyra, O., Silva, F., & Stehr, A. M. (2005). Durabilidad natural de la madera de dos especies aptas para la industria de la construcción, 419–428.

- Caballero, A. S., Romero-García, J. M., Castro, E., & Cardona, C. A. (2018). Supercritical fluid extraction for enhancing polyphenolic compounds production from olive waste extracts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(2), 356–362. <https://doi.org/10.1002/jctb.5907>
- Camacho-Morales, R. L., Gerardo-Gerardo, J. L., Guillén Navarro, K., & Sánchez, J. E. (2017). Ligninolytic enzyme production by white rot fungi during paraquat (herbicide) degradation. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.004>
- Cazares Carrión, K. Y. (2016). *Recuperación de compuestos fenólicos mediante membranas de Nanofiltración . Efecto de la conductividad y la materia orgánica*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Chile Oliva. (2018). Informe anual mercado nacional de aceite de oliva. Retrieved December 20, 2019, from <https://www.chileoliva.cl/es/origen-chile/#tabEstadistica>
- Chile Oliva. (2019). El olivo en Chile. Retrieved December 20, 2019, from <https://www.chileoliva.cl/es/origen-chile/>
- Christoforou, E., & Fokaides, P. A. (2016). A review of olive mill solid wastes to energy utilization techniques. *Waste Management*, 49, 346–363. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.012>
- Consejo Nacional de Producción Limpia. (2012). Guía de mejores técnicas disponibles para la valorización del alperujo en la obtención de energía calórica para las operaciones de las plantas olivícolas.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532–1552. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>
- Díaz, D. (2009). Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida. *Bifurcations*, 45(1), 1–19. <https://doi.org/10.7202/1016404ar>
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Asatiani, M. D. (2018). Efficient production of lignin-modifying enzymes and phenolics removal in submerged fermentation of olive mill by-products by white-rot basidiomycetes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 134(April), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.08.003>
- Esther, M., Sanchez, M., Mendez, J., & Perez, F. (2005). Metodos fisicos de separacion y purificacion de sustancia organicas. *Univerisad de Las Palmas de Gran Canaria*, 52. Retrieved from <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA11FQO.pdf>

- Foods from Chile. (2015). Sustentabilidad sectorial Chile Oliva. Retrieved July 28, 2019, from www.foodsfromchile.org
- Forster-Carneiro, T., Berni, M. D., Dorileo, I. L., & Rostagno, M. A. (2013). Resources , Conservation and Recycling Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. “*Resources, Conservation & Recycling*,” 77, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2013.05.007>
- García, A., & Torres, R. (2003). Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Rev. Colomb. Biotecnol*, (June 2003), 56–64.
- Garrido, A. (2017). *Estudio comparativo de un pretratamiento biológico con tres hongos de putrefacción blanca sobre el residuo agrícola alperujo*. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico. Universidad Técnica Federico Santa María.
- Lafka Theodora-Ioanna, Andriana E. Lazou b, Vassilia J. Sinanoglou a, E. S. L. (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, 06(06), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.041>
- Lalak, J., Kasprzycka, A., Martyniak, D., & Tys, J. (2016). Bioresource Technology Effect of biological pretreatment of *Agropyron elongatum* ‘BAMAR’ on biogas production by anaerobic digestion. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 200, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.022>
- Lama-Muñoz, A., Rubio-Senent, F., Bermúdez-Oria, A., Fernández-Bolaños, J., Prior, Á. F., & Rodríguez-Gutiérrez, G. (2019). The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 55(May), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.05.009>
- Lama, A. (2011). Obtención de agentes antioxidantes a partir del alpeorujo para uso en la industria alimentaria.
- Lama Muñoz, A. (2011). Obtención y caracterización de compuestos y fracciones bioactivas a partir de alperujo tratado térmicamente . Estudio de un poderoso antioxidante natural (3 , 4-dihidroxifenilglicol , DHFG): propiedades y purificación industrial ., 285.
- Lenntech. (2020). Tecnología de membrana. Retrieved January 8, 2020, from <https://www.lenntech.es/tecnologia-de-membrana.htm>
- López-Rodríguez, C. L., Hernández-Corredor, R. A., Suárez-Franco, C., & Borrero Yoshida, M. L. (2008). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Universitas Scientiarum*, 13, 128–137.
- Mansour, A. (2015). Escuela De Ingenierías Industriales Departamento De Ingeniería Química Y Tecnología Del Medio Ambiente Tesis Doctoral: in Situ Lignocellulolytic

Enzyme Production By Solid State Fermentation.

