

DESARROLLO DE BIOPROCESOS PARA LA CONVERSIÓN DE RESIDUOS OLEOSOS EN AGENTES DE SUPERFICIE

Programa de Doctorado en Química



TESIS DOCTORAL 2016

Ignacio Moya Ramírez

Directores

Encarnación Jurado Alameda

Miguel García Román

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ignacio Moya Ramírez
ISBN: 978-84-9125-858-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43687>

El doctorando Ignacio Moya Ramírez y los directores de la tesis Encarnación Jurado Alameda y Miguel García Román. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 7 de Enero de 2016

Director/es de la Tesis



Fdo.: Encarnación Jurado Alameda

Miguel García Román



Doctorando



Fdo.: Ignacio Moya Ramírez

Agradecimientos

Al pensar en estos cuatro años de trabajo, me doy cuenta de lo afortunado que he sido en muchos aspectos.

Desde el punto de vista laboral, he tenido la suerte de poder disfrutar de un trabajo que me apasiona y que, a pesar de los agobios que siempre trae asociados, me ha permitido realizarme profesionalmente. Mi agradecimiento, por tanto, a mis directores de tesis y a las instituciones públicas que me han dado la oportunidad de disfrutar de él. Pero más afortunado me siento aún de haber compartido este tiempo con compañeros del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada y de la Escuela de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Ulster. Profesores, doctorandos y estudiantes de los cuales he aprendido todo lo que en su momento me hará “merecedor del título de doctor”, y que sobre todo me han enseñado ciencia y vida. ¡Muchas gracias a todos!

Desde el punto de vista personal también hay muchas personas a las que quiero reconocer y agradecer todo lo que me han dado. Me gusta pensar que parte de ellas está reflejada en mi tesis, de la misma manera que lo está en mi forma de ser y hacer. Gracias a mi familia y amigos, por acompañarme, guiarme en mis inseguridades, celebrar conmigo y enseñarme. Gracias por quererme. ¡Os correspondo!

Índice

1. Summary	1
1.1. Introduction, aims and objectives.	1
1.2. Main results and discussions.	4
1.2.1. WFO enzymatic hydrolysis in W/O emulsions systems.....	4
1.2.2. WFO enzymatic hydrolysis in a reverse micellar system	7
1.2.3. OMW as carbon source for biosurfactant production	9
1.2.4. Effect of OMW hydrolysis on biosurfactant production	11
1.3. Conclusions	13
2. Introducción	15
2.1. Residuos derivados de la industria oleícola. Producción y riesgos medioambientales	15
2.1.1. Alpeorujo	17
2.1.2. Aceites residuales	23
2.2. Valorización de los residuos oleícolas por bioconversión en productos con actividad interfacial.	24
2.2.1. Uso del alpeorujo como fuente de carbono para la obtención de biosurfactantes	25
2.2.2. Producción de ácidos grasos, mono y diglicéridos a partir de aceites usados.	30

2.3. Objetivos	34
3. Materiales y métodos	37
3.1. Materiales	37
3.1.1. Aceites.....	37
3.1.2. Alpeorujo	38
3.1.3. Enzimas	39
3.1.4. Bacterias.....	39
3.1.5. Reactivos.....	40
3.2. Caracterización de las lipasas.....	40
3.2.1. Determinación del contenido proteico de los preparados comerciales.	40
3.2.2. Ensayos actividad lipásica	41
3.2.3. Medida de la actividad enzimática en función del pH del medio y de la concentración de enzima	45
3.3. Hidrólisis enzimática de aceite	47
3.3.1. Emulsiones O/W	47
3.3.2. Micelas inversas.....	52
3.3.3. Determinación colorimétrica de los FFA.....	54
3.3.4. Identificación y cuantificación de MAG, DAG y TAG mediante UPLC/MS	55
3.4. Producción de biosurfactantes.....	58
3.4.1. Cultivos	58
3.4.2. Hidrólisis del alpeorujo	59
3.4.3. Procesado del caldo de cultivo.....	61
3.4.4. Extracción del biosurfactante.....	61

3.4.5. Medida de los azúcares disueltos totales.....	62
3.4.6. Medida de los fenoles totales	63
3.4.7. Identificación y cuantificación de los biosurfactantes obtenidos mediante UPLC/MS	64
4. Resultados y discusión	67
4.1. Hidrólisis enzimática de aceite usado en emulsiones O/W	68
4.1.1. Optimización de las condiciones de emulsificación	69
4.1.2. Efecto de la concentración de enzima	75
4.1.3. Efecto del pH.....	78
4.1.4. Hidrólisis enzimática de aceite usado en emulsión O/W. Estudio de la distribución de productos.....	79
4.2. Hidrólisis enzimática de aceite usado en micelas inversas	84
4.2.1. Estudio de fases	84
4.2.2. Efecto de la relación agua/tensioactivo sobre el grado de hidrólisis	86
4.2.3. Efecto de la fracción de aceite sobre el grado de hidrólisis	88
4.2.4. Efecto de la concentración de enzima	90
4.2.5. Hidrólisis enzimática de aceite usado en emulsión W/O. Estudio de la distribución de productos.....	91
4.3. Viabilidad del uso de alpeorujo como fuente de carbono para la producción de biosurfactantes	94
4.3.1. Efecto del tipo y concentración de la fuente de carbono	94
4.3.2. Estudio cinético de producción de biosurfactantes usando alpeorujo como única fuente de carbono.....	101
4.3.3. Importancia del aceite residual del alpeorujo en la producción de biosurfactante.....	102

4.3.4. Efecto inhibitorio del alpeorujó sobre el crecimiento microbiano y la producción de biosurfactante	103
4.4. Hidrólisis del alpeorujó como método para la mejora en la producción de biosurfactantes	106
4.4.1. Efecto de la hidrólisis previa del alpeorujó sobre los azúcares solubles y la producción de biosurfactantes	106
4.4.2. Estudio cinético de producción de biosurfactantes a partir de alpeorujó hidrolizado. Comparación con la glucosa como fuente de carbono...	110
4.4.3. Efecto de la concentración de alpeorujó hidrolizado. Comparación con el alpeorujó crudo.	113
4.4.4. Presencia de fenoles en el medio de cultivo. Análisis de su influencia sobre el crecimiento microbiano y la producción de biosurfactantes.	115
5. Conclusiones	121
6. Bibliografía	127
7. Anexos	145

1. Summary

This section will summarize the main results, discussion and conclusions of the Thesis.

1.1. Introduction, aims and objectives.

The aim of this Thesis is to explore new approaches to valorise and recycle wastes coming from oil industry, focusing on waste frying oil (WFO) and olive mill waste (OMW).

Vegetable oils are used worldwide in both industrial and domestic cooking operations. According to FAO, up to 150 million tons of vegetable oils were produced in 2013. Therefore, high amounts of the so-called waste frying oils are expected to be generated. For example, it is estimated that only in the EU, around 3.55 million tons of waste vegetable oils are produced annually (Biodienet project, 2009). Additionally to the high amounts generated, it should be taken into account that these wastes are usually produced in small amount at very disperse locations, hindering an appropriate disposal. Discarding WFO together with the urban wastewaters could give rise to

serious problems for its eventual treatment at dedicated facilities, which represents a threat to the environment (Cammarota and Freire, 2006; Li and Wrenn, 2004). Therefore, it is mandatory a full process for the collection, transport and recycling of these wastes.

Nowadays the main application of WFO is as raw material for the production of second generation biofuels. It is a well-established process, which solves some concerns related to the usage of food grade oils in the production of fuels. But there are still some handicaps linked to this process, especially as regards to the economic viability and the problems caused by impurities present in the oil (Subbiah and Zwol, 2014; Zhang, 2003).

Another possible approach for the valorization of WFO is the production of partial glycerides (mono- and diacylglycerols, MAG and DAG) and free fatty acids (FFA), substances with numerous applications. FFA and its derivatives (such as soaps, esters, alcohols or amides) can be used as emulsifiers, detergents, lubricants or stabilizers in numerous products and processes (Anneken et al., 2000). Furthermore, partial glycerides are the most widely used synthetic emulsifiers in food and dairy industry.

At large scale FFA are traditionally obtained by hydrolysis of fats and oil at high temperatures and pressures (Anneken et al., 2000). Partial glycerides production is usually accomplished by oil glycerolysis in the presence of alkaline catalysts or esterification of fatty acids, involving high temperatures and pressures again (Hasenhuettl and Hartel, 2008). These extreme conditions give rise to the formation of undesired by-products, additionally to the high operating costs required on this kind of facilities.

Alternatively, both aforementioned reactions can be catalyzed by lipases. The usage of these bio-catalysts implies lower energy requirements due to its mild reaction conditions. Furthermore, lipases poses excellent specificity and selectivity. Because of these clear advantages, processes involving oils modifications by means of lipases are well studied. Nonetheless, several issues must be addressed before this alternative become technically and economically viable. In this regard WFO could play important role, since they are a cheap feedstock.

Therefore the objective of the first section of the Thesis is to assess the feasibility of an enzymatic hydrolysis of WFO in two different systems: (i) an oil in water (O/W) emulsion and (ii) a reverse micellar system, trying to find meaningful differences between the use of food grade commercial oils and WFO in both systems, and analyzing the advantages and disadvantages of each one.

The other waste derived from oil industry which will be considered in this Thesis is olive mill waste. This waste is produced during the extraction of the olive oil by the two-phase process. It is a paste-like material which represents around the 80% of the fruits (Sampedro et al., 2007) and is composed by everything in the olive except the extracted oil. OMW is rich in lignocelluloses, water, residual oil and phenols. These last substances have phytotoxic and microbial inhibitory properties which can hinder further processing or recycling steps (Sampedro et al., 2005; Saparrat et al., 2010).

Despite of these risks, OMW has potential as feedstock due to its high amount of organic matter. Until the date, it has been used for the extraction of high added value compounds like tyrosol and hydroxytyrosol (Fernández-Bolaños et al., 2002), in composting (Siles et al., 2014), as animal feeding (Brozzoli et al., 2010), or in biotransformation processes like the production of second generation bioethanol (Abu Tayeh et al., 2014; Haagensen et al., 2009).

Unfortunately, any of these approaches seemed to be successful. For this reason, more efforts are necessary to find an appropriate end use for this waste. Taking into account that OMW contains residual oil (which has not been extracted in the primary processing) and is also rich in cellulose and hemicellulose, it is worth considering its use as carbon source in fermentative processes.

Consequently the objective of the second section of the Thesis is to analyze the suitability of OMW as carbon source in the production of two biosurfactants: rhamnolipids and surfactin. OMW concentration, residual oil content or kinetics of the process were examined. Furthermore, the convenience of a hydrolysis pretreatment of OMW was analyzed. Additionally, its behavior was compared with other conventional carbon sources (such as glycerol or glucose) in order to explore whether OMW could be a potential replacement of these traditional carbon sources.

It should be remarked that this approach has hardly been explored, with the exception of Mercadé et al., (1993), who used olive mill wastewaters for biosurfactant production, but not OMW.

1.2. Main results and discussions.

1.2.1. WFO enzymatic hydrolysis in O/W emulsions systems

Initially, emulsification conditions were optimized by means of an experimental design with three factors and three levels. The effect of volume fraction of the oil phase (Φ), surfactant to oil ratio (S, mg/mL) and the amount of energy applied per unit volume of oil phase (E, J/mL) on the stability and the specific interfacial area of the emulsions were studied. Additionally the performance of two emulsifiers, Glucopon 600 (G600) and gum arabic (GA) was analyzed.

The specific interfacial area of emulsions (a) was calculated using the average droplet diameter (Sauter diameter, $d_{3,2}$) and the volume fraction of dispersed phase, Φ , (Eq. 1.)

$$a = \frac{6\Phi}{d_{3,2}}, \text{ cm}^2/\text{mL} \quad (1)$$

Emulsion stability was evaluated through short-time stability index, which was considered as the ratio of the back scattering (BS) of an emulsion sample at 15 minutes to its initial value, as indicated in Eq. 2. Obviously, a higher SI indicates a more stable emulsion.

$$SI = \frac{BS(15 \text{ min})}{BS(0)} \quad (2)$$

Table 1-1 summarizes whether each parameter affected each response and in which way (positive or negative). An increase in the short time stability or in the specific interfacial area were considered as a positive effects on these two responses.

Table 1-1. Effect of the three studied factors and their interaction over specific interfacial area (a) and stability index (SI): (+) means positive effect, (-) negative and (N.S.) non-significant effect. Results obtained for GA and G600 as emulsifiers.

Factor or interactions	GA-a	GA-SI	G600-a	G600-SI
Φ	+	+	+	+
S	+	N.S.	+	-
E	N.S.	N.S.	N.S.	+
$\Phi \cdot S$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
$\Phi \cdot E$	N.S.	N.S.	N.S.	-
$S \cdot E$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

After analyzing the effect of each parameter, the following emulsification conditions were selected: $\Phi=0.15$, $S=100$ mg/mL for GA and 20 mg/mL for G600 and $E=1000$ J/mL.

Besides the information gathered in Table 1-1, it is worth noting that all the emulsions underwent destabilization by creaming; but only the ones prepared with GA and at high Φ values exhibited an initial delay period, where no destabilization took place. This phenomenon has been previously described in polymer-stabilized emulsions at high initial oil volume fraction, where the emulsion forms a single network structure (Robins, 2000). This delay period could be an advantage over G600, because it allows starting the hydrolysis reaction without any change in the prepared emulsion. On the other hand, interfacial areas obtained with G600 were up to three times higher than those achieved with GA, which means more available surface for enzyme adsorption.

In order to select the most suitable emulsifiers, hydrolysis experiments were carried out with emulsions prepared at the best conditions found for both of them. Result showed that higher hydrolysis degrees were attained when using GA, while G600 seems exert an inhibitory effect on lipase action, like other anionic surfactants (Jurado et al., 2011; Yao et al., 2013).

Therefore GA was selected to prepare O/W emulsions for further hydrolysis experiments. Three different substrates were used: a control mixture containing food grade vegetable oils (CM) and two wastes oils (WFO-1 and WFO-2). Additionally, the effects of pH, the presence of Ca^{2+} ions and the use of three different lipases, i.e., a fungal lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL); a bacterial one from

Pseudomonas fluorescens (PFL); and one from animal origin, porcine pancreas lipase (PPL), were analyzed.

Figure 1-1-a summarizes the main results of these hydrolysis experiments. As can be observed, highest hydrolysis degrees were obtained with TLL at pH 8. At pH 10 the presence of Ca^{2+} is required in order to remove hydrolyzed FFA, which adsorb at the droplets interface and block the lipase action, in the same way that another anionic surfactant as previously reported (Jurado et al., 2011; Skagerlind et al., 1995). In addition, Ca^{2+} ions were detrimental to PPL activity, decreasing reaction extent to almost a half in their presence, whatever the substrate used. Despite of their lower hydrolysis degrees, PFL and PPL showed only small differences between the control mixture and WFO, while when using TLL these differences were higher.

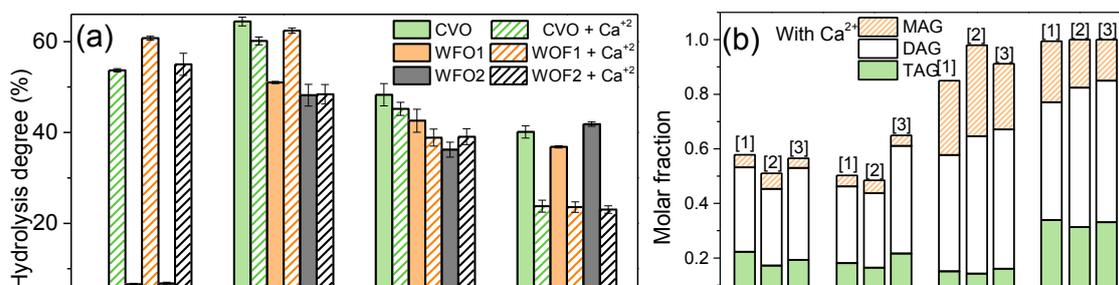


Figure 1-1. (a) Reaction extent (expressed as percentage of hydrolyzed ester bonds) after 8h of hydrolysis, for the different enzymes and substrates tested, with or without of Ca^{2+} ions. (b) Molar fraction of different glycerides after at 8 h of hydrolysis for the different enzymes and substrates tested, with Ca^{2+} ions. [1] Control mixture; [2] WFO-1 and [3] WFO-2.

Another important factor to take into account is glyceride distribution, because DAG and MAG are the most valuable hydrolysis products. In this respect, as can be observed in Figure 1-1-b, TLL almost fully hydrolyzed TAG into FFA and glycerol, while PFL and PPL yielded higher amounts of DAG and MAG.

In view of these results PFL and PPL would be more appropriate for the production of these partial glycerides. With these enzymes, only negligible differences were observed between control and waste oils in the glyceride distribution. Therefore, these results confirm that WFOs can be suitable substrates for lipase hydrolysis, in the same way that vegetable oils.

1.2.2. WFO enzymatic hydrolysis in a reverse micellar system

Hydrolysis of WFO was similarly conducted in an O/W microemulsion, also known as reverse micelles. In this case water domains, of the size of a few nanometers and in which enzymes are located, is stabilized by a surfactant (AOT) dispersed in a continuous apolar phase, composed by a mixture of a solvent (iso-octane) and oil (CM or WFO). These systems presents some advantages over W/O emulsions, such as they are thermodynamically stable and require a little amount of energy for their preparation.

The pseudo ternary phase of the water/oil/iso-octane system was studied at a constant AOT concentration. Three different region were detected: (i) an isotropic phase in which microemulsion (ME) is formed; (ii) a transition region or bluish transparent nanoemulsion (BTE); and (iii) a multiphase region in which the amount of added water could not be located inside the AOT micelles. The fraction of water solubilized in ME region never exceeded the 8%. Furthermore, as can be observed in Figure 1-2, ME region decrease with the increase of oil volume fraction in the organic phase, and no isotropic phase was formed at values higher of 65%.

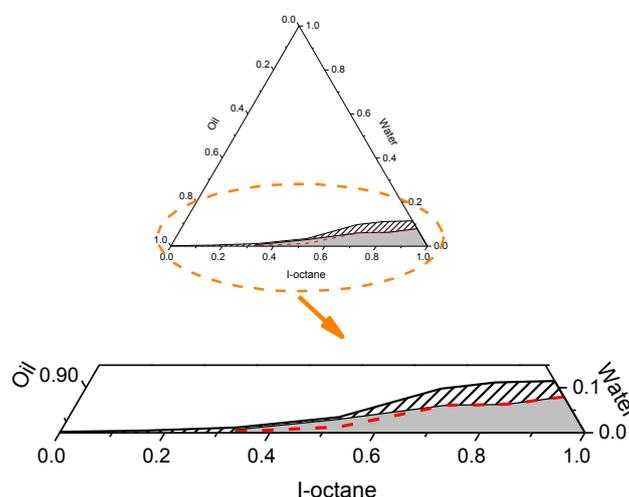


Figure 1-2. Isooctane/water/oil pseudo ternary phase diagram, at AOT=50 mM. The grey area represents the microemulsion region (isotropic phase) for waste oils WO1 and WO2. The dashed red line delimitates the isotropic region for CM. The dashed area corresponds to a bluish transparent multiphase solution for the three oils, and the white area represents the multiphase region.

Interestingly, the ME region obtained with both waste oils was wider than the corresponding for the control mixture. This is probably due to higher amounts of

FFA, MAG and DAG in the waste oils, which may contribute to stabilize the microemulsion (Polizelli et al., 2006). This extension of ME region is a clear advantage of waste oils over food grade ones.

The molar ratio between water and AOT (W_0) is a key factor in these systems (Franqueville et al., 2003; Han and Rhee, 1985), thus its influence on the hydrolysis extent was analyzed. The results of these experiments are summarized in Figure 1-3. As can be observed, a maximum hydrolysis degree appeared at W_0 values around 13.3, independently of the kind of oil used. This maximum was also observed at oil volume fraction of 10 and 80 %. This optimum correspond to a certain amount of dispersed water that makes the size of the micelle similar to that of the enzyme (Klyachko and Levashov, 2003). Whereas, at lower and higher W_0 values, several effects undermine lipase activity (Carvalho and Cabral, 2000; Luisi et al., 1990; Naoe et al., 2004).

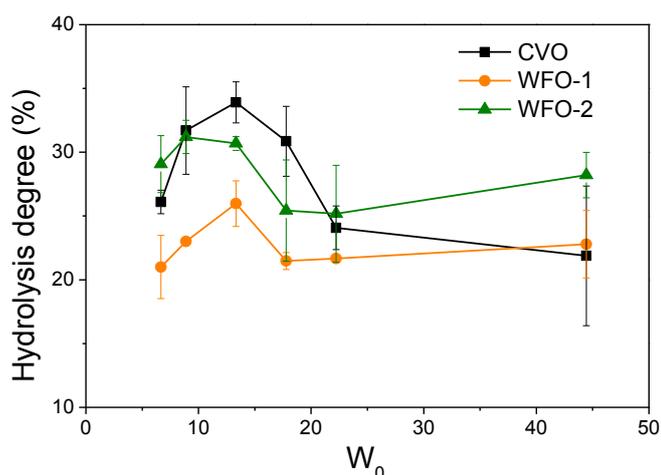


Figure 1-3. Reaction extent, as a function of the water/surfactant molar ratio, W_0 , for CM and waste oils (WFO-1 and WFO-2) and 20 % of oil volume fraction in the organic phase.

W/O reverse micelles enable using higher concentrations of the oily substrate, while in O/W emulsion this parameter has more restrictions. However, the hydrolysis extent is expected to be limited at high values. For this reason, oil volume fraction in the apolar phase was increased until 100%, and its effect over hydrolysis extent was studied. Remarkably, hydrolysis took place in all the range between 10 and 100 % of oil in the continuous phase. A maximum in the amount of hydrolyzed ester bond was reached around 60-80%, but if considering the hydrolysis extent it constantly

decreased with the increase in the oil fraction. Similar results were reported by (Tsai and Chiang, 1991). This effect can be attributed to the release of FFA and MAG, substances which tend to accumulate in the interface, hindering lipase activity, and to de fact that no ME was formed at high oil volume fractions. In this case, a 20% of oil can be considered to meet both requirements of enabling the formation of the microemulsion and yielding high enough reaction conversions. Again, quite similar results were obtained with the control mixture and both WFOs, confirming the suitability of using waste oils for enzymatic hydrolysis in these systems too.

Product distribution was also studied. Figure 1-4 shows the results obtained for WFO-2. As can be observed, the amount of DAG remained almost constant with time. Taking into account that TAG were reduced in almost a 40%, this result suggest that DAG were further hydrolyzed to MAG. Additionally, unlike in O/W emulsions, a major fraction of MAG produced were also hydrolyzed. More accurately, a molar balance revealed that up to a 95 % of the produced MAG were further hydrolyzed when using TLL, and an 84% for PFL. Therefore the results indicates that this reaction system is more convenient for FFA production, while O/W emulsions are more suitable for the production of MAG and DAG.