- Márquez, S. C. (2003). Producción de lacasa a partir de hongos ligninolíticos utilizando vinazas y bagazo de origen mezcalero, 1–102.
- Meneses, R., & Cerda, G. (2016). Utilización de alperujo en la alimentación caprina.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moreno, J., López-Miranda, J., Gómez, P., Benkhalti, F., El Boustani, E., & Pérez-Jiménez, F. (2003). Efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen sobre la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad a la oxidación. *Medicina Clínica*, 120(4), 128–131. [https://doi.org/10.1016/s0025-7753\(03\)73624-0](https://doi.org/10.1016/s0025-7753(03)73624-0)
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2166–2174.
- Naranjo, J. (2016). *Evaluación de dos métodos para la obtención de extractos con actividad antioxidante a partir de gulupa (Passiflora edulis Sims.) con aplicación en productos mínimamente procesados*. Universidad de la Salle. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero de alimentos. Universidad de la Salle.
- Nizami, A. S., Rehan, M., Waqas, M., Naqvi, M., Ouda, O. K. M., Shahzad, K., ... Pant, D. (2017). Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Bioresource Technology*, 241, 1101–1117. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.097>
- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Merhautová, V., & Zervakis, G. I. (2015). Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi - Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. *Bioresource Technology*, 189, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.149>
- Obaya Abreu, M. C. (2005). La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. *Icidca*, XXXIX, 35–48. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120659006>
- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S., & Viniegra-gonzales, G. (1988). *Aspergillus niger*. *Journal Of Fermentation Technology*, 498–503.
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C. F. R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., ... Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153–1162. <https://doi.org/10.3390/12051153>
- Rincón, B., Bujalance, L., Feroso, F. G., Martín, A., & Borja, R. (2013). Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: Influence of thermal pretreatment

- on the process kinetics. *Bioresource Technology*, 140, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.090>
- 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, 1–6.
- Rover, M. R., & Brown, R. C. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366–371. <https://doi.org/10.1016/J.JAAP.2013.06.011>
- Ruiz, L. (2015). Nuevos métodos de extracción y fraccionamiento de carbohidratos bioactivos, 199.
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á. T., & Martínez, M. J. (2011). Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*, 102(16), 7500–7506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.027>
- Sánchez, Á. (2000). Transformación de subproductos de almazara en abono orgánico para su uso en agricultura ecológica. Retrieved August 10, 2019, from https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Calidad_Ambiental/Gestion_De_Los_Residuos_Solidos/compost/Transformacion_subproductos_almazara_abono_organico.pdf
- Segura, F. (2016). *Elaboración de una pasta untable, a partir del alperujo de oliva*. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Santiago.
- Serrano, A., Feroso, F. G., Alonso-Fariñas, B., Rodríguez-Gutierrez, G., Fernandez-Bolaños, J., & Borja, R. (2017a). Olive mill solid waste biorefinery: High-temperature thermal pre-treatment for phenol recovery and biomethanization. *Journal of Cleaner Production*, 148, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.152>
- Serrano, A., Feroso, F. G., Alonso-Fariñas, B., Rodríguez-Gutierrez, G., Fernandez-Bolaños, J., & Borja, R. (2017b). Phenols recovery after steam explosion of Olive Mill Solid Waste and its influence on a subsequent biomethanization process. *Bioresource Technology*, 243, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.093>
- Soto-García, M., & Rosales-Castro, M. (2016). Effect of solvent and solvent-to-solid ratio on the phenolic extraction and the antioxidant capacity of extracts from pinus durangensis and Quercus sideroxyla bark. *Maderas: Ciencia y Tecnologia*, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Tapia, F., & Astorga, M. (2003). Manual del cultivo del olivo. *Boletín INIA N°101*. Retrieved from <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBACL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=030545>
- Tsouko, E., Maina, S., Ladakis, D., Kookos, I. K., & Koutinas, A. (2020). Integrated

biorefinery development for the extraction of value-added components and bacterial cellulose production from orange peel waste streams. *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.108>

Ures, P., Jácome, A., & Suárez, J. (2015). Filtración en membrana y ósmosis inversa, 1–35.

Usaquen, S. M. (2008). *Aprovechamiento y valorización del alpeorajo tratado termicamente como: fertilizante biológico y fuente de hidroxitirosol*. *Cell*. Trabajo de grado para optar al título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>

Vlyssides, A. G., Loizides, M., & Karlis, P. K. (2004). Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*, 12(6), 603–611. [https://doi.org/10.1016/S0959-6526\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0959-6526(03)00078-7)

Anexos

A. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de varianzas de un factor utilizando Excel como herramienta, en la Figura 17 se muestra el resultado obtenido para estudiar la significancia que tiene el pretratamiento térmico en el contenido de fenoles totales.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Sin pretr	2	3,637096774	1,818548387	0,02772633		
Con pretr	2	5,471370968	2,735685484	0,01268413		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,841140454	1	0,841140454	41,629837	0,02318896	18,51282051
Dentro de los grupos	0,040410461	2	0,020205231			
Total	0,881550915	3				

Figura 17. Análisis de varianzas de un factor.

Del análisis se obtiene que la probabilidad es 0,02318 la cual es menor a 0,05 por lo que las diferencias son significativas, además el parámetro F es 41,62 por lo que es mayor al F crítico entonces las diferencias son significativas.