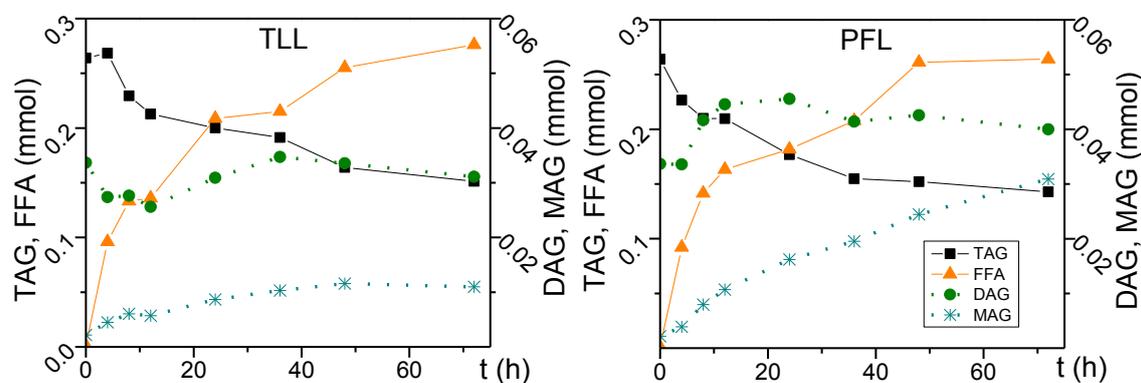


Figure 1-4. Product distribution during WFO-2 hydrolysis with TLL and PFL. Reaction conditions: $\Phi=0.2$; enzyme concentration: 0.2 g/L (referred to the bulk phase); reaction volume: 1.25 mL; AOT concentration: 50 mM; $W_0=13.3$; $T=37^\circ\text{C}$.

1.2.3. OMW as carbon source for biosurfactant production

As mentioned above, the objective of the second section of the Thesis is to explore whether OMW is suitable as sole carbon in a fermentation process for biosurfactant

production. Submerged culture of two bacterial species, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, were tried. In a first step, this hypothesis was confirmed, comparing the yield for OMW with those obtained with other carbon sources: glycerol and waste frying oil. Furthermore, parameter such as OMW concentration, residual oil fraction in OMW and kinetics were examined.

Analysis of cellular growth and surface tension of cultures suggested that both strains have the ability of growing and producing biosurfactant using OMW. Data obtained from UPLC-MS analysis confirmed this hypothesis, showing how *P. aeruginosa* yielded rhamnolipids and *B. subtilis* surfactin. Figure 1-5 summarizes the yields obtained for each strain and carbon source. *P. aeruginosa* yields were meaningfully higher than *B. subtilis* ones, being glycerol the most suitable carbon source for both of them. Biosurfactant production can be considered satisfactory for *P. aeruginosa*, while *B. subtilis* produced very low amounts of surfactin with this carbon source.

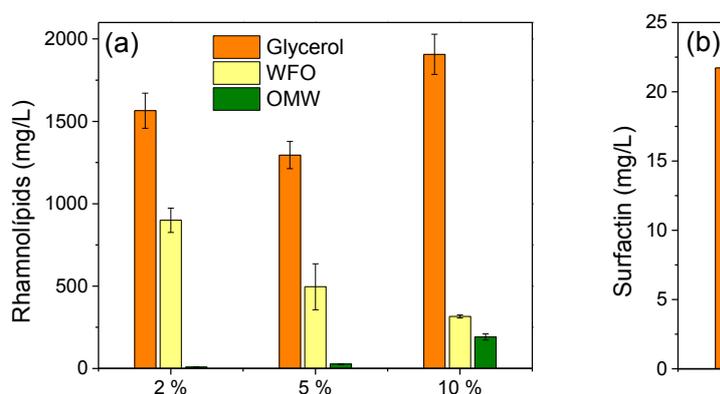


Figure 1-5. Influence of carbon source (glycerol, waste frying oil and oil mill waste) and its concentration (2%, 5% and 10% w/v) on rhamnolipids and surfactin yield for (a) *P. aeruginosa* and (b) *B. subtilis* cultures respectively.

The best conditions found using OMW were concentrations of 10% and 2% w/v for *P. aeruginosa* and *B. subtilis*, which yielded 191.46 mg/L of rhamnolipids and 3.12 mg/L of surfactin respectively. It is interesting to note the effect of OMW concentration in both strains: while *P. aeruginosa* increased rhamnolipid production with OMW concentration, *B. subtilis* showed the opposite trend. This effect suggests an inhibitory effect of OMW over surfactin production. Actually, there are reports of antimicrobial activity of phenols found in OMW (Obied et al., 2005; Perez et al.,

1992). *P. aeruginosa*, which is a Gram-negative strain, seems to be more resistant to this kind of compounds (Moreno et al., 1990).

However, OMW exerted an inhibitory effect over both strains. This was confirmed when using OMW together with glycerol as carbon sources. As shown in Figure 1-6-a, when adding OMW to a fixed amount of glycerol, biosurfactant yield decreased. This result demonstrates that this inhibitory effect takes place with both strains. Therefore, in order to develop an optimal BS production process, the use of more phenol-resistant strains or phenol removal should be contemplated.

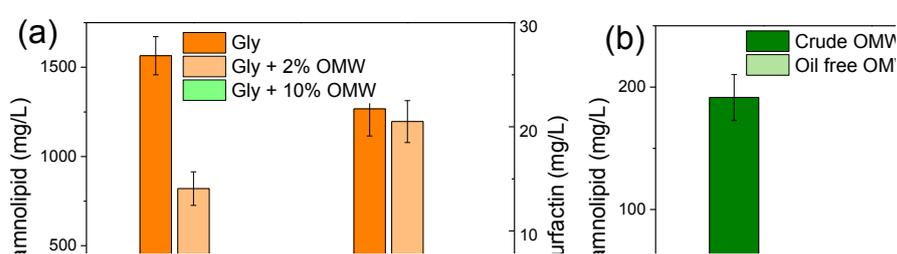


Figure 1-6. Rhamnolipids and surfactin yield with *P. aeruginosa* and *B. subtilis* cultures respectively, (a) for different combinations of glycerol and OMW and (b) with crude and oil free OMW at 10% for *P. aeruginosa* cultures and 2% for *B. subtilis*.

In addition, residual oil fraction showed to be the main carbon source involved in biosurfactant production, as confirmed when extracting it from crude OMW (Figure 1-6-a). The small amount of biosurfactant produced with oil free OMW were attributed to free sugars on it, which could be an available and easy carbon source to incorporate. However, this hypothesis needs further investigation.

1.2.4. Effect of OMW hydrolysis on biosurfactant production

The effectiveness of conducting a hydrolysis pretreatment of OMW prior to the fermentation step, was evaluated as a possible approach to optimize biosurfactant production. The purpose was to enhance the bioavailability of the cellulose and hemicellulose fraction present in this waste.

Three hydrolysis methods were assayed, i.e., acid hydrolysis (AH), enzymatic hydrolysis (EH) and acid pretreatment followed by enzymatic hydrolysis (PEH). All

of them effectively increased the total soluble sugar concentration between 3 and 4 times the initial value. Therefore, the bioavailability of carbon sources on OMW increased, which gave rise to a considerable enhancement in biosurfactant production (with the exception of AH in *P. aeruginosa* cultures). Despite being the pretreatment which released less amount of sugars, EH yielded the highest BS amounts, whereas AH generated the lowest one. The lower titres reached after both pretreatments which involved the usage of acid could be due to the formation of furfurals and hydroxymethylfurfurals, as suggested by Marin et al. (2015).

Comparing the results obtained with EH with those of crude OMW (at the same three concentrations), this pretreatment considerably enhanced the biosurfactant yield in all the conditions and for both bacterial species (Figure 1-7). In relative terms, EH supported a greater improvement in surfactin production, although biosurfactant production was enhanced for both microorganisms. Again, the maximum yield of rhamnolipids in *P. aeruginosa* cultures took place with 10 % of EH-OMW. However *B. subtilis* showed a different pattern when growing on this pretreated waste, since the highest surfactin yield was achieved at 5%, instead of 2 %. This different behavior suggests that, to a certain extent, the increase in the bioavailable sugar concentration reduced the inhibitory effects of OMW on surfactin production by *B. subtilis*.

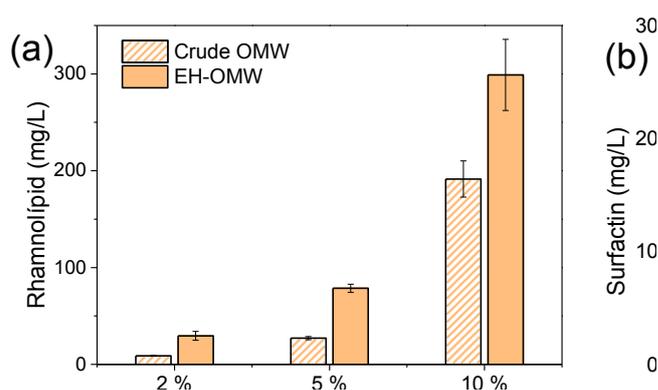


Figure 1-7. Effect of concentration (% w/v) of EH-OMW (colored bars) and crude OMW (patterned bars) on rhamnolipid and surfactin production (mg/L in the culture media) by (a) *P. aeruginosa* and (b) *B. subtilis*.

Another key factor is the kinetics of the fermentative process. Enzymatic hydrolysis of OMW significantly accelerated the rhamnolipid and surfactin production. When growing on crude OMW *P. aeruginosa* reached the maximum rhamnolipid concentration after 196 hours of culture and *B. subtilis* after 144 hours, while when

using HE-OMW the same strains lasted 24 and 96 hours respectively. This improvement could support the feasibility of a large scale production process using OMW as carbon source. Therefore, the usage of OMW as carbon source will entail the production of high added value substances from a waste product, and the avoidance of some of the environmental problems that OMW generates. Furthermore, EH-OMW is comparable to glucose in terms of biosurfactant production (Figure 1-8).

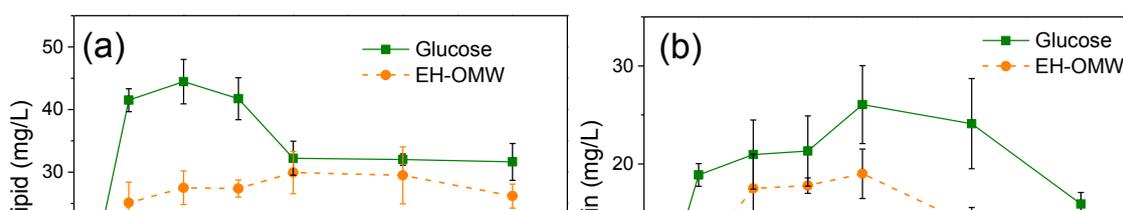


Figure 1-8. (a) Rhamnolipid and (b) surfactin concentrations vs culture time, with glucose or HE-OMW as carbon source.

1.3. Conclusions

Both research lines followed in this Thesis gave rise to positive results regarding the development of new approaches to take advantage of wastes derived from the oil industry.

Oil in water emulsions and reverse micellar systems showed to be suitable reaction mediums to perform the enzymatic hydrolysis of WFO. The most remarkable result is that no meaningful differences were observed between food grade and waste oils in all the experiments conducted. Thus, waste frying oils could be a suitable raw material for the production of valuable products such as FFA, MAG and DAG, in the same way that food grade oils. When comparing both emulsion system, O/W showed to be more suitable for MAG production whereas W/O microemulsions are more appropriate for FFA production.

In the other research line it was demonstrated that OMW can be a potential carbon source for biosurfactant production. Two bacterial strains: *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* effectively produced surfactin and rhamnolipid respectively, using OMW as the sole carbon source. *P. aeruginosa* yielded higher biosurfactant amounts and showed more resistance to phenols inhibitory effect.

Different parameters were analyzed aiming to develop a more efficient production process. Residual oil fraction was revealed as the main carbon source in crude OMW. Moreover, a hydrolysis pretreatment increased the bioavailability of cellulose and hemicellulose fraction in OMW, which drastically increased biosurfactant production. Among the three assayed hydrolysis pretreatments, enzymatic hydrolysis showed to be the most suitable one to enhance biosurfactant production. Taking together, these results constitute a first step towards the development of a large scale production of biosurfactant using OMW, achieving two important objectives: the recycling of a waste that is difficult to process, and the production of high added value chemicals.

2. Introducción

2.1. Residuos derivados de la industria oleícola. Producción y riesgos medioambientales

Los aceites vegetales constituyen un elemento esencial para la alimentación humana. Su uso está extendido por todo el mundo tanto a nivel doméstico como industrial. Según la FAO, la ingesta de grasas debe suponer entre un 20 y un 35 % del aporte energético en una dieta equilibrada (Elmadfa y Kornsteiner, 2009); siendo necesario como mínimo un 15% para asegurar el aporte de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles (Jéquier, 1999). Además, este organismo recomienda consumir preferentemente grasas insaturadas, presentes mayoritariamente en aceites de pescados y aceites vegetales, frente a las saturadas, que abundan en las grasas animales así como en alimentos procesados, comida rápida o margarinas por ejemplo (FAO, 2008).

La producción anual de aceites vegetales ha aumentado de manera continuada en las últimas décadas, alcanzando en 2013 un valor superior a las 150 millones de toneladas (Figura 2-1). A nivel mundial, los aceites producidos en mayor cantidad son los de palma, soja, colza y girasol. Sin embargo, su distribución varía notablemente de

una región a otra del planeta, como muestra la Tabla 2-1. Más específicamente, en España la industria de grasas y aceites tiene un peso muy importante, representando un 9.35 % del volumen de ventas dentro del sector de alimentación y bebidas (Muñoz Ciudad y col., 2013). A su vez, España posee la peculiaridad de ser el principal productor de aceite de oliva a nivel mundial, acaparando un 40 % de la producción (Tabla 2-1). A diferencia de otros países en los que este aceite apenas es usado, en España es el empleado con más frecuencia. Por ejemplo, según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en 2014 supuso el 69.5 % del consumo (Gobierno de España, 2015).

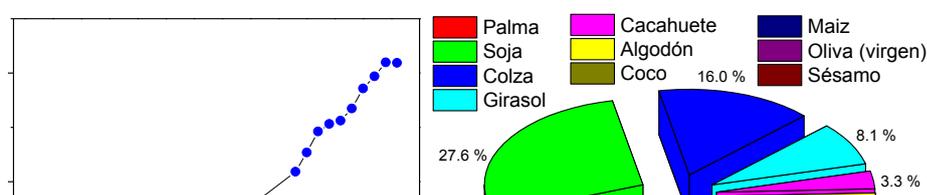


Figura 2-1. Izquierda: producción mundial total de los principales aceites vegetales (en toneladas). Derecha: porcentajes de cada uno de los principales aceites vegetales producidos a nivel mundial en 2013. Fuente: FAOSTAT.

Tabla 2-1. Producción de los principales aceites vegetales (miles de toneladas) en las distintas regiones del mundo en 2013. (Fuente: FAOSTAT)

	África	Norte A.	Centro y Sur A.	Asia	Europa	Oceanía	España
Algodón	328	345	360	3868	59	169	16
Cacahuete	1246	96	153	3585	97	1	0
Coco	118	0	174	2841	0	92	0
Colza	380	3532	684	9836	9915	341	36
Girasol	578	218	1251	1894	8630	20	430
Maíz	158	1668	232	486	310	2	18
Oliva (virgen)	392	10	32	416	1967	8	1110
Palma	2380	0	3050	48418	0	537	0
Sésamo	138	0	36	900	32	2	0
Soja	516	9464	15062	14578	3025	15	592

El elevado uso aceites supone una generación de residuos considerable, tanto en su producción como tras su uso. A continuación se ofrece información de cada uno de estos residuos, analizando sus propiedades, riesgos y posibles aplicaciones hasta la fecha.

2.1.1. Alpeorujo

La aceituna contiene aproximadamente un 20% en peso de aceite (Sampedro y col., 2007). Para extraerlo se utilizan actualmente dos procesos, conocidos como de dos y tres fases. Las etapas principales de ambos procesos se detallan en la Figura 2-2. La principal diferencia entre ambos se encuentra en la adición o no de agua para facilitar la etapa de centrifugación. En el proceso de tres fases se añade una importante cantidad de agua ($0.6 - 1.3 \text{ m}^3/\text{t}$) durante la centrifugación, por lo que además del aceite y un residuo sólido (orujo), se generan elevados volúmenes de aguas residuales ($1.0 - 1.6 \text{ m}^3/\text{t}$), conocidas como alpechín. Por su parte, en el proceso de dos fases sólo se añade agua para el lavado final del aceite, lo que reduce drásticamente el volumen de aguas residuales generadas ($0.2 \text{ m}^3/\text{t}$), obteniéndose por un lado el aceite y por otro un residuo semisólido llamado “alperujo” o “alpeorujo” que contiene las partes sólidas del fruto y su agua de vegetación (Alburquerque, 2004).

Tras su implantación en los años 90 el método de dos fases ha ido ganando importancia en España, y a fecha de hoy es usado para extraer el 98 % del aceite producido (Rincón y col., 2012). Este proceso es más económico ya que necesita menores cantidades de agua y es más eficiente en la extracción del aceite. Además se evita la producción de alpechines, aguas residuales altamente contaminantes (McNamara y col., 2008). Sin embargo el residuo obtenido por este método contiene una mayor cantidad de humedad y menos cantidad de grasa que el orujo, lo que dificulta el trabajo posterior en las orujeras que extraen el aceite remanente en el alpeorujo.

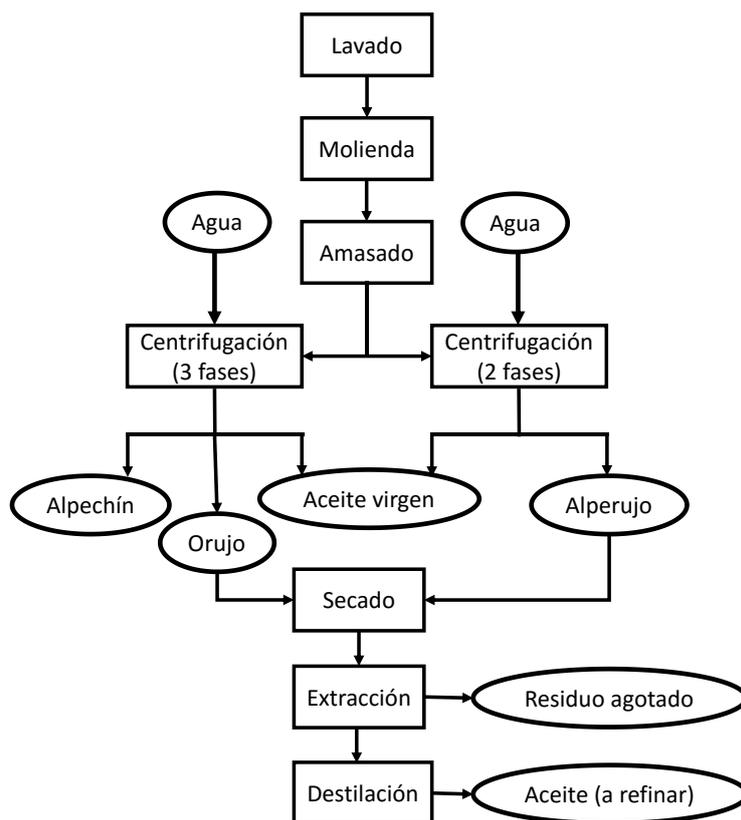


Figura 2-2. Diagrama de flujo del proceso de extracción de aceite de oliva

Según la Agencia de Información y Control de Alimentos en la campaña 2013-2014 se procesaron en España 8.77 millones de toneladas de aceitunas para la producción de aceite de oliva, con un rendimiento del 20.24 %. Con lo cual se produjeron alrededor de 6.97 millones de toneladas de desecho procedente de la aceituna, llegando a las orujeras alrededor de 11.71 millones de toneladas de residuos, de los cuales el alpeorujo fue el más abundante. Este producto tiene consistencia pastosa y contiene toda la materia presente en la aceituna exceptuando el aceite extraído: hueso, piel, pulpa y agua de vegetación principalmente. Cabe destacar también la alta cantidad de fenoles y la presencia de aceite residual. Su composición se detalla en la Tabla 2-2:

Tabla 2-2. Principales componentes del alpeorujo (Alburquerque, 2004).

Parámetro	Rango	
Humedad (%)	55.6-74.5	
pH	4.86-6.45	
COT ^a (g/Kg)	495.0-539.2	
Ratio C/N	28.2-72.9	
Materia orgánica ^b (g/kg)	Lignina	323.0-556.5
	Hemicelulosa	273.0-415.8
	Celulosa	140.2-249.0
	Grasas	77.5-194.6
	Proteínas	43.8-115.0
	Carbohidratos solubles	12.9-164.0
	Fenoles solubles	6.2-23.9
Total	848.9-976.0	

^a Carbono orgánico total.

^b En base seca.

Una característica especial del alpeorujo es que se genera en pequeñas instalaciones industriales, dispersas dentro de las regiones productoras. A pesar de esta dispersión el residuo es recogido y almacenado en almazaras u orujeras, ya que, de no ser procesado adecuadamente, puede suponer un serio problema en las áreas productoras, en las que se concentra en grandes cantidades.

Además de su elevadísima carga orgánica, el riesgo del alpeorujo para el medio ambiente deriva de su contenido en sustancias con propiedades fitotóxicas (Linares y col., 2003; Sampedro y col., 2005) y bactericidas (Saparrat y col., 2010). Los fenoles solubles y glicosilados son los principales responsables de estas propiedades (Díaz y col., 2010). Aunque otros componentes como polifenoles, ácidos orgánicos, lípidos, oligosacáridos y glicoproteínas pueden tener también un efecto perjudicial sobre el crecimiento de microorganismos y plantas (Niaounakis y Halvadakis, 2006; Sampedro y col., 2005). Por lo tanto es indispensable un adecuado tratamiento y eliminación de este residuo, evitando así su acumulación y el riesgo de vertidos.

A fecha de hoy el alpeorujo se sigue procesando para retirar todo el aceite residual que contiene, sometiéndolo para ello a una segunda centrifugación. Posteriormente, el sólido resultante de esta etapa se trata con hexano, extrayéndose de esta manera todo el aceite residual. Este último paso requiere un secado previo del alpeorujo, con una alta demanda de energía debido a la alta proporción de agua en el alpeorujo. Los

aceites así obtenidos, conocidos como de segunda y tercera extracción, son de baja calidad, y el proceso de producción es costoso en comparación con el empleado para el aceite virgen. Por lo tanto este aprovechamiento del alpeorujos tiene un margen de beneficio muy estrecho. Además el alpeorujos agotado sigue constituyendo un peligro medioambiental. Debido a la dificultad para encontrar un destino final, en muchas orujeras el residuo agotado es quemado y usado para obtener la energía necesaria para el paso previo de secado. El excedente energético puede usarse para alimentar plantas de cogeneración eléctrica (Cruz-Peragón y col., 2006; Vitolo y col., 1999). Sin embargo la rentabilidad de producción eléctrica es dudosa, y depende de incentivos públicos (Albuquerque, 2004).

Es por ello que se han explorado otra serie de aprovechamientos del alpeorujos, basándose en el potencial valor de la materia orgánica. Según su enfoque se puede distinguir entre:

a) Extracción de componentes de alto valor añadido:

Muchos componentes del alpeorujos poseen un alto valor *per se*, con lo cual su extracción podría ser económicamente viable. Como se ha indicado previamente, el alpeorujos es rico en fenoles, ya que solo el 2 % de los mismos se separa con la fase oleosa durante la centrifugación (Suárez y col., 2009). Los más abundantes son el tirosol y el hidroxitirosol (Fernández-Bolaños y col., 2002); los ácidos p-cumárico, caféico y vainílico también están presentes en cantidades significativas (Lesage-Meessen y col., 2001). Estos componentes son valiosos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Dermeche y col., 2013; Suárez y col., 2009). Con la extracción de estos fenoles se obtienen productos de alto valor añadido al mismo tiempo que se reduce el riesgo medioambiental de los sólidos sobrantes (Aliakbarian y col., 2011).

El alpeorujos también contiene cantidades explotables de ácido oleanólico y maslínico, de hecho su proceso de extracción está patentado (Noriyasu y Gou, WO0212159A1-2002). El ácido maslínico podría usarse en tratamientos contra el VIH (Parra y col., 2009). Además, el alpeorujos también es rico en polisacáridos de los que también se

puede extraer compuestos valiosos como la galactosa o la arabinosa (Cardoso y col., 2003).

Por último cabe destacar al hueso de aceituna como otro de los componentes valiosos del alpeorujó, ya que su poder calorífico es superior al del alpeorujó. De hecho, actualmente gran cantidad del alpeorujó producido es deshuesado. Pattara y col. (2010) sugieren que el hueso de aceituna sí podría ser usado como combustible en industrias agrícolas. Existe cierta controversia en este aspecto, sin embargo lo que sí está claro es que los huesos de aceituna son excelentes combustibles en estufas de pellets de uso doméstico (Rodríguez y col., 2008).

b) Compostaje y fertilizante:

El alpeorujó es rico en nutrientes susceptibles de ser utilizados como fertilizantes. No obstante su aplicación directa al suelo puede ser perjudicial (Siles y col., 2014). Por lo tanto, el compostaje es una opción válida para el aprovechamiento del alpeorujó. Esta es una tecnología de bajo coste con la que se pueden tratar grandes cantidades residuo y valorizarlos al transformarlos en fertilizantes.

Hay numerosos trabajos que estudian el compostaje del alpeorujó y demás residuos producidos durante la extracción del aceite, obteniendo productos que aumentan la fertilidad del suelo. Sin embargo suele ser necesario la adición de otros elementos, como agentes de carga para aumentar la porosidad y ciertos aditivos para corregir el balance de nutrientes, especialmente para aumentar su cantidad de nitrógeno (Alburquerque y col., 2007; Niaounakis y Halvadakis, 2006; Tortosa y col., 2012). También es importante considerar que tanto los fenoles como las ligninas pueden afectar negativamente al proceso de compostaje (Alburquerque, 2004). Se ha planteado usar tratamientos biológicos para eliminar estos componentes (Sampedro y col., 2005). De hecho la degradación biológica de ligninas está implicada en la formación de sustancias húmicas (Sampedro y col., 2007).

c) Uso para alimentación animal:

También se ha estudiado la posibilidad de utilizar el alpeorujó para alimentación animal (Martín García y col., 2003). A pesar de su alto contenido en fibras y la presencia de proteínas, su valor nutricional es bajo por los problemas derivados de la

ingesta de fenoles. Brozzoli y col. (2010) describen el tratamiento del alpeorujó con hongos degradadores de la lignina para mejorar sus propiedades nutricionales. Usando ciertos aditivos consiguieron aumentar el contenido en proteínas y reducir el de fenoles de manera significativa. Con todo, la viabilidad económica de este aprovechamiento no ha sido demostrada hasta la fecha.

d) Bioconversión del alpeorujó:

El uso de sustancias residuales en procesos biológicos abre un amplio abanico en las posibilidades de aprovechamiento de las mismas. Al igual que otros tantos residuos agroalimentarios, el alpeorujó puede usarse en procesos biológicos como material de partida para la obtención de otros productos de alto valor añadido.

Posiblemente el ejemplo más representativo en este sentido sea la obtención de bioetanol de segunda generación, el cual puede producirse a partir de residuos lignocelulósicos como el alpeorujó (Abu Tayeh y col., 2014; Haagensen y col., 2009). Georgieva y Ahring (2007) obtuvieron bioetanol a partir de alpeorujó hidrolizado enzimáticamente. Sin embargo, estos autores concluyen su trabajo afirmando que este proceso no sería económicamente viable por sí solo ya que gran parte de la materia prima no es transformada en etanol. Proponen por ello el uso de la fracción restante para la obtención de más sustancias de alto valor añadido. Se ha descrito también la producción de otros biocombustibles como metano e hidrógeno a partir de alpeorujó (Koutrouli y col., 2009; Rincón y col., 2009). Otras posibles aplicaciones de interés para valorizar el alpeorujó podrían ser la obtención de enzimas o bioplásticos (Campanari y col., 2014; Cordova y col., 1998).

Todas las posibles aplicaciones descritas se han ensayado principalmente a pequeña escala, con lo cual a fecha de hoy no suponen una solución integral al problema medioambiental generado por el alpeorujó. Por lo tanto es necesario un mayor esfuerzo investigador para continuar desarrollando y poniendo a punto técnicas de aprovechamiento de este residuo, así como la colaboración de instituciones públicas y empresas (Dermeche y col., 2013; Rincón y col., 2012).

2.1.2. Aceites residuales

Los aceites residuales de fritura se generan en hogares, hostelería e industria en grandes cantidades. Esta diversificación de los puntos de producción dificulta considerablemente la recuperación del residuo. Además conlleva una considerable dificultad para obtener datos exactos sobre las cantidades producidas. Según el proyecto europeo Biodienet (Biodienet project, 2009), en la Europa de los 27 se estima que se producen anualmente alrededor de 3.55 millones de toneladas de aceites usados, lo que equivale a unos 8 litros *per cápita*. Esta estimación incluye los tres sectores mencionados: industria, hostelería y doméstico. Anualmente se recuperan alrededor de 0.7 millones de toneladas de aceite usado en la Unión Europea, siendo los establecimientos hosteleros los principales suministradores (la normativa vigente exige la recogida del aceite usado en los mismos). Por el contrario se calcula que alrededor del 60 % de los aceites generados en los hogares es descartado inadecuadamente (Toop y col., 2013).

El vertido de estos aceites a la red de saneamiento pública puede originar serios problemas en la depuración de los efluentes urbanos y ser perjudicial para el medio ambiente (Cammarota y Freire, 2006; Li y Wrenn, 2004). Por lo tanto es indispensable un tratamiento integrado de estos residuos que incluya la recogida, transporte, reutilización y/o reciclaje de este residuo.

Para sustentar la infraestructura necesaria para la recogida del aceite usado, muy compleja debido a la diversidad de puntos en los que es generado, es imperativo que este tenga un elevado valor añadido. Hasta hace relativamente poco tiempo los aceites de fritura podían usarse como ingrediente en alimentación animal. Sin embargo desde Mayo de 2003 una normativa europea prohíbe usarlos con este fin (EC-1774/2002). Por lo tanto desde entonces se hace indispensable el desarrollo de técnicas que permitan reciclar este producto de una manera eficiente.

Hasta la fecha, la aplicación más común del aceite residual ha sido la producción de biocombustibles. El uso de aceites de grado alimentario para la producción de biocombustibles genera controversia ya que su uso con esta finalidad ha influido notablemente sobre su precio, además de fomentar la deforestación y la consiguiente

reducción de la biodiversidad por los cultivos intensivos dedicados a este fin (Luque y col., 2008). El uso de aceites residuales solventa estos problemas, permitiendo una producción más sostenible de biocombustibles. Además supondría una reducción considerable del coste de producción, teniendo en cuenta que entre el 70 y 80% del mismo deriva de la materia prima. De esta manera se incrementaría la viabilidad económica de este sector (Demirbas, 2009). Se han descrito posibles aplicaciones para la producción de biodiesel principalmente (Canakci, 2007; Quek y Balasubramanian, 2014). Sin embargo se necesita más investigación para aumentar la competitividad de este producto, así como para solventar ciertos inconvenientes derivados del uso de aceites residuales como la eliminación de las impurezas (Subbiah y Zwol, 2014; Zhang, 2003). En cualquier caso la producción de aceites usados no resulta suficiente para cubrir la demanda de biocombustibles, que además constituyen un producto de valor añadido reducido.

2.2. Valorización de los residuos oleícolas por bioconversión en productos con actividad interfacial.

De manera complementaria a las posibles vías de utilización descritas anteriormente, en la presente Tesis Doctoral se han estudiado otras potenciales aplicaciones para los dos residuos mencionados. Se trata de ofrecer una vía alternativa para el tratamiento y valorización del aceite usado y el alpeorujo, enfocada hacia la obtención de productos de elevado valor añadido, particularmente aquellos que poseen actividad interfacial. Se propone usar los aceites de fritura para la obtención de ácidos grasos, mono y diglicéridos mediante hidrólisis enzimática. Mientras que para el alpeorujo se introduce por primera vez la alternativa de su uso como fuente de carbono en procesos de fermentación para la producción de biosurfactantes.

A continuación se detallan las oportunidades que pueden ofrecer las dos estrategias seguidas durante la Tesis Doctoral: producción de biosurfactantes y de hidrolizados de aceite.

2.2.1. Uso del alpeorajo como fuente de carbono para la obtención de biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas con propiedades anfílicas generadas en procesos biológicos o bioquímicos. Esta definición también engloba a surfactantes obtenidos químicamente derivados de recursos renovables. Sin embargo, en adelante se entenderá por biosurfactante las biomoléculas producidas por fermentación mediante microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Los biosurfactantes fueron identificados por primera vez a mediados del siglo XX (Bergström y col., 1946; Jarvis y Johnson, 1949). En los últimos años, debido al creciente interés en la química sostenible o “verde”, están ganando mucho interés científico, centrado en aspectos como la optimización de las condiciones de fermentación, las modificaciones genéticas para aumentar los rendimientos, o el uso de sustratos residuales para su producción, así como en sus posibles aplicaciones comerciales.

Atendiendo a su estructura los biosurfactantes pueden clasificarse en glicolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, lípidos neutros y biosurfactantes poliméricos (Pacwa-Płociniczak y col., 2011). Los glicolípidos están formados por mono- u oligosacáridos (glucosa, mannososa, galactosa o ramnosa) unidos por un enlace glicosídico a una o varias cadenas de β -hidroxi ácidos grasos o alcoholes grasos (Figura 2-3). Los ramnolípidos son uno de los compuestos más estudiados dentro de este grupo, producidos principalmente por cepas de *Pseudomonas*. Están compuestos por una o dos moléculas de ramnosa, que constituyen la parte hidrófila de la molécula, unidas a una o dos cadenas de ácidos grasos de entre 8 y 16 átomos de carbono (Geys y col., 2014), siendo esta la parte hidrófoba. En función del número de anillos de ramnosa se distingue entre mono- y diramnolípidos. Otros glicolípidos representativos son los soforolípidos y lípidos de manosil-eritritol o MELs, producidos principalmente por levaduras del género *Candida* y *Pseudozyma* respectivamente (Campos y col., 2013). Los soforolípidos son similares a los ramnolípidos, pero contienen moléculas de soforosa en lugar de ramnosa (Figura 2-3). La zona hidrófila de los MELs la constituyen una molécula de mannososa unida a otra de eritritol, mientras que la hidrófoba está formada por varias cadenas alifáticas unidas a la mannososa (Konishi y col., 2007).

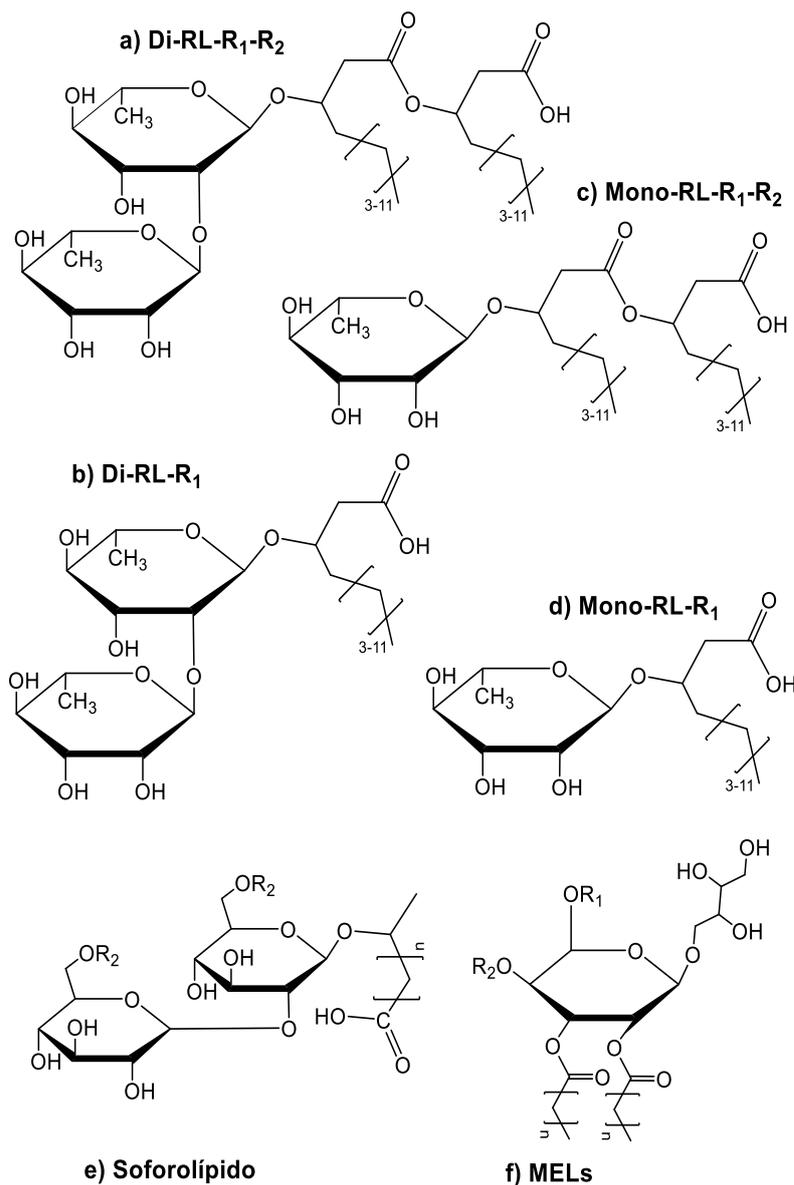


Figura 2-3. Algunos de los glicolípidos más representativos, ramnolípidos (a, b, c y d), soforolípidos en su forma ácida (e) y MELs (f).

El otro grupo de biosurfactantes que ha despertado más interés científico es el de los lipopéptidos. La zona polar de estos surfactantes la constituye un oligopéptido lineal o circular, mientras que la parte apolar es un β -hidroxi ácido graso. Normalmente el número de aminoácidos en el oligopéptido oscila entre los 7 y los 25, y el de carbonos en el ácido graso entre 13 y 17 (Geys y col., 2014; Patel y col., 2015). Principalmente son producidos por cepas de *Bacillus* y *Paenibacillus*, aunque también se han obtenido a partir de cepas de *Pseudomonas* (Cochrane y Vederas, 2014). Surfactinas e iturinas son dos de los lipopéptidos más comunes. Ambos son heptapéptidos, en los que los aminoácidos están unidos en forma de anillo. Su

principal diferencia estriba en la secuencia de aminoácidos y en el enlace con el β -hidroxi ácido graso (Figura 2-4). Mientras que en las surfactinas este enlace es éster en las iturinas es del tipo amida.

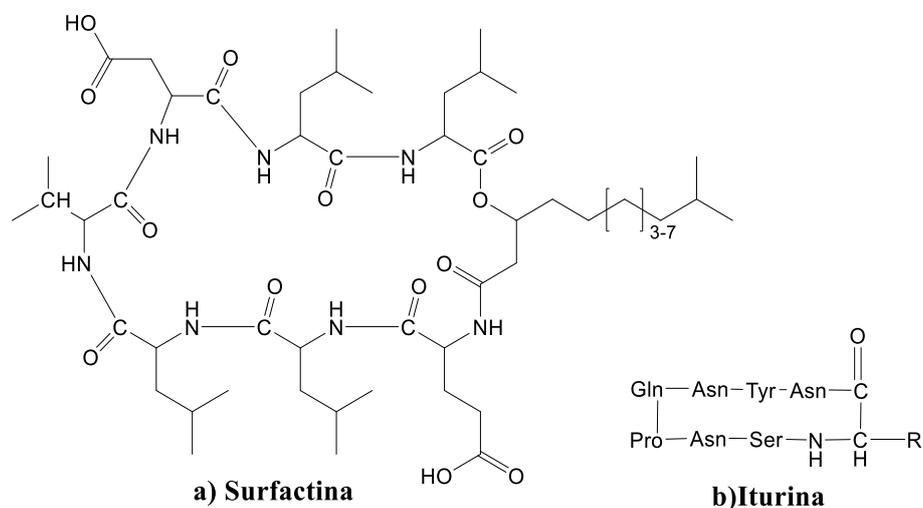


Figura 2-4. Dos de los lipopéptidos más significativos: a) surfactina y b) iturina (estructura de los aminoácidos contraída).

Adicionalmente, existen numerosos trabajos de investigación y revisiones bibliográficas en las que se detallan las propiedades de otros biosurfactantes significativos tales como Emulsán® y fosfolípidos (Desai y Banat, 1997; Mnif y Ghribi, 2015; Roelants y col., 2014).

Actualmente la función biológica de los biosurfactantes no está completamente clara. Es comúnmente aceptada la idea de que actúan como agentes de superficie facilitando el contacto entre microorganismos y sustratos hidrófobos, mejorando así la biodisponibilidad de nutrientes insolubles (Desai y Banat, 1997). Sin embargo hay estudios que demuestran que la adición de biosurfactantes perjudica la biodegradación de ciertos compuestos al formar una barrera que impide el acceso de los microorganismos al compuesto hidrófobo (Banat y col, 2010). En lugar de esto, se ha sugerido que los biosurfactantes estén implicados en mecanismos de regulación y adaptación a las condiciones ambientales en las que se desarrolla el microorganismo, teniendo por tanto varias funciones. De hecho hay trabajos que describen la influencia de estos compuestos en la formación y rotura de biopelículas, en la movilidad bacteriana y en la virulencia y actividad antimicrobiana (Banat y col., 2014a; Chrzanowski y col., 2012).

Los biosurfactantes presentan las mismas propiedades interfaciales que sus equivalentes sintéticos, como son capacidad de emulsificación, detergencia, mojado, espumado, etc. (Rosen y Kunjappu, 2012). La principal característica que hace tan valiosos a estos productos es que pueden obtenerse a partir de recursos renovables, evitando la dependencia de los productos derivados del petróleo, además de algunas de sus propiedades que se describen a continuación. Debido a su origen biológico suelen presentar una mayor biodegradabilidad y biocompatibilidad que los tensioactivos sintéticos (Lima y col., 2011; Mulligan, 2005). También destacan por su excelente estabilidad en un amplio rango de pH, salinidad y temperatura (Lotfabad y col., 2009). Por tanto se hace evidente que los biosurfactantes son productos muy atractivos, que podrían incluso llegar a reemplazar a los tensioactivos sintéticos en algunas aplicaciones (Marchant y Banat, 2012a).

Gracias a su diversidad de estructuras y propiedades, los biosurfactantes han encontrado numerosas aplicaciones, entre las que destacan su uso en petroquímica y productos alimentarios (Campos y col., 2013). Actualmente existen compañías que comercializan productos cosméticos que contienen biosurfactantes (www.soliance.com). Otro importante uso de los biosurfactantes es la remediación de entornos contaminados, por ejemplo para eliminar grasas y metales pesados de suelos y aguas (Mulligan y col., 2001; Urum y Pekdemir, 2004). También se han descrito interesantes aplicaciones en farmacia y medicina debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y de prevención de la formación de biopelículas (Cochrane y Vederas, 2014; Meena y Kanwar, 2015). Este amplio abanico de posibilidades en las que pueden ser utilizados los biosurfactantes y el creciente interés por la química sostenible y renovable aumentan las posibilidades de que en un futuro próximo estos compuestos sean de uso habitual.

Según un estudio económico realizado por “*Transparency Market Reserarch*” se estima que en 2018 el mercado mundial de los biosurfactantes supondrá alrededor de 2.21 millones de dólares, con un crecimiento anual del 3.5 % desde 2014 (TMR, 2012). Actualmente, sin embargo, la aplicación de los biosurfactantes está restringida a ciertas áreas muy específicas, siendo escasas las aplicaciones industriales de los mismos (Reis y col., 2013). Esto se debe a que por el momento, sus costes de

producción no son lo suficientemente competitivos con los de los tensioactivos sintéticos (Henkel y col., 2012). El principal problema estriba en los bajos rendimientos y en los elevados costes de producción y postproducción (Marchant y Banat, 2012b). Por lo tanto numerosas investigaciones se están centrando en la optimización de las condiciones de fermentación o en la obtención de cepas modificadas genéticamente que presenten mayores rendimientos.

Otra posible solución a este problema de viabilidad económica es el uso de residuos como materias primas (Banat y col., 2014b). De esta manera se reducirían los costes de producción al mismo tiempo al que se otorga a estos desechos un valor añadido. Como puede observarse en la Tabla 2-3 existen numerosos trabajos que describen el uso de residuos (normalmente relacionados con la industria agroalimentaria) para la producción de biosurfactantes.

Al igual que otros residuos alimentarios el alpeorujo se podría considerar un posible candidato a ser usado como materia prima la producción de biosurfactantes; admitiendo que su fracción residual de aceite y su alto contenido en material lignocelulósico podrían ser usados por microorganismos como sustratos para su crecimiento y producción de dichas moléculas. Sin embargo, a excepción del trabajo de Mercadé y col. (1993), en el que los autores obtuvieron ramnolípidos a partir de alpechín (residuo líquido producido durante la extracción de tres fases del aceite de oliva), no se encuentra en bibliografía ningún otro trabajo relacionado con la obtención de biosurfactante a partir de residuos de la extracción del aceite de oliva. De manera que, de confirmarse esta hipótesis, se podría sentar las bases para una nueva vía de utilización de estos residuos, los cuales hasta la fecha no presentan una aplicación convincente.

Tabla 2-3. Algunos principales trabajos en los que se obtienen biosurfactantes usando residuos como materia prima.

Sustrato	Microorganismo	Biosurfactante	Referencia
Residuo ind. aceitera	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolípido	Benincasa y col. (2004)
Residuo ind. aceitera	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolípido	Nitschke y col. (2005)
Residuo ind. aceitera	<i>C. lipolytica</i>	No identificado	Rufino y col. (2007)
Residuo ind. aceitera	<i>Candida spp.</i>	Glicolípidos	Bednarski y col. (2004)
Residuo ind. aceitera	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolípido	Raza y col. (2007)
Aceite de fritura	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolípido	Haba y col. (2000)
Melaza y suero lácteo	<i>L. lactis</i> y <i>S. thermophilus</i>	No identificado	Rodrigues y col. (2006)
Melaza	<i>C. bombicola</i>	Soforolípido	Solaiman y col. (2007)
Melaza y suero lácteo	<i>Bacillus spp.</i>	Lipopéptidos	Joshi y col. (2008)
Suero de soja	<i>B. subtilis</i>	Iturina	Mizumoto y col. (2006)
Residuos de patatas	<i>B. subtilis</i>	Surfactina	Noah y col. (2005)
Residuos de cassava	<i>B. subtilis</i>	Lipopéptidos	Nitschke y Pastore, (2006)
Aceite lubricante	<i>C. kutscheri</i>	Glicolipopéptido	Thavasi y col. (2007)
Residuos de producción de biodiesel	<i>T. mycotoxinivorans</i>	Glicolípidos	Souza Monteiro y col. (2012)
Alpechín	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolípido	(Mercadé y col., 1993)

2.2.2. Producción de ácidos grasos, mono y diglicéridos a partir de aceites usados.

Los aceites vegetales pueden ser el material de partida para la obtención de ácidos grasos libres (AGL) y mono y diglicéridos (MAG y DAG), sustancias que cuentan con un gran número de aplicaciones debido a sus propiedades anfifílicas. Tanto los AGL como sus derivados (jabones, ésteres, alcoholes o amidas) se usan como emulsionantes, detergentes, lubricantes, estabilizantes, etc. en numerosos productos y procesos industriales (Anneken y col., 2000). Los glicéridos parciales (MAG y DAG) son los emulsionantes sintéticos más usados en la industria alimenticia, encontrando

aplicación en numerosos alimentos preparados, lácteos, cosméticos y productos farmacéuticos (Bornscheuer, 1995; Kosswig, 2000). De hecho, junto con algunos derivados suyos y la lecitina son los únicos emulsionantes considerados por la “US Food and Drug Administration” como productos GRAS (Generally Recognized as Safe). Los MAG destacan por sus excelentes propiedades emulsionantes, su reducido olor y sabor y excelente biodegradabilidad. Por otro lado, los DAG también pueden ser usados como intermedios en la síntesis de triglicéridos regioselectivos y quirales y de fosfolípidos (Hasenhuettl y Hartel, 2008).

Los glicéridos parciales pueden formarse por esterificación de ácidos grasos o por lisis de triglicéridos. Esta última se puede clasificar en función de la molécula que aporta el grupo hidroxilo para la rotura del enlace ester. De esta manera se distingue entre: (i) hidrólisis, cuando esta molécula es agua, (ii) alcoholísis, para alcoholes, (iii) saponificación o hidrólisis alcalina, si produce en presencia de NaOH disuelto, y por último (iv) aminólisis, si el OH⁻ procede de una amina. Alcoholísis, aminólisis, así como otras reacciones que implican ácidos grasos (acidólisis) u otros triglicéridos (interesterificación) se conocen en general como reacciones de transesterificación. La conversión de la reacción puede ser total, dando lugar a glicerina y los esteres o ácidos grasos pertinentes, o parcial, en cuyo caso se obtendrían además los glicéridos parciales mencionados anteriormente: DAG y MAG.

Los procesos a escala industrial en los que se lleva a cabo la hidrólisis de grasas y aceites operan a altas temperaturas (210-260 °C) y presiones (16-60 bar), obteniendo principalmente ácidos grasos y glicerina (Anneken y col., 2000). Por otro lado, los dos métodos más comunes para la obtención de MAG y DAG son la esterificación de glicerina con el/los ácidos grasos deseados y la glicerólisis de grasas o aceites. Cada técnica posee ciertas ventajas y desventajas. Por ejemplo las grasas son más baratas que los ácidos grasos, sin embargo son insolubles en glicerina lo que dificulta la reacción de glicerólisis. Por otro lado es necesario retirar el agua producida durante la esterificación para que la reacción se desplace hacia los productos. A su vez, ambos procedimientos también requieren altas temperaturas para funcionar (Hasenhuettl y Hartel, 2008).

Estos procesos industriales tienen una alta demanda energética y altos costes de producción y mantenimiento. Además, debido a las elevadas temperaturas requeridas, se pueden producir reacciones secundarias. A causa de la degradación térmica pueden aparecer sustancias con malos olores, sabores o colores entre otras consecuencias (Bornscheuer, 2000). Esto obliga a llevar a cabo posteriores etapas de purificación por destilación o cromatografía que encarecen el proceso (Karmee, 2008). La Tabla 2-4 resume los principales inconvenientes derivados de la hidrólisis química de grasas.

Tabla 2-4. Efectos negativos de la hidrólisis química de ciertos triglicéridos (Anneken y col., 2000)

Componente	Reacción secundaria
Ácido graso conjugado	Degradación térmica, isomerización
Hidroxilado	Deshidratación, polimerización
Poliinsaturado	Polimerización, coloración

En las últimas décadas muchos esfuerzos científicos se están orientando hacia el desarrollo de una tecnología verde, respetuosa con el medio ambiente. En este sentido, la catálisis enzimática juega un papel indispensable. La lisis de grasas y aceites es catalizada por lipasas. El uso de estas enzimas para la modificación de triglicéridos ofrece una serie de ventajas en comparación con los procesos químicos. En primer lugar son poderosos catalizadores que permiten operar en condiciones de reacción moderadas (su temperatura de operación óptima se sitúa entre los 30 y los 50 °C), evitándose de esta manera las indeseadas reacciones secundarias. Además, la regio y estéreoselectividad de algunas lipasas permite la obtención de glicéridos parciales con ácidos grasos en la posición deseada 1(3), 1-3 o 2, ampliando las posibles aplicaciones de los productos derivados de los triglicéridos.

Las reacciones catalizadas por las lipasas pueden transcurrir en distintos medios:

a) Medio acuoso:

En este grupo se encuadran las emulsiones aceite en agua (O/W), en las que la fase continua es acuosa y la dispersa una grasa o aceite. La lipasa está disuelta en la fase acuosa, y para actuar ha de adsorberse en la interfase donde su centro activo queda expuesto, fenómeno que se conoce como activación interfacial (Lotti y Alberghina, 2007). El área interfacial disponible es un factor crucial en estos sistemas, por lo que será necesario trabajar con tamaños de gota lo más pequeños posible. El medio acuoso

tiene la ventaja de que es el medio natural de actuación de las lipasas, por lo que no es necesario usar disolventes orgánicos para llevar a cabo la reacción. Sin embargo este sistema presenta importantes inconvenientes, como la necesidad de usar un surfactante y de aportar energía para formar la emulsión. La elección del surfactante es un aspecto crucial, ya que su interacción con la lipasa puede resultar perjudicial para las propiedades hidrolíticas de la misma. Además, productos de reacción como AGL y MAG pueden acumularse en la interfase, desplazando a la enzima adsorbida sobre ella y afectando negativamente a la velocidad de hidrólisis del proceso (Hwang y col., 2009; Reis y col., 2008). Otra importante desventaja es la dificultad de la posterior separación de los productos de reacción y de la enzima utilizada. Usando un sistema de reacción con dos fases separadas, como un reactor de membrana, se solventaría este problema. Sin embargo en este caso el área interfacial es mucho menor y aparecen limitaciones por transferencia de materia, así como problemas de inmovilización de la enzima sobre la membrana (Hayes, 2004).

b) Medio orgánico:

Una de las características más interesantes y distintivas de las lipasas es que son capaces de actuar en medio orgánico y catalizar tanto reacciones de hidrólisis como de síntesis (Klibanov, 2001). El bajo contenido o la práctica ausencia de agua en este medio (conocidos como sistemas microacuosos) favorece las reacciones de esterificación y transesterificación, al desplazarse el equilibrio hacia los productos de las mismas. Por ejemplo, los medios orgánicos son usados para llevar a cabo alcoholisis, si en el mismo se encuentra disuelto un alcohol. En estos casos la enzima debe estar inmovilizada en algún soporte de manera que retenga su actividad, ya que las lipasas se desactivan en la mayoría de disolventes no polares (DiCosimo y col., 2013). Un caso particular de estos sistemas son las conocidas como micelas inversas, en las que las enzimas se insertan en vesículas acuosas con diámetros del orden del nanómetro, estabilizadas dentro de una matriz no polar. Las micelas inversas constituyen así un sistema isotrópico (microemulsión) y termodinámicamente estable, a diferencia de las emulsiones. El medio de reacción es dinámico, las vesículas de agua coalescen de forma espontánea, intercambiando su contenido y formando nuevas micelas en tiempos del orden de los microsegundos (Hayes, 2000). La mayor ventaja del uso de micelas

inversas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática es que transcurren en un medio que se podría considerar homogéneo. Por el contrario, las principales desventajas estriban en la necesidad de usar un disolvente orgánico para la fase continua, la dificultad para operar en un sistema continuo y para recuperar la enzima y los productos (Divakar y Manohar, 2007).

Ambos medios de reacción son bien conocidos y se encuentran descritos con gran detalle en bibliografía desde hace bastantes años. A su vez, ambos sistemas han sido utilizados para llevar cabo hidrólisis enzimática de aceites, pudiéndose obtener MAG y AGL si se selecciona una lipasa con la regioselectividad adecuada (Carvalho y Cabral, 2000; Hwang y col., 2009; Kabanov y col., 1988; Karmee, 2008). Sin embargo en bibliografía no existe ningún trabajo en el que se trate de obtener estos mismos productos a partir de aceites usados, y que estudie las posibles dificultades que se pueden derivar del uso de estos residuos como materia prima para la hidrólisis.

A escala industrial el uso de enzimas para la hidrólisis de aceites vegetales es reducido, debido al alto coste de emplear enzimas. Sin embargo el desarrollo biotecnológico proveerá enzimas más económicas y diseñará procesos más eficientes, mejorando su viabilidad económica. Adicionalmente el uso de aceite residual como materia prima puede abaratar considerablemente estos procesos.

Este hecho motiva la segunda línea de investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral, en la que se estudia la utilización de aceites residuales de cocina como sustrato en hidrólisis enzimática en emulsiones O/W y W/O, tratando de abrir una nueva vía de utilización para estos residuos.

2.3. Objetivos

En base a todo lo expuesto anteriormente, en la presente Tesis Doctoral se plantea el estudio de nuevas alternativas para la valorización de residuos derivados de la industria aceitera. Se ha considerado específicamente la problemática particular presente en España, en la que el aceite de oliva es el más importante tanto en producción como en consumo.

A su vez se han seguido dos líneas de investigación bien diferenciadas, cada una centrada en uno de los principales residuos: alpeorujos y aceites usados. Partiendo de residuos distintos, ambas líneas tienen como objetivo común la producción de sustancias con propiedades interfaciales. En cada una de ellas se ha aplicado una de las principales estrategias para la biosíntesis de surfactantes: mediante la acción de enzimas y de microorganismos.

Esto viene motivado por la creciente inquietud social orientada hacia la producción y consumo de productos “ecológicos o verdes” y renovables, que como a otros muchos productos afecta también a los surfactantes, utilizados en detergentes y alimentos por ejemplo. De alcanzarse el objetivo planteado, se estaría cumpliendo el doble propósito de la producción de sustancias de alto valor añadido a partir de fuentes renovables al mismo tiempo que se evitaría el impacto negativo que estos residuos pueden ocasionar sobre el medio ambiente.

Por lo tanto, la primera línea de investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral, se centra en la utilización de aceites residuales de cocina como sustrato para la producción de ácidos grasos, mono y diglicéridos mediante hidrólisis enzimática. Se trata de demostrar que los aceites residuales son sustratos igualmente válidos para la síntesis de estos productos como lo puede ser un aceite de grado alimentario. Para ello se han analizado las posibilidades y limitaciones que ofrecen dos medios de reacción distintos: emulsiones O/W y microemulsiones W/O. A su vez se han analizado ciertos parámetros cruciales para la reacción tales como la cantidad de fase grasa, el tipo de emulsionante y su concentración en las emulsiones O/W; o la relación agua/surfactante, la cantidad de aceite en la fase grasa y la concentración de enzima en las microemulsiones W/O.

Por otro lado, con la segunda línea de investigación se pretende probar la viabilidad del alpeorujos como materia prima en la producción de biosurfactantes, intentando sentar las bases para el posible desarrollo de uno proceso de producción a mayor escala. La hipótesis inicial se basa en que el aceite residual que contiene el alpeorujos puede constituir una fuente de carbono biodisponible para ser utilizado por microorganismos en su crecimiento y producción de biosurfactantes. Adicionalmente se pretende estudiar hasta qué punto el uso de alpeorujos hidrolizado, de manera que

de su fracción celulósica y hemicelulósica se hagan biodisponibles, afecta a la producción de biosurfactante. Se han usado para ello dos cepas bacterianas distintas, las cuales producen dos biosurfactantes diferentes. También se han analizado la influencia de otros parámetros como la concentración de alpeorujo o distintos métodos de hidrólisis, comparándose los resultados con los obtenidos para fuentes de carbono más tradicionales en fermentaciones como glicerina o glucosa.

3. Materiales y métodos

A continuación se detallan todas las técnicas y procedimientos experimentales utilizados en la presente Tesis Doctoral.

3.1. Materiales

3.1.1. Aceites

Se han empleado dos aceites usados diferentes denominados aceite residual 1 y 2 (AR-1 y AR-2), además de una mezcla de aceites comerciales de oliva y girasol, usada como control. AR-1 se obtuvo directamente de un restaurante local y tiene una razón aproximada de 20/80 (v/v) en aceite de oliva y girasol respectivamente. AR-2 es una mezcla de aceites vegetales residuales suministrada por la empresa de recogida de aceites usados Ekosur Andaluza de Residuos S.L. (Granada, España), y por lo tanto de composición desconocida. Ambos aceites residuales fueron filtrados en papel de filtro previamente a su uso. La mezcla control (MC) se preparó a partir de aceites

comerciales de girasol y oliva de grado alimentario en proporción 80/20 (v/v) respectivamente.

El perfil de ácidos grasos de las tres mezclas de aceites utilizadas y su composición en glicéridos y ácidos grasos libres se describen en la Tabla 3-1 y la Tabla 3-2 respectivamente:

Tabla 3-1. Perfil de ácidos grasos de las tres mezclas de aceite utilizadas (% en peso)

	MC	AR-1	AR-2
C16:0	9.15 ± 0.06	7.90 ± 0.15	17.19 ± 0.03
C18:0	4.32 ± 0.17	4.80 ± 0.21	4.36 ± 0.14
C18:1n-9	35.60 ± 0.05	29.30 ± 0.28	36.34 ± 0.15
C18:2n-6	43.14 ± 0.10	52.45 ± 0.25	35.93 ± 0.24
Otros	7.78 ± 0.39	5.56 ± 0.88	6.18 ± 0.23

Tabla 3-2. Composición en glicéridos y ácidos grasos libres de los tres aceites empleados (mmol/mol aceite)

	MC	AR-1	AR-2
Peso molecular medio (g/mol)	875.18	875.89	869.13
TAG	946.25	949.93	912.21
DAG	79.79	74.49	127.55
MAG	0.86	1.21	8.27
FFA	0.80	10.65	4.15

El perfil de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases, según el método descrito por Rodríguez-Ruiz y col. (1998). La distribución de glicéridos se determinó mediante UPLC/MS, tal y como se describe en el apartado 3.3.4.

3.1.2. Alpeorujó

El alpeorujó (ALP) utilizado procede de la extracción de aceite de oliva mediante el sistema de dos fases. Fue suministrado por la cooperativa La Unión (Montilla, España). Su humedad se determinó gravimétricamente, siendo de un 64.4 ± 0.7 %. Su composición se detalla en la Tabla 3-3:

Tabla 3-3. Composición del alpeorujo en base seca

Componente	Porcentaje en peso	
Aceite residual	3.9 ± 0.3	
Proteínas	7.1 ± 0.4	
Carbohidratos solubles	9.6 ± 0.4	
	C	48.15
Análisis elemental	N	1.18
	H	7.14

El contenido en aceite residual del alpeorujo se determinó mediante extracción con hexano y el contenido proteico mediante el método Kjeldahl. La composición elemental se midió en un analizador elemental Flash 2000 (Thermo Scientific, Waltham-MA, USA). El procedimiento para la medida de los carbohidratos solubles se describe posteriormente en el apartado 3.4.5.

3.1.3. Enzimas

Se emplearon tres lipasas de distinta procedencia para la hidrólisis enzimática del aceite: lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) y lipasa de páncreas porcino (PPL).

Por otro lado, para la hidrólisis del alpeorujo se empleó una mezcla de celulasas, hemicelulasas y xilanasas compuesta por una celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, Viscozyme® L y una xilanasas de *Thermomyces lanuginosus*.

Todas las enzimas fueron suministradas por Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EEUU).

3.1.4. Bacterias

Se han utilizado dos cepas bacterianas, de las cuales previamente se conocía su habilidad para la producción de biosurfactante. Estas han sido *Bacillus subtilis* N1 (número de catálogo KT595698 de GenBank) y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (de la colección de la Universidad del Ulster). La primera de ellas es productora de surfactina, mientras que la segunda produce ramnolípidos.

Para la adecuada conservación de las cepas, el cultivo de partida de las mismas se dividió en tubos Eppendorf de 2 mL que se almacenaron a -80°C añadiendo un 20% (v/v) de glicerol. A partir del cultivo original se preparó un cultivo madre, utilizado para los inóculos de todos los cultivos subsiguientes. Este cultivo madre se almacenó en Eppendorf de 2 mL a -20°C , añadiendo también un 20 %v de glicerol, durante un tiempo máximo de 12 meses. Transcurrido este tiempo se prepara un nuevo cultivo madre a partir de las muestras congeladas del cultivo original.

El medio de cultivo empleado tanto para el cultivo original como para los cultivos madre fue PPGAS, compuesto de Tris-HCl (19 g/L), proteasa peptona (10 g/L), glucosa (5 g/L), KCl (1.5 g/L), NH_4Cl (1 g/L) and MgSO_4 (0.4 g/L), y preparado en agua destilada. Los cultivos se dejaron crecer durante 24 h a 37°C y 160 r.p.m. antes de ser congelados.

3.1.5. Reactivos

Todos los reactivos químicos usados fueron de grado analítico, suministrados por Panreac (España) o Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EEUU).

3.2. Caracterización de las lipasas

3.2.1. Determinación del contenido proteico de los preparados comerciales

Para tener una información más completa sobre la composición de los preparados comerciales de lipasas utilizados se determina el contenido en proteínas de los mismos. De esta manera se puede calcular la actividad enzimática por masa de proteína presente en el preparado.

Se ha empleado para ello el método del ácido bicincoánico (BCA), en el que se combina la reducción de iones Cu^{+2} a Cu^{+1} por proteínas en un medio ácido y la detección colorimétrica del complejo formado de este ion Cu^{+1} y el BCA. Se emplea para ello el kit Pierce[®] PCA de Thermo-Scientific (Massachusetts, EE. UU.).

Como estándar para la cuantificación de la concentración de proteína se utiliza una disolución de albúmina de 2 mg/mL, en un rango de concentración de 25 a 2000 mg/L. Las medidas colorimétricas se hacen determinando la absorbancia de las muestras 562 nm en un espectrofotómetro Cary 100 Bio (Agilent Technologies, California, EE. UU.). Los datos obtenidos se ajustan a un polinomio de segundo grado. La Figura 3-1 muestra la recta patrón obtenida:

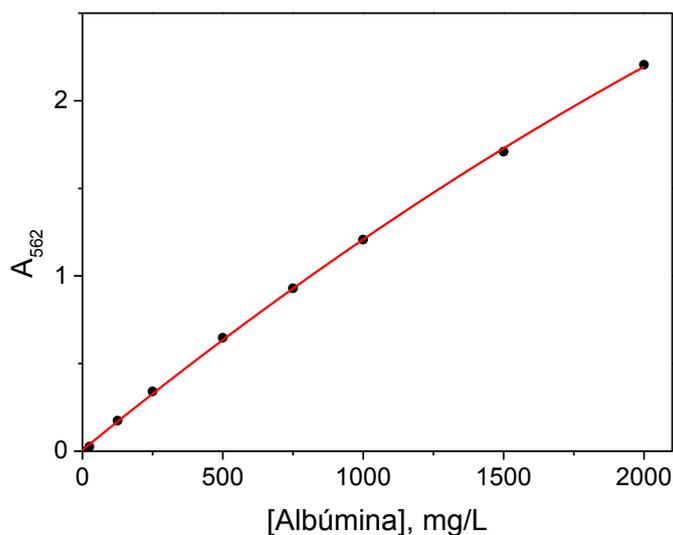


Figura 3-1. Recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas en los preparados comerciales de lipasas.

$$A_{562} = 6.81 \cdot 10^{-3} + 1.13 \cdot 10^{-3} \cdot [\text{Alb}] - 1.08 \cdot 10^{-7} \cdot [\text{Alb}]^2 \quad (3-1)$$

donde:

A_{562} es la absorbancia de la muestra a 562 nm

$[\text{Alb}]$ es la concentración de albúmina en mg/L

En la Tabla 3-4 se muestra el contenido en proteína de los tres preparados comerciales.

3.2.2. Ensayos actividad lipásica

Para la medida de la actividad lipásica se ha empleado el método del pHstato, tal como detallan Jurado y col., 2006. Este determina en tiempo real los ácidos grasos

liberados durante la hidrólisis enzimática de triglicéridos, mediante una valoración con una disolución de NaOH.

Para ello es necesario preparar una emulsión con el triglicérido a hidrolizar, que en nuestro caso ha sido tributirina. Estas emulsiones se preparan con la ayuda de un reactivo de emulsificación que permite obtener emulsiones estables durante todo el proceso de medida de actividad enzimática. Su composición es la siguiente:

- Goma arábica: 6 g/L
- Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4): 0.410 g/L
- Glicerina de 99.5% pureza ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$): 540 mL/L

Preparado en agua desmineralizada (18.2 $\text{m}\Omega\cdot\text{cm}$) Mili-Q (Millipore Corp., Darmstadt, Alemania)

Las emulsiones se preparan en vasos de 3.5 cm de diámetro y 15 cm de altura usando un homogeneizador mecánico UltraTurrax T 25 Basic, IKA (Staufen, Alemania) y siguiendo los siguientes pasos:

- A 59.4 mL de reactivo de emulsificación se añaden 0.6 mL de tributirina. De esta manera la emulsión resultante tendrá un 1 %v de la misma.
- Se coloca el cabezal del homogeneizador a 1 cm del fondo del vaso.
- Una vez fijado el vaso se homogeniza durante 60 s a 13000 rpm.

La emulsión obtenida se mantiene bajo agitación mecánica hasta ser usada en las medidas de actividad enzimática (hasta la cual no deben trascurrir más de una hora desde la preparación de la emulsión).

A su vez es necesario disponer también de otras dos disoluciones:

- Disolución de agente valorante, en nuestro caso NaOH. De manera general su concentración es de 0.05 M, aunque de ser necesario (cuando se trabaja con grandes concentraciones de enzima) se prepara hasta de 0.5 M. Previamente a su uso la concentración de estas disoluciones se contrasta valorando una disolución de ácido benzoico a 1.2 g/L.
- Disolución de lipasa. Se prepara en un medio a pH 7, obtenido disolviendo 2.983 g de NaCl y 0.068 g de KH_2PO_4 en 1 L de agua desmineralizada y posteriormente ajustando su pH a 7 añadiendo

NaOH 0.05 M. La concentración de enzima a utilizar depende de la actividad de la misma. Una vez preparadas se mantienen refrigeradas durante no más de 7 días.

Para el seguimiento de la hidrólisis enzimática de la tributirina mediante el método del pH-stato se ha utilizado el valorador automático 718 Stat Titrino (Metrohm, Herisau, Suiza). Durante el proceso de medida se utilizaron dos modos de operación de este equipo:

- Modo SET: se utiliza para fijar el pH de inicio de la hidrólisis. Añade disolución de contraste hasta que se alcanza el valor de pH fijado.
- Modo STAT: mantiene el pH en el valor fijado durante el tiempo especificado, mediante la adición continuada de disolución de contraste. Es el utilizado durante la reacción de hidrólisis.

A continuación se describen los pasos seguidos para llevar a cabo la hidrólisis:

- Se toman 15 mL de emulsión de tributirina y se colocan en un vaso de precipitados de 25 mL de capacidad, sumergido en un baño a 30 °C y con agitación magnética a 700 rpm.
- Una vez termostatizado se ajusta el pH de la emulsión a 7 (excepto cuando se estudia el efecto de esta variable) usando para ello el modo SET del valorador automático.
- Se pone en marcha el modo STAT del valorador y se inicia la reacción añadiendo 1 mL de disolución de lipasa.
- El pH del medio se mantiene constante en 7 mediante la adición de la disolución de NaOH. Es importante ajustar los parámetros del valorador automático de manera que el pH oscile en valores próximos a 7 y la disolución valorante se añada de manera continuada. Se fijaron en los siguientes valores: gamma de regulación 0.05, velocidad máxima de adición 0.20 mL/min y velocidad mínima 15 µL/min.
- Se registra el volumen disolución valorante añadida durante 10 min.

La actividad enzimática se expresa como unidades lipásicas (LU, 'Lipase units'). Una unidad lipásica equivale a la cantidad de lipasa que libera 1 µmol de ácido graso por minuto, calculándose a partir de la Ecuación (3-2):

$$A = \frac{v \cdot [\text{NaOH}] \cdot 10^6}{e_{exp}} \quad (3-2)$$

donde:

A , es la actividad de la enzima, expresada en LU por gramo de preparado comercial (LU/g)

v , es la velocidad media de adición de NaOH en el intervalo comprendido entre 180 y 480 segundos, que equivale a la pendiente de la curva de valoración en dicho intervalo (mL/min)

$[\text{NaOH}]$, es la concentración de la disolución de NaOH usada para valorar los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis (mol/L)

e_{exp} , es la concentración del preparado comercial de enzima en la disolución de enzima añadida (g/L)

La Figura 3-2 muestra un ejemplo de las curvas de valoración obtenidas:

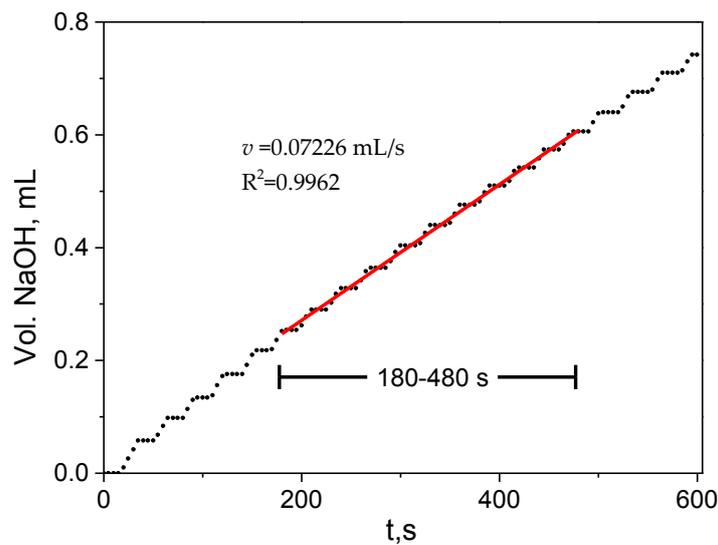


Figura 3-2. Curva de valoración y regresión lineal realizada para el cálculo de la velocidad media de adición ' v ' obtenida de la hidrólisis de tributirina mediante PFL. Condiciones de operación: pH = 7, $e_{exp} = 0.2 \text{ g/L}$, $[\text{NaOH}] = 0.05 \text{ M}$.

El ácido butírico producido al hidrolizarse la tributirina tiene un pK_a de 4.82 (Pubchem), con lo cual trabajando a pH 7 (o mayores) se puede considerar que los moles de ácido valorados equivalen a los moles hidrolizados. Además, para que este método sea válido la velocidad media de adición ' v ' debe permanecer constante durante todo el intervalo en el que se considera (entre los 180 y los 480 s de hidrólisis)

En la Tabla 3-4 se muestra la actividad enzimática y el contenido en proteína medido de las tres lipasas estudiadas bajo las condiciones previamente descritas:

Tabla 3-4. Propiedades de los preparados comerciales de lipasas utilizados para la hidrólisis de aceites vegetales.

Lipasa	Actividad enzimática (LU/g)	Contenido proteína (%)	Actividad (LU/g proteína)
TLL	93982 ± 549	3.28 ± 0.18	2.87·10 ⁶
PFL	18737 ± 817	8.77 ± 0.48	2.14·10 ⁵
PPL	61948 ± 2113	55.20 ± 3.05	1.12·10 ⁵

3.2.3. Medida de la actividad enzimática en función del pH del medio y de la concentración de enzima

Las condiciones estándar de las medidas de actividad lipásica se varían para estudiar el efecto del pH y la concentración de enzima sobre la actividad enzimática. Para ello se procedió de la forma siguiente:

a) Estudio de la influencia del pH:

Con este fin se ajusta el punto de consigna del valorador automático al pH deseado. Dependiendo de la actividad que presenten las enzimas será necesario utilizar disoluciones del agente valorante más concentradas y/o ajustar los parámetros del valorador. En la Tabla 3-5 se detallan las condiciones de operación para todo el rango de pH estudiado:

Tabla 3-5. Parámetros fijados en el valorador automático y concentración de la disolución valorante (mol/L) en función del pH.

pH	[NaOH], mol /L	Modo SET			Modo STAT		
		gamma regulación	Vel. max (mL/min)	Vel. min (µL/min)	gamma regulación	Vel. max (mL/min)	Vel. min (µL/min)
6	0.05	0.15	0.1	5	0.05	0.20	15
7	0.05	0.15	0.1	5	0.05	0.20	15
8	0.05	0.15	0.1	10	0.15	0.30	15
9	0.05	0.15	0.2	10	0.15	0.35	18
10	0.5	0.15	0.05	15	0.15	0.05	10
11	0.5	0.15	0.1	15	0.15	0.05	10
12	0.5	0.15	0.40	15	0.15	0.80	15

b) Estudio de cobertura interfacial:

Este estudio se realiza para encontrar la concentración de enzima a la cual se satura la interfase aceite agua. Se lleva a cabo variando la concentración de la disolución de enzima que se añade al inicio de la reacción de hidrólisis desde 1 mg/L hasta 3.75 g/L. Los demás parámetros se mantienen igual a los descritos previamente, salvo la concentración de la disolución valorante, que se ajusta en función de la concentración de enzima usada.

Además, el procedimiento para el cálculo de la actividad enzimática al descrito en la Ecuación (3-2) requiere una modificación. Esto se debe a que a concentraciones altas de enzima la velocidad media de adición ' v ' no se mantiene constante durante el periodo de tiempo considerado.

Es por ello que el cálculo de la actividad enzimática se hace considerando las velocidades iniciales de reacción, según el método descrito por (Jurado y col., 2006). Mediante este método se estima la velocidad inicial de reacción tomando los primeros datos de la curva de valoración y realizando un ajuste por mínimos cuadrados. Para decidir el número de datos experimentales a utilizar se van incorporando datos hasta que el valor de la pendiente obtenida comienza a decrecer. La velocidad inicial de reacción se calcula a partir del valor de la última pendiente obtenida antes de que esto ocurra. A partir del valor de la pendiente y teniendo en cuenta la concentración molar de la solución de valorante y el volumen total de reacción (16 mL), se puede calcular la velocidad inicial de reacción (Ecuación 3-3):

$$r_0 = \frac{\alpha_0 \cdot [NaOH] \cdot 10^3}{16 \cdot 10^{-3}} \text{ 'L} \cdot \text{min} \frac{\mu\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{min}} \quad (3-3)$$

siendo:

α_0 , la pendiente de la recta obtenida al ajustar los datos de la curva de valoración, en mL/min

$[NaOH]$, la concentración de la solución de valorante, en mol/L

r_0 , velocidad inicial de reacción

La Figura 3-3 muestra un ejemplo de este cálculo:

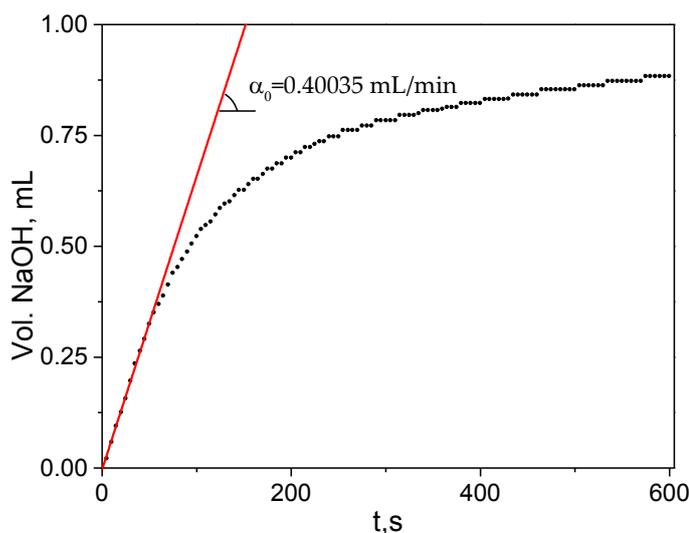


Figura 3-3. Cálculo de la velocidad inicial de hidrólisis para TLL a alta concentración. Condiciones experimentales: $e_{exp} = 2 \text{ g/L}$, $\text{pH} = 7$, $[\text{NaOH}] = 0.5 \text{ M}$.

3.3. Hidrólisis enzimática de aceite

A continuación se detallan todos los procedimientos experimentales empleados para la hidrólisis enzimática de aceite, distinguiendo dos sistemas distintos: emulsiones de aceite en agua (O/W) y micelas inversas.

3.3.1. Emulsiones O/W

3.3.1.1. Preparación de la emulsión

En las emulsiones O/W la fase dispersa es cualquiera de los tres aceites mencionados previamente (MC, AR-1 o AR-2) y la fase continua una disolución de emulsionante en tampones fosfato o carbonato 0.5 M, en función del pH de trabajo. Como emulsionante se usaron Glucopton 600 (G600), un tensioactivo no iónico del grupo de los alquilglucósidos y Goma Arábica (GA).

Las emulsiones se preparan en tubos Pírex de 50 mL de capacidad y 1.9 cm de diámetro interno. El volumen total de la emulsión preparada fue de 15 mL. Inicialmente se realiza una mezcla previa del aceite y la fase acuosa (que contiene el

emulsionante) mediante dispersión mecánica con un Ultra Turrax T25 a 13000 rpm durante 5 segundos. La emulsificación en sí se lleva a cabo a continuación por medio de ultrasonidos. Para ello se usó un sonicador Q500 (Q Sonica, Connecticut, EE. UU.), de 500 W de potencia y provisto de una micro sonda de 6 mm de diámetro, la cual queda sumergida 1.5 veces su diámetro dentro del líquido. La amplitud del sonicador se fija en un 75 % del máximo en todos los casos, y se trabajó en periodos de 20 s de funcionamiento y 10 s de reposo hasta aplicar la energía deseada.

Se controlaron tres variables durante la preparación de las emulsiones O/W:

- Fracción volumétrica de fase grasa en la emulsión : Φ , v/v
- Masa de emulsionante por unidad de volumen de fase grasa: S, mg/mL
- Energía aplicada durante la sonicación por unidad de volumen de fase grasa: E, J/mL

La cantidad de energía aplicada se controló mediante el tiempo de sonicación. La Figura 3-4 muestra la energía aplicada por el sonicador en función del tiempo. En base a la recta patrón obtenida (Ecuación 3-4)(3-4) se calculó el tiempo de sonicación necesario para un valor dado de 'E':

$$E = 18.57 \cdot t; R^2 = 0.999 \quad (3-4)$$

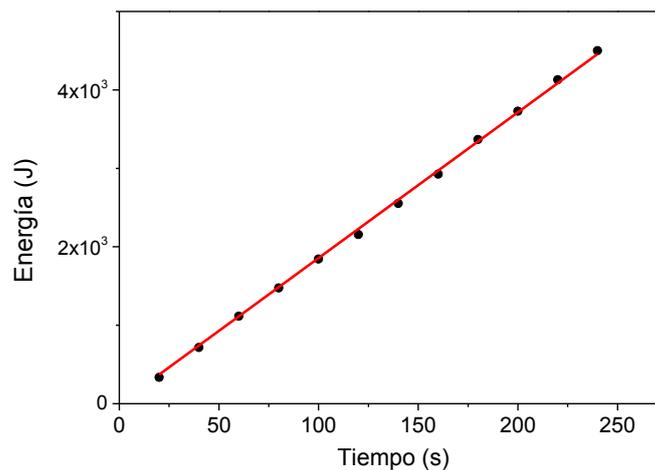


Figura 3-4. Energía aplicada por el sonicador en función del tiempo

3.3.1.2. Optimización de las condiciones de emulsificación

Se han optimizado las condiciones de emulsificación mediante un diseño de experimentos factorial de tres variables a tres niveles (3^3). Las tres variables estudiadas son las mencionadas anteriormente: ' Φ ', ' S ' y ' E '. Los niveles de cada una de estas variables se indican en la Tabla 3-6. Esta optimización se llevó a cabo usando como emulsionante tanto G600 como GA y a pH 7.

Tabla 3-6. Niveles usados para las tres variables estudiadas durante el proceso de optimización de las emulsiones O/W.

		Niveles		
		-1	0	1
G600	Φ	0.05	0.1	0.15
	S	10	20	30
	E	750	1000	1250
GA	Φ	0.05	0.1	0.15
	S	50	100	150
	E	750	1000	1250

Los tiempos de sonicación necesarios para aplicar la energía requerida para cada nivel de E se muestran en la Tabla 3-7:

Tabla 3-7. Tiempo de sonicación (en segundos) aplicado para pareja de valores Φ -E.

E, J/mL	Φ		
	0.05	0.10	0.15
750	32	62	92
1000	42	82	122
1250	52	102	152

Las dos respuestas consideradas para la optimización fueron el diámetro medio de las gotas en la emulsión (d_m , nm) y la estabilidad de la misma.

La distribución de tamaños de las partículas emulsionadas se determinó mediante un Z-Sizer Nano (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Las muestras fueron diluidas 40 veces previamente a la medida. La Figura 3-5 muestra unas de las distribuciones de tamaño obtenidas:

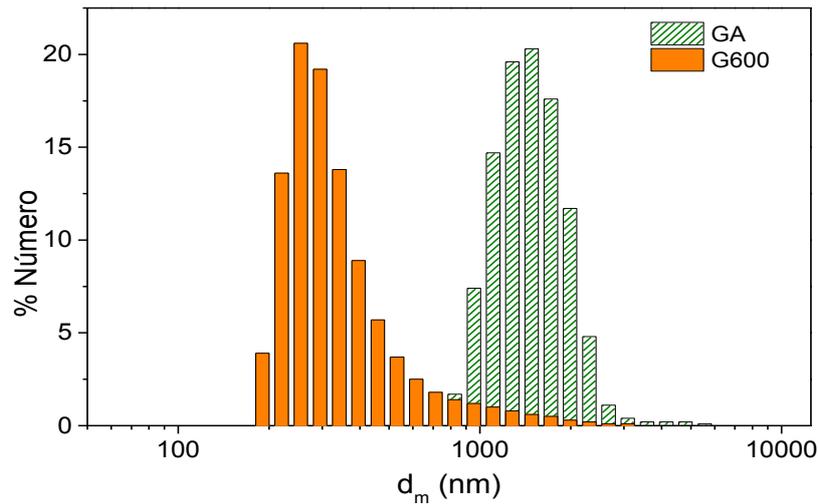


Figura 3-5. Distribución en % en número del diámetro de las gotas en emulsiones preparadas con la MC y usando GA y G600 como emulsionantes. Condiciones de preparación: $\Phi=0.15$, $E=1250$ J/mL y $S= 150$ y 30 mg/L para emulsiones preparadas con GA y G600 respectivamente.

La estabilidad de la emulsión se estudió mediante un LUMiCheck (LUM, Berlín, Alemania), dispositivo que mide el porcentaje de luz reflejada en el fondo de cubetas de fondo inclinado. De esta manera al producirse la desestabilización de la emulsión, que sucede por cremado, la luz reflejada en el fondo de la cubeta decrece. En la Figura 3-6 se representa dos de los perfiles de desestabilización en función del tiempo obtenidos:

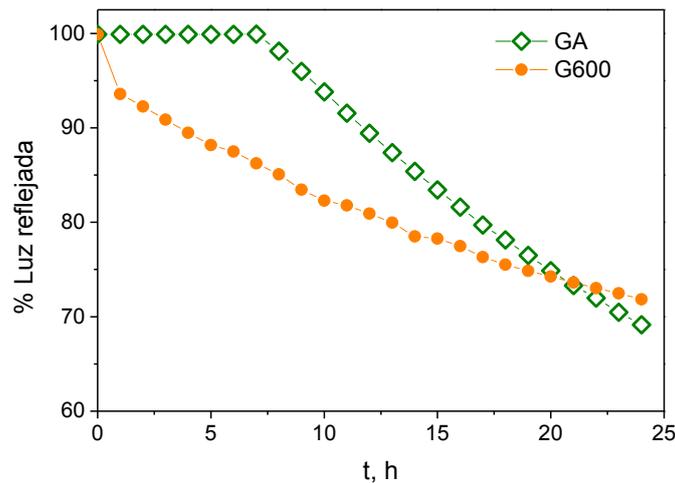


Figura 3-6. Perfiles de desestabilización obtenidos para emulsiones preparadas con GA y G600, siendo $\Phi=0.15$, $E=1250$ J/mL y $S= 150$ y 30 mg/L.

A partir de estos perfiles se define un índice de estabilidad (IE) como el resultado del cociente entre el back-scattering (BS) de una emulsión a los 15 minutos de haber sido preparada por el valor a tiempo cero (Ecuación 3-5). Mayores valores de IE corresponderán a emulsiones más estables.

$$IE = \frac{BS_{15}}{BS_0} \quad (3-5)$$

3.3.1.3. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis de aceites vegetales en emulsión O/W se llevó a cabo con emulsiones preparadas en las condiciones óptimas encontradas en la etapa anterior. Estas han sido:

Tabla 3-8. Condiciones de emulsificación para la hidrólisis enzimática en emulsiones O/W.

	GA	G 600
Φ	0.15	0.15
S	100	20
E	1000	1000

Para mantener constante el pH de la emulsión durante la hidrólisis se utilizó una disolución tampón, pues de otra manera los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis provocarían su descenso. Se ha trabajado al pH óptimo de cada enzima, entre 8 y 10, utilizando tampones de fosfato y carbonato 0.5 M respectivamente.

Además, se ha estudiado el efecto de la presencia de iones Ca^{2+} en el medio, ya que las sales cálcicas de los ácidos grasos, formadas en su presencia, son muy insolubles y precipitan, retirando de esta forma los ácidos grasos del medio. La concentración de Ca^{2+} en el medio se fijó en 0.47 mol/L, equivalentes a la cantidad total de enlaces éster presentes en el volumen de emulsión utilizado. Para alcanzar dicha concentración se añadió a la emulsión la cantidad necesaria de $CaCl_2$.

Una vez preparada la emulsión se transfieren 10 mL de la misma a matraces Erlenmeyer de 50 mL que se colocan en un agitador orbital a 37°C y 120 rpm. Tras

5 minutos de estabilización térmica se añaden 0.5 mL de disolución de lipasa de 21 g/L, de manera que la concentración en el medio sea de 0.25 g/L (valor establecido con la ayuda de los experimentos de cobertura interfacial). Transcurrido el tiempo deseado, la reacción se detiene añadiendo 0.5 mL de HCl 6 N.

Por último se extraen los productos de reacción (FFA, MAG, DAG y TAG). Para ello se añaden 20 mL de acetato de etilo al matraz y se agita vigorosamente durante 10 min con un agitador magnético. Tras esto se centrifuga la mezcla a 9000 rpm durante 30 min. La fase superior contiene todos los productos de reacción, y se utiliza para las determinaciones posteriores (de ácidos grasos libres y glicéridos), mientras que la fase acuosa es descartada.

3.3.2. Micelas inversas

3.3.2.1. Preparación de las micelas inversas

Las micelas inversas constituyen un sistema isotrópico y estable termodinámicamente (microemulsión). En ellas, minúsculas vesículas acuosas conteniendo la enzima se encuentran dispersas en una fase orgánica compuesta por una solución de aceite (AR-1, AR-2 o la MC) en isooctano. Para la formación de las micelas es necesaria la presencia de un tensioactivo, para lo cual se utilizó el dioctilsulfosuccinato de sodio, o AOT, en una concentración de 50 mM. Según trabajos previos, el isooctano y el AOT muestran los mejores resultados cuando el objetivo es la hidrólisis del aceite contenido en la fase orgánica (Naoe y col., 2004; Park y col., 2013). Es por ello que se seleccionan como disolvente y surfactante respectivamente. Como fase acuosa se ha usado una disolución buffer Tris 0.02 M pH 8 en la que se encuentra disuelta la lipasa a la concentración seleccionada.

Las microemulsiones se preparan dentro de tubos Pírex de 15 mL de capacidad y 15 mm de diámetro interno. La cantidad deseada de fase acuosa se añade sobre 1.25 mL de fase orgánica (en la que se encuentra disuelto el AOT) y se agita durante 10 s en un vortex.

El efecto de los dos siguientes parámetros en la formación del sistema de micelas inversas fue estudiado:

- Fracción volumétrica de aceite en la fase grasa: Φ_R , v/v. Variando entre 0.1 y 1.0.
- Relación molar agua/AOT: parámetro conocido como W_0 (mol/mol). Sus valores se establecieron manteniendo constante la concentración de AOT en la fase orgánica en 50 mM y variando la cantidad de fase acuosa añadida. Así se trabajó en valores de W_0 comprendidos entre 6.67 y 44.44.

3.3.2.2. Diagrama de fases

Se ha realizado un estudio fásico del sistema pseudoternario agua/aceite/isooctano en presencia de AOT. Para ello se ha construido un diagrama de fases variando los parámetros Φ_R y W_0 . De esta manera y por inspección visual se identifican tres zonas:

- Una zona isotrópica, correspondiente a la microemulsión propiamente dicha, de aspecto transparente,
- Una zona de transición de aspecto ligeramente turbio o azulado.
- Una región multifásica, en la cual la cantidad de agua es demasiado elevada como para poder ser incorporada en las micelas y que presenta un aspecto turbio.

Las fases se han identificado mediante observación visual (turbidez, viscosidad) y mediante birrefringencia. La región de microemulsión se considera aquella en la que se obtiene un fluido transparente, isotrópico y no birrefringente, el cual permanece estable en estas condiciones.

3.3.2.3. Hidrólisis enzimática

Previamente al comienzo de la hidrólisis se termostatiza la fase orgánica a 37 °C. La hidrólisis da comienzo en el momento en el que se forma la microemulsión al añadir la fase acuosa conteniendo la enzima. Transcurrido el tiempo deseado se desactiva la enzima colocando el tubo en agua en ebullición durante 10 min.

Al encontrarse los productos de reacción mayoritariamente en la fase orgánica no es necesario realizar ningún tipo de extracción para las determinaciones posteriores, considerando a este efecto despreciable la cantidad de fase acuosa en el volumen total de emulsión.

3.3.3. Determinación colorimétrica de los FFA

Los ácidos grasos libres se determinaron por el método de Kwon y Rhee (1986), basado en la detección colorimétrica de su sal cúprica. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Se colocan 5 mL de muestra en un tubo de ensayo.
- El rango de detección del método está comprendido entre 0.3 y 11 mM, por lo que si es necesario previamente se realizará la dilución oportuna. Las diluciones se harán con acetato de etilo o isoctano dependiendo de si las muestras proceden de una emulsión O/W o la microemulsión.
- Se añade 1 mL de disolución de 50 g/L de acetato de cobre (II) 1 hidrato cuyo pH se ha ajustado previamente a 6.1 con piridina.
- Se agita vigorosamente durante 90 s en vórtex, de modo que se forme la sal cúprica de los ácidos grasos.
- Se deja reposar durante 10 min y se mide la absorbancia a 705 nm de la fase orgánica.

Como se han usado dos disolventes diferentes, acetato de etilo e i-octano, según la procedencia de la muestra, ha sido necesario realizar dos rectas de calibrado, una con cada disolvente (Figura 3-7). En estas se ha utilizado ácido oleico puro como patrón

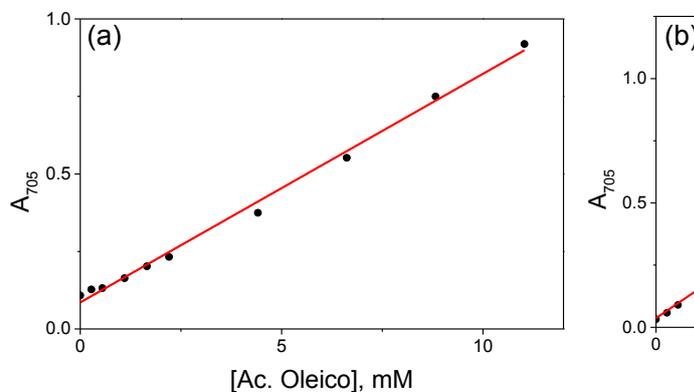


Figura 3-7. Rectas patrón para la cuantificación colorimétrica de los AGL obtenidas con ácido oleico en acetato de etilo (a) e isoctano (b).

Obteniéndose los siguientes parámetros de las regresiones lineales realizadas:

Tabla 3-9. Parámetros de las rectas patrón obtenidas con ácido oleico mediante detección colorimétrica de su sal cúprica.

	O.O.	Pendiente	R ²
Acetato de etilo	0.086	0.074	0.996
Isoctano	0.039	0.109	0.998

3.3.4. Identificación y cuantificación de MAG, DAG y TAG mediante UPLC/MS

Para conocer adecuadamente la distribución de productos de reacción se analizaron las muestras tomadas mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS). Las condiciones de operación fueron las siguientes:

- Se coloca la muestra en un vial y se deja evaporar el disolvente (acetato de etilo o isoctano)
- Se añade 1 mL de metanol.
- El dispositivo de UPLC empleado fue el modelo Acquity de Waters, equipado con una columna BEH C-18 (Waters) de 10 cm de longitud y 1.7 μm de tamaño de partícula, operando a 55 °C. Se usaron dos fases móviles:
 - Fase A: agua/acetonitrilo 60/40 en volumen, con formiato de amonio 10 mM y ácido fórmico 1 g/L.
 - Fase B: alcohol isopropílico/acetonitrilo 90/10 en volumen, con formiato de amonio 10 mM y ácido fórmico 1 g/L.
- El volumen de inyección fue de 5 μL .
- El caudal total de fase móvil fue de 0.3 mL/min. Cada medida tiene una duración total de 25 min, siendo el gradiente de ambas fases el siguiente:
 - Minutos 0 a 15: 75 a 15 %v de A
 - Minutos 15 a 18.5: caudal de A constante en 15 %v
 - Minutos 18.5 a 18.85: 15 a 75 % de A
 - Minutos 18.85 a 25: caudal de A constante en 75 %v
- El cromatógrafo está acoplado a un detector de masas modelo Xevo-TG-S de Waters. Opera en modo “SCAN” detectando moléculas con pesos moleculares comprendidos entre 50 y 1500 unidades de masa atómica. Otras condiciones de funcionamiento del mismo han sido:

- Voltaje del capilar: 3 kV
- Temperatura de la fuente de iones: 100 °C
- Temperatura de desolvatación: 500 °C
- Caudal del gas de desolvatación: 800 L/h

Como estándares se utilizaron patrones de tri, di y monooleína calidad HPLC. A partir de ellos se elaboraron las rectas patrón que se muestran en la Figura 3-8, utilizadas para cuantificar MAG, DAG y TAG respectivamente:

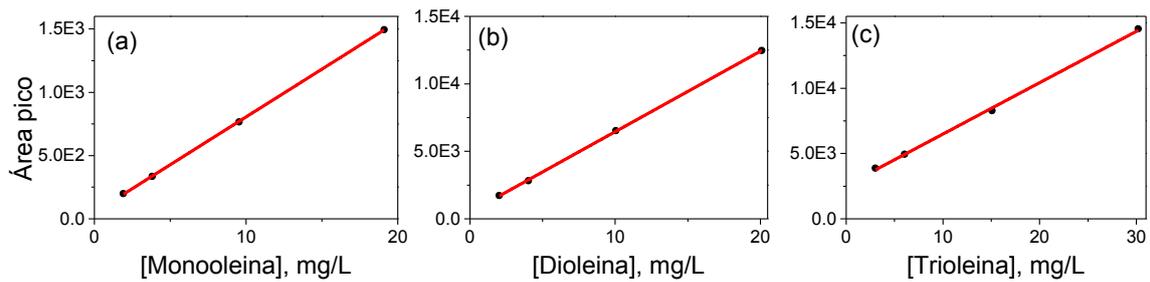


Figura 3-8. Rectas patrón de monooleína, dioleína y trioleína utilizadas para la cuantificación de MAG, DAG y TAG respectivamente.

Los parámetros obtenidos de la regresión lineal de estos datos son los siguientes:

Tabla 3-10. Parámetros de las rectas patrón de glicéridos medidos en UPLC/MS

	O.O.	Pendiente	R ²
Monooleína	50.02	75.52	1
Dioleína	494.63	596.02	1
Trioleína	2559.00	393.05	0.999

A continuación se presenta un cromatograma en el que se detallan los tiempos de retención correspondientes a MAG, DAG y TAG.

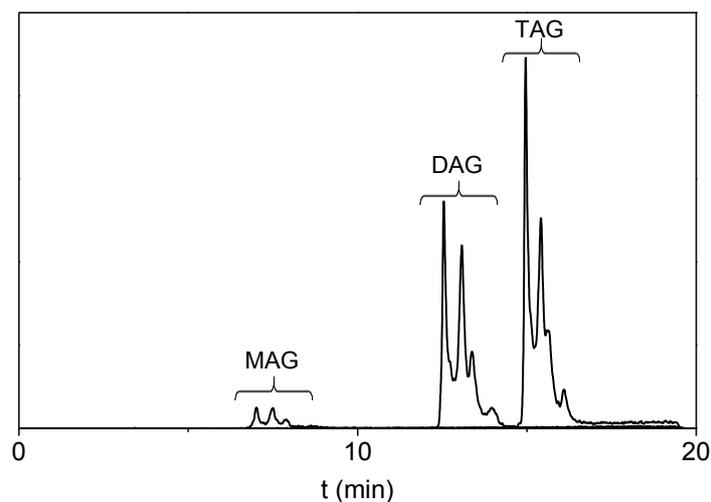


Figura 3-9. Cromatograma obtenido por UPLC/MS para los patrones de mono-, di- y trioleína.

Los distintos glicéridos se identifican por el peso molecular de los mismos más un ion $[\text{NH}_4]^+$ con el que se conjuga al colisionar con el detector de masas. La Tabla 3-11 indica todas las especies detectadas junto con su tiempo de retención aproximado. La cuantificación se lleva a cabo filtrando la información del cromatograma para que muestre solamente la señal correspondiente a cada una de las especies e integrando el área del pico obtenido.

Tabla 3-11. Glicéridos detectados, tiempo de retención aproximado en el sistema y peso del ión molecular formado con $[\text{NH}_4]^+$. X, XX y XXX representan los MAG, DAG y TAG respectivamente, compuestos por ácido esteárico (E), ácido palmítico (P), ácido oleico (O) y ácido linoleico (L)

Especie	T.R. (min)	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	Especie	T.R. (min)	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$
L	6.22	372.31	OLP	14.97	874.79
P	6.98	348.31	LLE-OOL	15.01	900.80
O	7.03	374.33	PPP	15.15	824.77
E	7.96	376.34	PPE	15.15	852.80
LL	11.84	634.54	PPO	15.17	850.79
PL	12.18	610.54	OOP	15.19	876.80
PP	12.26	586.54	LPE	15.19	876.80
OL	12.26	636.56	OOO-EOL	15.20	902.82
PO	12.58	612.56	EEP	15.41	880.83
OO-EL	12.64	638.57	EEO	15.41	906.85
EO	13.08	640.59	PEO	15.41	878.82
LLL	14.56	896.77	EEL	15.42	904.83
LLP	14.75	872.77	OOE	15.42	904.83
LLO	14.78	898.79	EEE	15.64	908.87
PPL	14.95	848.77			

3.4. Producción de biosurfactantes

La obtención de biosurfactantes (ramnolípidos y surfactina) se ha llevado a cabo mediante fermentación en medio líquido de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Bacillus subtilis* N1 respectivamente. A continuación se describen todo el proceso seguido.

3.4.1. Cultivos

Se han utilizado dos medios de cultivo: PPGAS y MSM, preparados en agua destilada. Su composición se detalla en las Tabla 3-12 Tabla 3-13:

Tabla 3-12. Composición del medio de cultivo PPGAS

Componente	g/L
Tris-HCl	19
Peptona	10
Glucosa	5
NH ₄ Cl	1
KCl	1.5
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.82

Tabla 3-13. Composición del medio de cultivo MSM

Componente	g/L	Elementos traza	mg/L
Glucosa*	20	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.7
NaNO ₃	2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.13	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.5
KH ₂ PO ₄	0.7	H ₃ BO ₃	0.26
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.4	Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0.06
CaCl ₂ ·2H ₂ O*	0.1		
FeSO ₄ *	0.001		

*Estos componentes se preparan en disoluciones por separado y son esterilizados por filtración, en lugar de autoclavarlos con el resto. Se añaden directamente al matraz en el que se realice el cultivo.

Las fermentaciones llevadas a cabo constan de tres etapas, correspondiendo dos de ellas a cultivos siembra. Con el primer cultivo siembra se pretende favorecer el crecimiento rápido de los microorganismos, mientras que el objetivo del segundo es

habituarse a los microorganismos al medio salino en el que se desarrollará la fase final del cultivo, destinada a la obtención de los biosurfactantes. Estas tres etapas se detallan a continuación:

- **Siembra 1 (S1):** 20 mL de medio PPGAS en un matraz Erlenmeyer de 250 mL se inoculan con uno de los inóculos almacenados en tubos Eppendorf. Se mantiene a 37 °C y 160 r.p.m. en un agitador orbital durante 24 h.
- **Siembra 2 (S2):** una vez finalizado S1, se colocan 47.5 mL de medio MSM un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se inocula con 2.5 mL de S1. Se mantiene a 37 °C y 160 r.p.m. en un agitador orbital durante 24 h.
- **Cultivo final (producción de biosurfactante):** el medio usado es MSM, sustituyendo la fuente de carbono (glucosa 20 g/L) por otras fuentes de carbono alternativas y a distintas concentraciones. Se lleva a cabo en matraces Erlenmeyer de 1 L, siendo inoculados con un 5 %v de S2 hasta un volumen final de 100 mL. Los matraces se mantienen a 37 °C y 160 r.p.m. el tiempo fijado para el experimento.

Las fuentes de carbono utilizadas en el cultivo final han sido las siguientes:

- Glicerina
- Aceite residual de fritura AR-1
- Glucosa
- Alpeorujos crudos (ALP)
- Alpeorujos hidrolizados enzimáticamente (AHE), con ácido (AHA) y alpeorujos hidrolizados con un pretratamiento ácido suave seguido de una hidrólisis enzimática (APHE).

El pH de todos los medios de cultivo se ajusta a 7, siendo autoclavados (121 °C, 20 min) previamente a su uso. Todas las inoculaciones se llevan a cabo en una campana de flujo laminar.

3.4.2. Hidrólisis del alpeorujos

El objetivo de este tratamiento es hidrolizar el material celulósico y hemicelulósico presente en el alpeorujos. De esta manera se liberarán azúcares solubles, quedando biodisponibles para ser usados como fuente de carbono en los cultivos de microorganismos. Se ha llevado a cabo la hidrólisis por tres métodos distintos:

3.4.2.1. Hidrólisis enzimática

Se coloca en primer lugar la cantidad de alpeorujos crudos a hidrolizar (la necesaria para el experimento de fermentación posterior) en un frasco Pírex de 100 mL y se añaden 50 mL de tampón acetato 50 mM a pH 5. Posteriormente se añaden las enzimas en las siguientes cantidades:

- Celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921: 120 μ L (2000 U/L en el medio de hidrólisis)
- Viscozyme[®] L: 120 μ L (285 U/L en el medio de hidrólisis)
- Xilanasa de *Termomyces lanuginosus*: 20 mg (1000 U/L en el medio de hidrólisis)

La mezcla se mantiene en un agitador orbital a 50 °C y 180 rpm durante 72 horas.

3.4.2.2. Pretratamiento ácido más hidrólisis enzimática

Con este pretratamiento ácido suave se pretende favorecer la posterior etapa de hidrólisis enzimática. Para ello se coloca la cantidad de alpeorujos a hidrolizar en un frasco Pírex de 100 mL junto con 50 mL de H₂SO₄ 0.5 %v/v y se autoclava a 125 °C durante 30 min. Posteriormente se enfría y ajusta el pH a 5 usando una disolución de NaOH concentrada.

Una vez terminado el pretratamiento la hidrólisis enzimática transcurre como se ha descrito previamente.

3.4.2.3. Hidrólisis química

El procedimiento seguido se basa en el método descrito por Sluiter y col. (2011) para la determinación estructural de carbohidratos y ligninas en biomasa. Con él se pretende alcanzar el mayor grado de hidrólisis posible mediante una hidrólisis ácida.

Para ello se colocan 2 g de alpeorujos crudos en un tubo Pírex de 50 mL y se añaden 1.92 mL de H₂SO₄ (97 % de pureza). Se incuba a 30 °C durante 60 min, agitando suavemente cada 5 minutos. Tras esto se diluye la mezcla con agua destilada hasta un

volumen final de 85 mL y se autoclava a 125 °C durante 60 min. Finalmente se ajusta el pH a 7.

Una vez se obtiene el alpeorujo hidrolizado por cualquiera de los métodos descritos se añaden las sales del medio de cultivo (MSM), se ajusta el volumen a 100 mL y se autoclava, quedando el medio preparado para el inicio del cultivo.

3.4.3. Procesado del caldo de cultivo

El crecimiento celular se ha determinado gravimétricamente. Para ello se toman muestras de 1 mL en tubos Eppendorf (de masa conocida) y se centrifugan a 10⁵ g durante 15 min y a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y los pellets obtenidos se secan a 105 °C durante 24 h, determinándose su masa seca por diferencia de pesadas. La medida se hace por triplicado para cada cultivo.

En los casos en los que se utiliza alpeorujo como fuente de carbono se resta al peso seco obtenido el de un experimento control realizado sin inocular microorganismo. De esta manera se tienen en cuenta los sólidos en suspensión del propio alpeorujo.

El resto del medio se centrifuga en tubos Falcon de 50 mL a 10⁵ g durante 15 min y a 4 °C, descartándose en este caso la fase sólida. Se mide la tensión superficial del sobrenadante mediante la técnica de la placa de Wilhelmy en un tensiómetro modelo K 10 ST de la casa Kruss (Hamburgo, Alemania).

3.4.4. Extracción del biosurfactante

El biosurfactante se extrae del sobrenadante obtenido tras la centrifugación del caldo de cultivo. Se ha seguido para ello el método descrito por Smyth y col. (2010), que consta de los siguientes pasos:

- Se toman 50 mL de sobrenadante y se ajusta su pH a 2 con HCl 6 N.
- Se mezcla vigorosamente con el mismo volumen de acetato de etilo durante 30 s en un embudo de decantación.
- Se espera el tiempo necesario hasta la completa separación de fases, las cuales se recuperan por separado.
- Los dos pasos previos se repiten tres veces.

- Se unen las tres fases orgánicas y se añade una pequeña cantidad de $MgSO_4$ para eliminar restos de agua.
- Se evapora el acetato de etilo en un rotavapor.
- El extracto crudo se disuelve en 10 mL de metanol y se transfiere a viales de vidrio de peso conocido. El metanol se evapora a temperatura ambiente y se determina el peso del extracto crudo.

3.4.5. Medida de los azúcares disueltos totales

Los azúcares solubles totales se determinan mediante el procedimiento del fenol/sulfúrico como se describe a continuación:

- Se colocan 0.5 mL de muestra de sobrenadante de medio de cultivo en un tubo Pírex de 15 mL. El rango de detección del método está comprendido entre los 10 y los 120 mg/L, de ser necesario se realizan diluciones con agua destilada.
- Se añaden 0.5 mL de una disolución de fenol 5 % v/v.
- Se añaden 2.5 mL ácido sulfúrico 95%.
- Se agita cuidadosamente y se deja enfriar 10 min.
- Se mide la absorbancia a 490 nm.

La recta patrón utilizada se prepara con glucosa (Figura 3-10), obteniéndose la siguiente ecuación mediante regresión lineal de los datos obtenidos:

$$A_{490} = 0.01605 + 0.00811 \cdot [Glucosa], R^2 = 0.995 \quad (3-6)$$

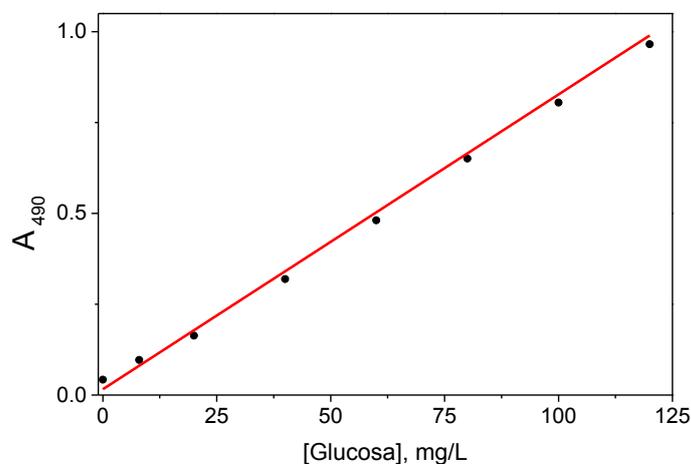


Figura 3-10. Recta patrón realizada con glucosa para la determinación de los azúcares solubles totales mediante el método fenol-sulfúrico.

3.4.6. Medida de los fenoles totales

Los fenoles totales se determinan mediante el método de Folin-Ciocalteu (Magina y col., 2010) como se describe a continuación:

- Se colocan 0.5 mL de muestra de sobrenadante de medio de cultivo en un tubo de ensayo. El rango de detección del método está comprendido entre los 15 y los 500 mg/L, de ser necesario se realizan diluciones con agua destilada.
- Se añaden 5 mL agua destilada.
- Se añaden 0.25 mL reactivo Folin-Ciocalteu.
- Se espera 3 minutos.
- Se añade 1 mL Na_2CO_3 saturado (100 g/L)
- Se espera 1 h.
- Se mide la absorbancia 725 nm.

La recta patrón utilizada se prepara con ácido gálico disuelto en metanol (Figura 3-11), obteniéndose la siguiente ecuación mediante regresión lineal de los datos obtenidos:

$$A_{725} = -0.01755 + 0.00635 \cdot [\text{Ácido gal.}], R^2 = 0.998 \quad (3-7)$$

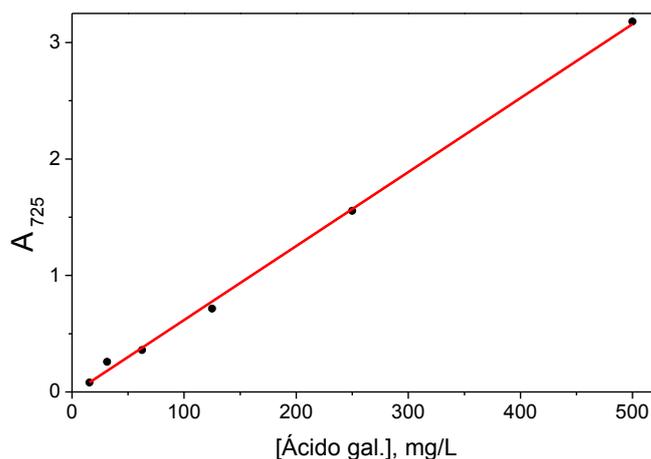


Figura 3-11. Recta patrón realizada ácido gálico para la determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

3.4.7. Identificación y cuantificación de los biosurfactantes obtenidos mediante UPLC/MS

Tanto la surfactina como los ramnolípidos se identifican y cuantifican mediante UPLC/MS. Las condiciones de operación son las siguientes:

- Las muestras, procedentes de la etapa de extracción con disolvente, se diluyen en un volumen conocido de metanol. El rango de detección del método está comprendido entre 0.8 y 4 mg/L para la surfactina y 0.5 y 3 mg/L para los ramnolípidos, de ser necesario se realizarán diluciones adicionales en metanol.
- El volumen de inyección es de 3 μ L.
- El dispositivo de UPLC empleado fue el modelo Acquity de Waters, equipado con una columna BEH C-18 (Waters) de 10 cm de longitud y 1.7 μ m de tamaño de partícula y operando a 40 °C.
- Se usan dos fases móviles, agua y acetonitrilo, en las siguientes proporciones:
 - Para surfactina: agua/acetonitrilo 20/80 (% volumen), ambas con 0.1% en peso de ácido fórmico
 - Para ramnolípidos: agua/acetonitrilo 70/30 (% volumen).
- El caudal total es de 0.5 mL/min.
- El detector MS trabaja en modo SIR, detectando solamente los pesos moleculares de las distintas especies de BS presentes. Opera en modo ES+ para surfactina, las cuales colisionan protonadas. Los ramnolípidos colisionan desprotonados, trabajando el detector en modo ES-. Otras condiciones de funcionamiento del mismo han sido:
 - Voltaje del capilar: 3 kV
 - Temperatura de la fuente de iones: 150 °C
 - Temperatura de desolvatación: 500 °C
 - Caudal del gas de desolvatación: 800 L/h

Como estándares se utilizaron patrones de surfactina y ramnolípidos calidad HPLC suministrados por Sigma. A partir de ellos se elaboraron las rectas patrón que se muestran en la Figura 3-12:

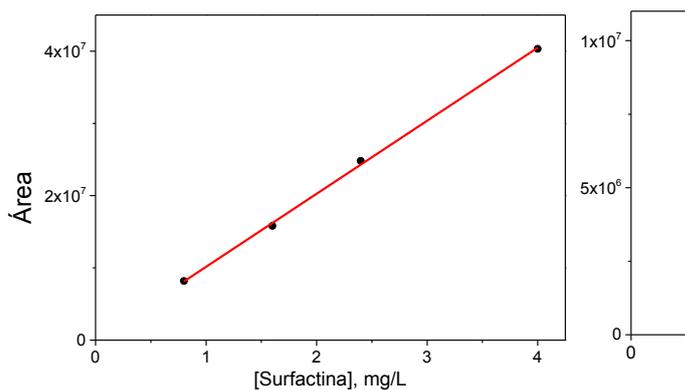


Figura 3-12. Rectas patrón de surfactina y ramnolípidos obtenidas mediante UPLC/MS.

Los parámetros obtenidos de la regresión lineal de estos datos son los siguientes:

Tabla 3-14. Parámetros de las rectas patrón de biosurfactantes medidos en UPLC/MS

	O.O.	Pendiente	R ²
Surfactina	$4.22 \cdot 10^4$	$1.01 \cdot 10^7$	0.9988
Ramnolípidos	$-1.21 \cdot 10^4$	$3.52 \cdot 10^6$	0.9991

Como se puede observar en la Tabla 3-15, cada especie de biosurfactante tiene un tiempo de retención distinto. Se han detectado 5 moléculas de surfactina distintas, atendiendo a la longitud del ácido graso, que oscila entre los 12 y 16 átomos de carbono. Por otro lado se distinguen 8 tipos distintos de especies de ramnolípidos, en función de su número de moléculas de ramnosa (1 o 2) y el tamaño de los dos ácidos grasos (de 8, 10 y 12 con o sin insaturación). Para elaborar la recta patrón se toma la suma del área de todas las especies, considerándose que el factor de respuesta es el mismo para todas.

Tabla 3-15. Congéneres de BS detectados por UPLC/MS, tiempo de retención en el sistema y peso del ion molecular.

Surfactina			Ramnolípidos		
Especie	T.R. (min)	[M+H] ⁺ , g/mol	Especie	T.R. (min)	[M-H] ⁻ , g/mol
C12	1.57	994.6	Rha-C8-C10	7.53	475.3
C13	1.94	1008.6	Rha-C10-C10	9.31-9.83	503.3
C14	2.66-2.87	1022.6	Rha-C10-C12:1	11.12	529.3
C15	3.65	1036.6	2 Rha-C8-C10	6.76	621.3
C16	5.60	1050.6	2 Rha-C8-C12:1	7.56	647.3
			2 Rha-C10-C10	8.31-8.76	649.3
			2 Rha-C10-C12:1	9.97	675.3
			2 Rha-C10-C12	10.96	677.3

A continuación se muestra un ejemplo de cromatograma obtenido para los patrones de surfactina y ramnolípidos:

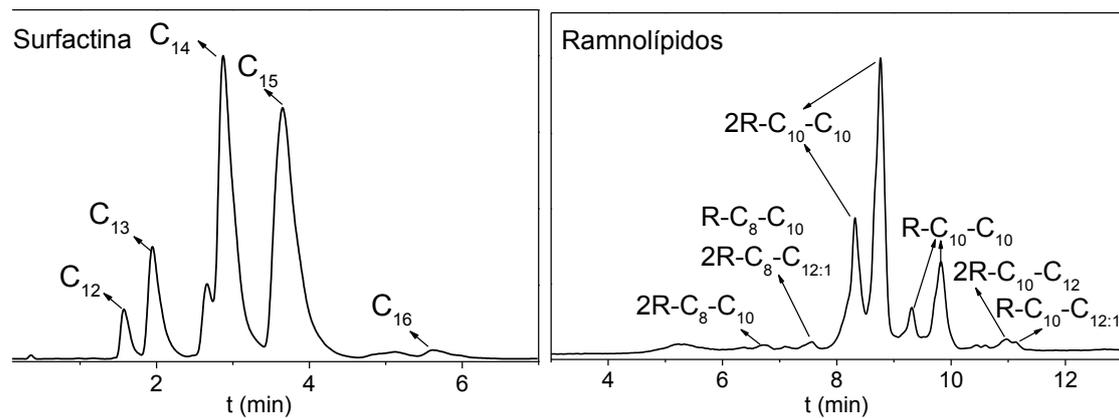


Figura 3-13. Cromatogramas obtenidos mediante UPLC/MS para los patrones de surfactina y ramnolípidos.

4. Resultados y discusión

Como se ha mencionado previamente, la presente Tesis Doctoral consta de dos líneas de investigación. Ambas están orientadas a la obtención de sustancias con propiedades interfaciales a partir de residuos oleosos, pero a su vez claramente diferenciadas. El primer Bloque de esta sección se centra en la hidrólisis enzimática del aceite usado. En el segundo se ha evaluado el uso del alpeorujo como fuente de carbono para la obtención de biosurfactantes.

A continuación se presentan los resultados más relevantes obtenidos, así como su discusión en interpretación.

Bloque I

En esta sección se presenta el estudio la hidrólisis enzimática de aceites usados en dos sistemas distintos: emulsión aceite en agua (O/W) y microemulsión (micelas inversas), con el objeto de establecer las mejores condiciones para la misma y conocer el efecto de las distintas variables en la conversión alcanzada y la distribución de los productos de reacción (ácidos grasos, mono y diglicéridos).

4.1. Hidrólisis enzimática de aceite usado en emulsiones O/W

Las emulsiones O/W constituyen el medio natural de acción de las lipasas y un sistema clásico para la hidrólisis enzimática de triglicéridos. En nuestro estudio se ha buscado establecer las condiciones de reacción idóneas para la hidrólisis de aceites usados en este sistema.

En primer lugar se han optimizado las condiciones de emulsificación de manera que se obtenga un sistema suficientemente estable para llevar a cabo la hidrólisis. En concreto se han optimizado la cantidad de aceite y de emulsionante así como la energía aplicada para la formación de la emulsión.

Posteriormente se han analizado varios parámetros relevantes durante la hidrólisis enzimática, tales como el tipo de lipasa y su concentración, el pH y la presencia de iones Ca^{2+} en el medio de reacción.

En este estudio se han utilizado dos aceites residuales de diferente procedencia, el primero procedente de un restaurante local, con una proporción aceite de girasol/aceite de oliva de 80/20 (AR-1), y el segundo suministrado por una empresa responsable del servicio de recogida de aceites usados, y de composición desconocida (AR-2). Como control se empleó una mezcla de aceites comerciales de grado alimentario (MC) en la misma proporción existente en el AR-1. En el capítulo de materiales y métodos, apartado 3.1.1, se ofrece una información detallada y la caracterización de los mismos. Además, en los experimentos se emplearon tres lipasas de origen diferente: fúngico (lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, TLL), bacteriano

(lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, PFL) y animal (lipasa de páncreas porcino, PPL). Detalles de las mismas se presenten en el apartado 3.1.3 del capítulo de materiales y métodos.

4.1.1. Optimización de las condiciones de emulsificación

Para la optimización se ha usado un diseño experimental de tres factores y tres niveles para encontrar las mejores condiciones de emulsificación, que serán usadas posteriormente en la reacción de hidrólisis. Las variables analizadas han sido tres:

- Fracción volumétrica de aceite (Φ)
- Relación emulsionante/aceite (S , mg/mL)
- Energía aplicada por unidad de volumen de aceite (E , J/mL)

A su vez se ha ensayado con dos emulsionantes distintos, GlucoPON 600 (G600) y goma arábiga (GA). Los tres niveles estudiados se muestran a continuación:

Tabla 4-1. Niveles usados en el diseño experimental para la optimización de las condiciones de emulsificación.

Emulsionante	Factor	Nivel		
		-1	0	1
G600	Φ	0.05	0.1	0.15
	S	10	20	30
	E	750	1000	1250
GA	Φ	0.05	0.1	0.15
	S	50	100	150
	E	750	1000	1250

Φ : fracción volumétrica de aceite; S : mg de emulsionante/mL aceite; E : Julios/mL de aceite.

Como variables respuesta se han escogido el área interfacial específica y la estabilidad a corto plazo de las emulsiones preparadas. El área interfacial específica de una emulsión (a) puede calcularse mediante el diámetro medio de las gotas en emulsión (diámetro de Sauter, $d_{3,2}$) y el volumen de fase dispersa (Φ), mediante la Ecuación (4-1):

$$a = \frac{6 \cdot \Phi}{d_{3,2}}, \text{ cm}^2/\text{mL} \quad (4-1)$$

Para evaluar la estabilidad a corto plazo se define un índice de estabilidad (IE) dividiendo el back-scattering (BS) de una emulsión a los 15 minutos de haber sido preparada por el valor a tiempo cero (Ecuación 4-2). Mayores valores de IE corresponderán a emulsiones más estables.

$$IE = \frac{BS_{15}}{BS_0} \quad (4-2)$$

Se ha usado la metodología de Superficie de Respuesta para analizar los datos obtenidos. De esta manera, los resultados de cada respuesta se ajustaron a una ecuación polinómica de primer orden, considerando también términos de interacción entre las parejas de variables y un término independiente:

$$a \text{ (o IE)} = a_1 \cdot \Phi + a_2 \cdot S + a_3 \cdot E + a_4(\Phi \cdot S) + a_5(\Phi \cdot E) + a_6(S \cdot E) + \beta \quad (4-3)$$

Donde a_i representa el coeficiente asociado a cada factor o término de interacción y β el término independiente.

La significancia de cada factor se evaluó por el p-valor asociado a cada coeficiente. Las Figuras 4-1 y 4-2 muestran los valores de los coeficientes obtenidos para cada una de las variables respuesta en un primer ajuste del modelo, así como sus intervalos de confianza. Los factores o interacciones cuyos intervalos de confianza corten al eje de abscisas no serán significativos.

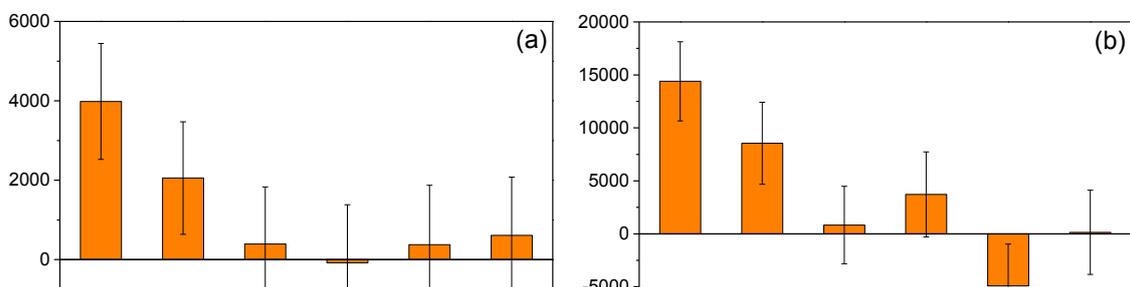


Figura 4-1. Valores e intervalos de confianza de los coeficientes a_i asociados a los distintos factores e interacciones del modelo propuesto en la Ecuación (4-3) para el área interfacial específica, obtenidos tras el primer ajuste del modelo. Emulsiones preparadas con (a) GA y (b) G600.

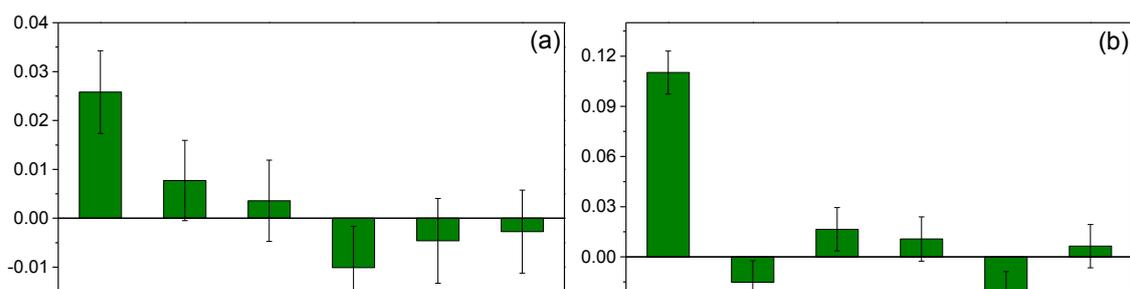


Figura 4-2. Valores e intervalos de confianza de los coeficientes (a_i) asociados a los distintos factores e interacciones del modelo propuesto en la Ecuación (4-3) para el índice de estabilidad, obtenidos tras el primer ajuste del modelo. Emulsiones preparadas con (a) GA y (b) G600.

Cuando se encuentra que un factor o interacción no es significativo (p-valor mayor de 0.05, o intervalo de confianza que corta al eje de abscisas) se excluye del modelo y este es recalculado, obteniéndose así los valores definitivos de los coeficientes. Según la herramienta de diagnóstico R^2/Q^2 y el test de fallo de ajuste o “lack of fit” (Montgomery, 2008), el modelo así obtenido (Ecuación 4-3) es válido para describir los resultados y hacer predicciones dentro de la región experimental. Los coeficientes asociados calculados para cada factor o interacción y su correspondiente p-valor se detallan en la Tabla 4-2. Estos coeficientes están escalados y centrados, es decir, para calcular la respuesta a partir de la Ecuación (4-3) los coeficientes tomarán valores de -1, 0 o 1; en lugar de sus valores reales.

Tabla 4-2. Coeficientes escalados y centrados asociados a cada factor o interacción del modelo propuesto (Ecuación (4-3) junto con su p-valor correspondiente. a: área interfacial específica; IE: índice de estabilidad a corto plazo. N.S.: factor no significativo (p-valor > 0.05)

Factor o Interacc.	GA –a		GA – IE		G600 – a		G600 – IE	
	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor
Φ	4182.1	$3.08 \cdot 10^{-6}$	0.029	$3.58 \cdot 10^{-6}$	14558.5	$2.61 \cdot 10^{-7}$	0.111	$8.70 \cdot 10^{-13}$
S	2082.8	$2.71 \cdot 10^{-3}$	N.S.	-	7736.9	$9.70 \cdot 10^{-4}$	-0.016	$2.76 \cdot 10^{-2}$
E	N.S.	-	N.S.	-	N.S.	-	0.018	$1.50 \cdot 10^{-2}$
$\Phi \cdot S$	N.S.	-	N.S.	-	N.S.	-	N.S.	-
$\Phi \cdot E$	N.S.	-	N.S.	-	N.S.	-	-0.019	$1.36 \cdot 10^{-2}$
$S \cdot E$	N.S.	-	N.S.	-	N.S.	-	N.S.	-

El análisis de estos resultados indica que tanto la fracción volumétrica de aceite como la relación emulsionante/aceite ejercen un efecto positivo sobre el área interfacial de las emulsiones preparadas (se considera positivo un aumento de la misma), independientemente del emulsionante usado (Figura 4-3). Sin embargo la energía aplicada no tuvo un efecto significativo en ninguno de los dos casos. Además, en todos los experimentos realizados el área interfacial específica obtenida con G600 fue unas tres veces mayor que la obtenida con GA (por ejemplo, 19245 y 63521 cm^2/mL para GA y G600 según el modelo obtenido en el punto central de la región experimental, Φ y $S = 1$).

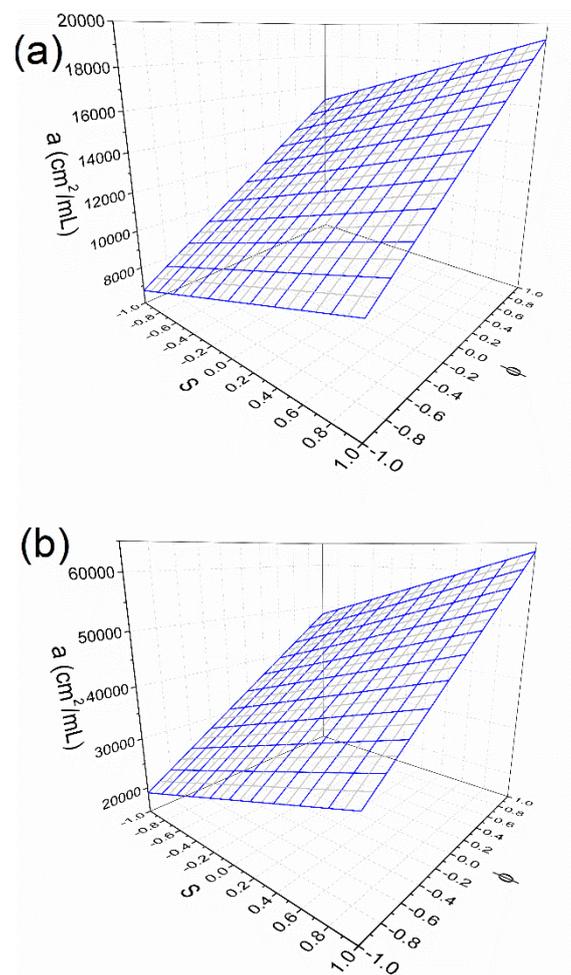


Figura 4-3. Área interfacial específica (cm^2/mL) calculada según el modelo planteado en la ecuación (4-3), para emulsiones preparadas con (a) GA y (b) G600.

Respecto a la estabilidad de la emulsión en primer lugar se observó que todas las muestras sufrieron desestabilización por cremado. Según el modelo, la estabilidad a corto plazo de las emulsiones preparadas con GA depende exclusivamente de Φ ,

umentando con la misma. Con G600 se obtuvo un resultado similar, pero en este caso se ha encontrado que tanto la energía aplicada y su interacción con Φ como la cantidad de tensioactivo, S, ejercen un efecto significativo sobre la estabilidad, aunque de manera mucho más discreta que la fracción volumétrica de fase grasa en la emulsión. Es destacable que en las emulsiones preparadas con G600 el factor S ejerce un efecto negativo sobre su estabilidad (coeficiente menor de 0). Teniendo en cuenta el pequeño tamaño de las gotas obtenidas con este emulsionante, que el área interfacial específica aumenta con la cantidad de G600, este efecto negativo podría deberse a que no haya suficiente emulsionante para cubrir por completo la superficie de las gotas y prevenir su coalescencia.

Es muy interesante observar las diferencias en los perfiles de desestabilización (back-scattering frente al tiempo) entre emulsiones preparadas con GA y G600, como se muestra en la Figura 4-4. En emulsiones estabilizadas con GA, con el mayor valor de Φ (0.15), aparece una etapa inicial en la que no se observa desestabilización de la emulsión (fase de retardo). A menores valores de Φ o en emulsiones preparadas con G600 (independientemente del valor de Φ) no se observa esta fase de retardo (Figura 4-4-a). Según Robins (2000), esta fase de retardo aparece en emulsiones estabilizadas con polímeros a altas fracciones volumétricas de aceite o con fuertes interacciones de repulsión, donde la emulsión forma una estructura de red tridimensional. Por lo tanto, se puede concluir que la GA da lugar a emulsiones más estables a corto plazo que las preparadas con G600 para altos valores de Φ . Por otro lado, el back-scattering residual a las 24 horas de la preparación de la emulsión fue muy similar para ambos emulsionantes (Figura 4-4-a).

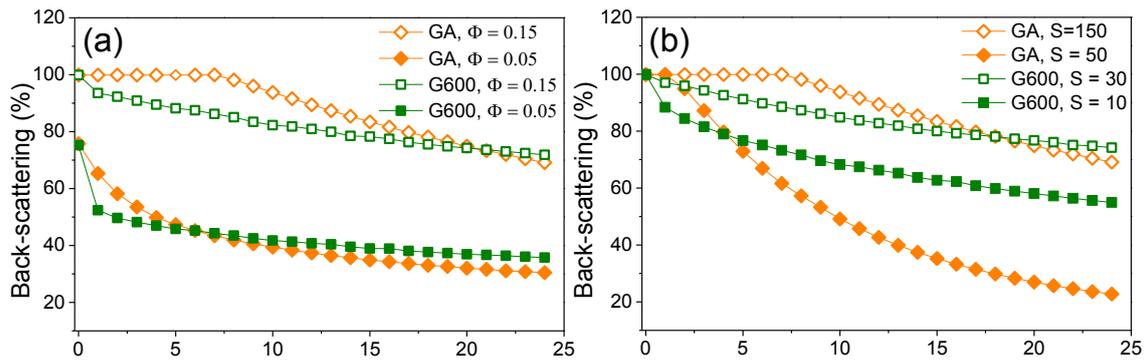


Figura 4-4. Efecto de (a) fracción volumétrica de aceite en la emulsión y (b) relación emulsionante/aceite (mg/mL) en el perfil de desestabilización (back-scattering frente al tiempo) de emulsiones preparadas con GA (naranja) y G600 (verde). Las condiciones experimentales fueron: (a) $S=150$ mg/mL para GA y 30 mg/mL para G600, $E=1250$ J/mL; (b) $\Phi=0.15$, $E=1250$ J/mL.

El efecto del parámetro S se analiza en la (Figura 4-4-b). Se puede observar cómo la fase de retardo en emulsiones con GA se prolonga considerablemente al aumentar la cantidad de emulsionante. Incluso al menor valor de S (50 mg de GA/mL de aceite), la emulsión permaneció completamente estable durante al menos una hora, tiempo más que suficiente para que la adición de la enzima y el comienzo de la reacción de hidrólisis tengan lugar sin que se altere la emulsión. Por otro lado, un incremento de S también ayuda a reducir la velocidad inicial de desestabilización de emulsiones preparadas con G600.

De estos resultados se puede concluir que una alta fracción volumétrica de aceite ($\Phi=0.15$) da lugar a emulsiones con una alta área interfacial y aceptable estabilidad a corto plazo para ambos emulsionantes. Respecto a la relación emulsionante/aceite, a pesar de que ejerce un efecto significativo en el área interfacial de las emulsiones, su impacto es más limitado que el de la fracción volumétrica de aceite. Por lo tanto, un valor intermedio de S (100 mg/mL para GA y 20 mg/mL para G600) parece una elección razonable, si también se tienen en cuenta los aspectos económicos. Por último la energía aplicada no mostró un efecto significativo en el área interfacial dentro del rango de estudio, mejorando solo de manera leve la estabilidad de las emulsiones con G600. Por este motivo también se eligió un valor intermedio de E (1000 J/mL).

Una vez fijadas las mejores condiciones para la preparación de la emulsión faltaría seleccionar el emulsionante más adecuado. Para ello se ha estudiado su influencia en

la actividad enzimática usando la mezcla control (MC) como sustrato. En la Figura 4-5 se comparan las curvas de hidrólisis (% de enlaces éster hidrolizados frente al tiempo) obtenidas para GA y G600. Como puede observarse, en todo momento el grado de hidrólisis es mayor para emulsiones preparadas con GA. Jurado y col. (2011) también observaron una mayor inhibición de la enzima TLL en emulsiones preparadas con G600 en comparación con las preparadas con GA, especialmente cuando el emulsionante ya estaba presente en la superficie de las gotas en emulsión antes de comenzar la hidrólisis. Otros autores han detectado también el efecto inhibitorio sobre la actividad lipásica de otros tensioactivos no iónicos (Christiansen y col., 2010; Yao y col., 2013). Por lo tanto, en base a estos resultados, la GA parece el emulsionante más adecuado y se selecciona para llevar a cabo todos los experimentos de hidrólisis siguientes.

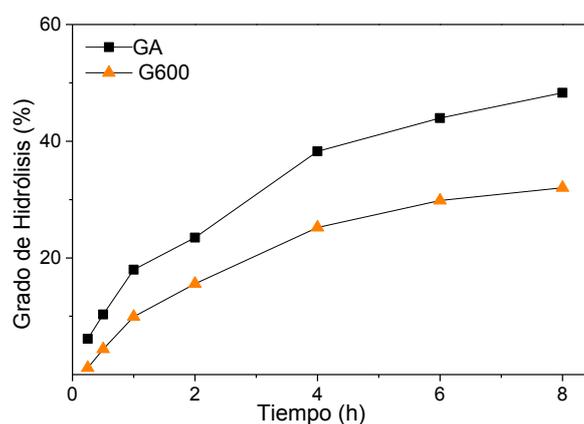


Figura 4-5. Efecto del emulsionante utilizado (goma arábiga, GA o Glucopón 600, G600) en la hidrólisis enzimática de MC mediante PFL. La hidrólisis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: $\Phi=0.15$, $E=1000$ J/mL, $S=100$ o 20 mg/mL para GA y G600, $T=37$ °C.

4.1.2. Efecto de la concentración de enzima

La adsorción de la enzima en la superficie de las gotas de aceite en emulsión O/W es el primer paso en la hidrólisis de triglicéridos catalizada por lipasas. Se puede considerar que este proceso sigue la isoterma de Langmuir (Jurado y col., 2006), de manera que a partir de cierta concentración de enzima en la superficie de la gota no puede aumentar más la velocidad inicial de reacción, ya que a esta concentración la gota estaría completamente cubierta por la enzima (concentración de saturación). Para encontrar dicha concentración de saturación se han realizado experimentos con

tributirina en emulsión O/W como sustrato ($\Phi=0.0094$, $d_{3,2}=5.64 \mu\text{m}$) incrementando la concentración de enzima.

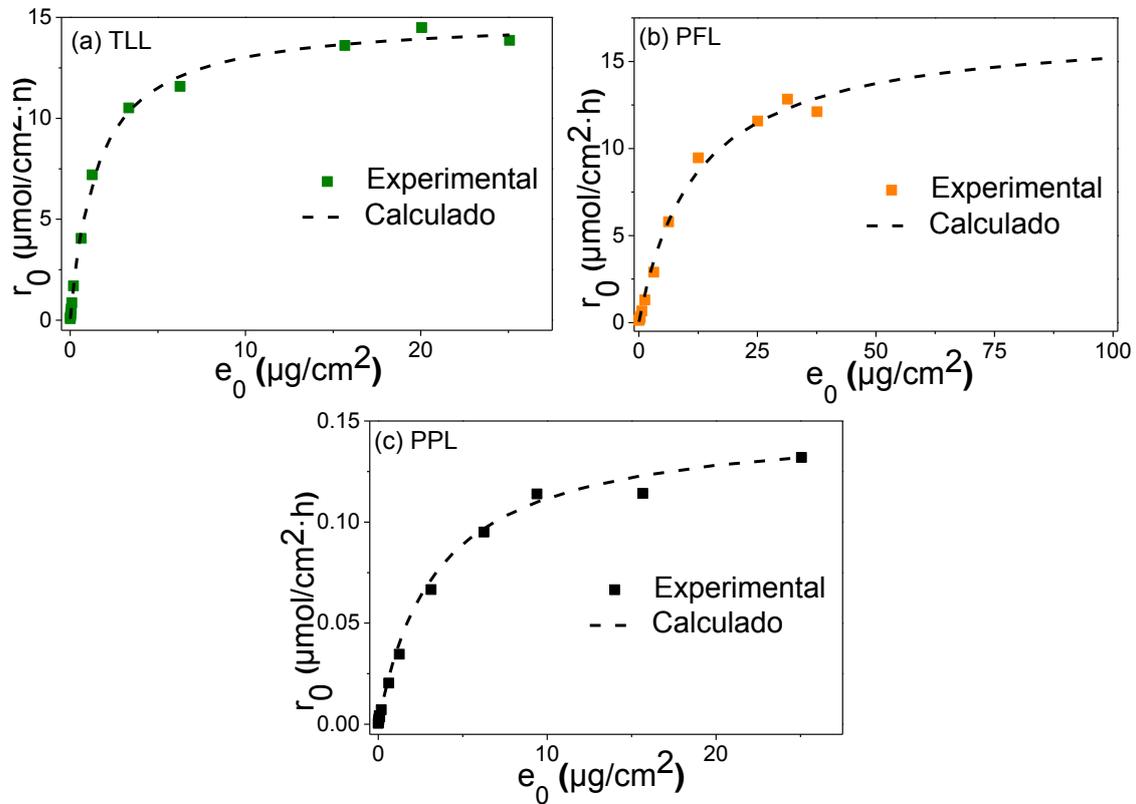


Figura 4-6. Efecto de la concentración de enzima (e_0 , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sobre la velocidad inicial de hidrólisis de tributirina (r_0 , $\mu\text{mol}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$), expresadas por unidad de área interfacial de la emulsión. Datos experimentales y calculados según la Ecuación (4-4) para a) TLL, b) PFL y c) PPL.

En la Figura 4-6 se muestran las velocidades iniciales de estos experimentos. Como puede observarse, la velocidad inicial aumenta con la concentración de enzima hasta que se alcanza un valor constante. Estos datos experimentales pueden ajustarse satisfactoriamente a una ecuación del tipo Michaelis-Menten (Ecuación (4-4):

$$r_0 = \frac{K_1 e_0}{K_2 + e_0} \quad (4-4)$$

donde r_0 es la velocidad inicial de reacción (en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$) y e_0 la concentración de enzima en el medio de reacción (en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), ambas expresadas por unidad de área interfacial de la emulsión. K_1 y K_2 son las constantes del modelo; K_1 representa la máxima velocidad de reacción y K_2 la concentración de enzima a la cual la velocidad de reacción se reduce a la mitad de su valor máximo. Los datos obtenidos con el ajuste

de esta ecuación también se presentan en la Figura 4-6, mientras que los valores de los parámetros del modelo así como la pureza (contenido en proteína) y la actividad específica (U/gramo de proteína) de cada enzima y su actividad máxima se detallan en la Tabla 4-3:

Tabla 4-3. Propiedades de las enzimas (contenido en proteína y actividad específica) Parámetros del modelo propuesto en la Ecuación (4-4) y actividad máxima (A_0) para las tres enzimas utilizadas.

Enzima	Contenido en proteína (%)	Actividad específica (kU/g prot.)	K_1 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	K_2 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	A_0 ($\mu\text{mol}/\mu\text{g} \cdot \text{h}$)
TLL	3.28 ± 0.18	2865 ± 174	15.0	1.50	10.0
PFL	8.77 ± 0.48	214 ± 21	17.0	11.9	1.42
PPL	55.20 ± 3.05	112 ± 10	0.1	3.41	0.04

El valor de K_1 proporciona información sobre la velocidad de hidrólisis máxima que se puede alcanzar con un sustrato en particular, mientras que K_2 está relacionada con la adsorción de la enzima en la interfase. Además, la primera derivada de la Ecuación (4-4), que se muestra en la Ecuación (4-5), representa la actividad enzimática (A), es decir, la cantidad de ácidos grasos liberados por unidad de tiempo y de masa de preparado enzimático ($\mu\text{mol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

$$\frac{dr_0}{de_0} = A = \frac{K_1 K_2}{(K_2 + e_0)^2} \quad (4-5)$$

En la Ecuación (4-5) puede observarse cómo la actividad enzimática depende de la concentración de enzima, aunque permanece relativamente constante a bajas concentraciones ($e_0 \ll K_2$), pero que decae a altas concentraciones. De hecho, la máxima actividad se alcanzaría cuando e_0 es igual a cero (para $e_0 = 0 \rightarrow A = A_0 = K_1/K_2$).

Según los resultados de la Tabla 4-3, la velocidad máxima de hidrólisis que puede conseguirse con TLL y PFL es muy similar, mientras que la obtenida para PPL es considerablemente menor. Sin embargo, la actividad máxima de la PFL es 7 veces menor que la de la TLL, debido a su mayor valor de K_2 . Mayores valores de este parámetro podrían significar menores purezas del preparado enzimático, pero se comprueba que este no es el caso (Tabla 4-3). También podría deberse a una menor

cobertura interfacial de la enzima. No obstante, estudios previos afirman que la cobertura interfacial de la PFL es del mismo orden de magnitud que la de TLL (Jurado y col., 2008; Kierkels y col., 1994). De manera que estos menores valores de A_0 deben ser atribuidos a su proceso de adsorción, por ejemplo a una baja afinidad de la enzima por la interfase tributirina/agua o a la formación de agregados en la interfase (adsorción multicapa), sugerida por Kierkels y col. (1994). En cualquier caso, la información detallada en la Tabla 4-3 es muy útil para elegir una concentración de enzima adecuada para llevar a cabo los posteriores experimentos de hidrólisis.

4.1.3. Efecto del pH

Además de la concentración de enzima, el pH del medio es otro parámetro muy importante para la hidrólisis ya que ejerce una gran influencia sobre la actividad enzimática. La Figura 4-7 muestra la actividad de las tres enzimas usadas en función del pH, determinada usando tributirina como sustrato. Para evitar la hidrólisis alcalina de la tributirina no se trabajó a pH mayores de 10. Se puede observar como la actividad de la TLL aumenta en todo el rango estudiado, mientras que la PFL mostró un máximo a pH 8 y la PPL mantuvo constante su actividad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos previos (Kojima y col., 1994; Kuiken y Behnke, 1994; Neves Petersen y col., 2001). De manera que el pH elegido para llevar a cabo los experimentos con TLL es de 10, para PFL y PPL se fija en 8. Además se llevarán a cabo experimentos con TLL a pH 8 para poder realizar comparaciones adecuadas.

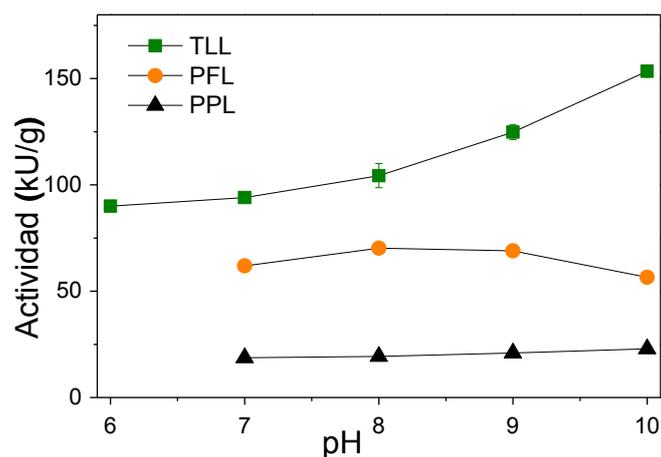


Figura 4-7. Influencia del pH sobre la actividad enzimática de TLL, PFL y PPL. Experimentos realizados con GA como emulsionante siendo tributirina el sustrato y en las siguientes condiciones: $\Phi = 0.01$; $\epsilon_0=0.00625$ g/L; $T=30^\circ\text{C}$.

4.1.4. Hidrólisis enzimática de aceite usado en emulsión O/W. Estudio de la distribución de productos

Finalmente se han llevado a cabo experimentos de hidrólisis enzimática en emulsiones O/W con las tres enzimas previamente mencionadas. Como sustratos se han usado las dos mezclas de aceites residuales (AR-1 y AR-2), así como la mezcla control (MC). Los experimentos se realizaron tanto en presencia como en ausencia de iones Ca^{2+} , para estudiar si la precipitación de los ácidos grasos liberados evita el efecto inhibitorio que éstos tienen sobre la reacción (Hwang y col., 2009).

En la Figura 4-8 se comparan el grado de hidrólisis alcanzado tras 8 horas de reacción con las distintas enzimas, con y sin iones Ca^{2+} . El grado de hidrólisis se calcula como el porcentaje de enlaces éster hidrolizados respecto a los presentes a tiempo cero. El mayor grado de hidrólisis se alcanzó con TLL a pH 8 y en ausencia de iones Ca^{2+} (64.4%). Para PFL y PPL en las mismas condiciones los resultados también fueron satisfactorios, llegando hasta un 48.3 y un 40.1% de enlaces éster hidrolizados respectivamente. Se debe tener en cuenta que un grado de hidrólisis superior al 66.7% (2/3 de los todos los enlaces éster) supone inevitablemente la hidrólisis de MAG a glicerina y FFA, lo cual debe de evitarse ya que los MAG son productos de hidrólisis más valiosos. Es importante resaltar que, usando ambos aceites residuales, el grado de hidrólisis alcanzado fue muy similar al obtenido con la mezcla control, especialmente

para PFL y PPL; mientras que con TLL se observa una ligera reducción al emplear los aceites residuales.

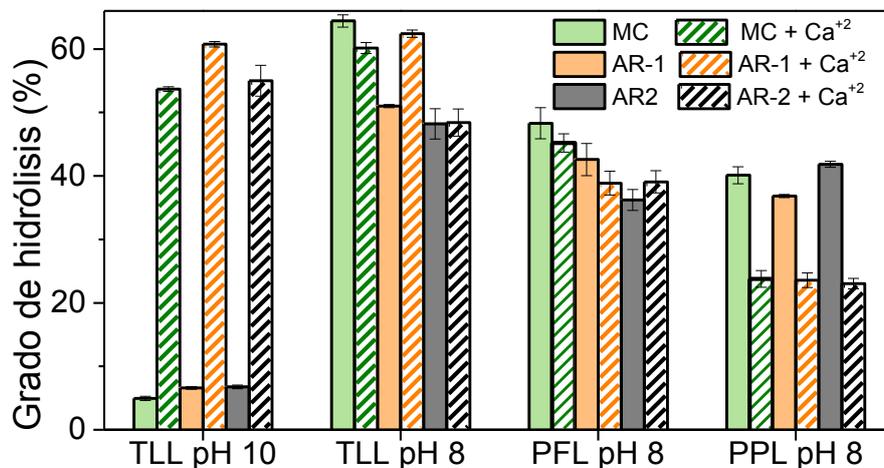


Figura 4-8. Grado de hidrólisis obtenido tras 8 h de reacción para las distintas enzimas y sustratos ensayados, con y sin iones Ca^{2+} en el medio. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: $e_0 = 0.25 \text{ g/L}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Phi = 0.15$, $E = 1000 \text{ J/mL}$ y $S = 100 \text{ mg/mL}$ (GA usado como emulsionante). $[\text{Ca}^{2+}] = 0.47 \text{ mol/L}$ (si añadido).

Por otro lado, como se muestra en la Figura 4-8, el grado de hidrólisis sufrió una fuerte reducción en los experimentos a pH 10 en ausencia de iones Ca^{2+} . Esto se puede atribuir al fuerte efecto inhibitorio de los FFA producidos durante la hidrólisis. La adsorción de estos productos en la superficie de las gotas de la emulsión expulsa a las lipasas de la misma, obstaculizando la hidrólisis (Hu y col., 2010). Se puede comprobar cómo este efecto solo aparece a pH 10. Considerando que el pK_a de los ácidos grasos de cadena larga como el ácido oleico está en torno a 9 (Kanicky y Shah, 2002), a pH 10 los FFA se encontrarán mayoritariamente ionizados, lo que aumenta su carácter anfipático. Investigaciones previas también han encontrado efectos negativos sobre la actividad lipásica de surfactantes aniónicos cuando se encuentran adsorbidos sobre la interfase de emulsiones (Jurado y col., 2011; Skagerlind y col., 1995). Consecuentemente, estos resultados muestran que el efecto inhibitorio de los FFA puede prevenirse tanto precipitándolos con iones Ca^{2+} como evitando su ionización trabajando a pH menores del pK_a . El hecho de que no se obtenga una mejora sustancial en el grado de hidrólisis cuando se añaden iones Ca^{2+} a pH 8 refuerza esta conclusión. En este sentido es importante reseñar que con PPL se redujo casi a la mitad el grado de hidrólisis en presencia de iones Ca^{2+} e independientemente del sustrato usado, por lo que en este caso su uso sería perjudicial.

Otro factor clave para evaluar el comportamiento de la reacción es la distribución de productos obtenida, es decir la fracción molar de cada tipo de glicérido respecto al número total de los mismos en el sistema. La Figura 4-9 muestra la distribución obtenida con los tres aceites y enzimas.

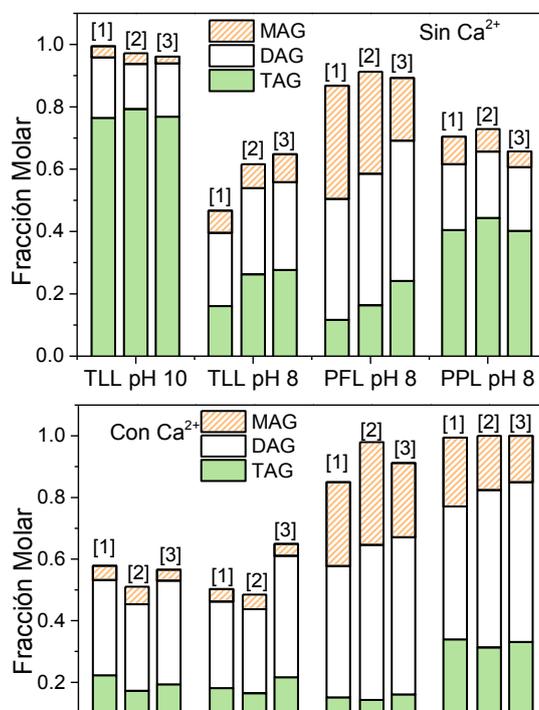


Figura 4-9. Distribución de glicéridos tras 8 horas de hidrólisis para las distintas enzimas y sustratos usados ([1]-MC, [2]-AR-1 y [3]-AR-2), con y sin iones Ca^{2+} en el medio. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: $e_0 = 0.25$ g/L, $T = 37$ °C, $\Phi = 0.15$, $E = 1000$ J/mL y $S = 100$ mg/mL (GA usado como emulsionante). $[\text{Ca}^{2+}] = 0.47$ mol/L (si añadido).

La cantidad de TAG, DAG y MAG se determinó por HPLC-MS, como se indicó en la sección experimental, apartado 3.3.4, mientras que la fracción molar de glicerina se calculó con un balance a todos los glicéridos detallado en la Ecuación (4-6):

$$n_T = n_{TG} + n_{DG} + n_{MG} + n_G = n_{TG0} + n_{DG0} + n_{MG0} + n_{G0} \quad (4-6)$$

donde n_T son los moles totales de glicéridos en el sistema, que permanecerá constante durante el transcurso de la reacción y n_{TG} , n_{DG} , n_{MG} y n_G son los moles de TAG, DAG, MAG y glicerina libre respectivamente. El subíndice 0 se refiere a las condiciones iniciales. En el instante inicial se asume que la cantidad de glicerina libre es cero.

Las tres enzimas usadas mostraron comportamientos distintos. Con TLL los triglicéridos sufrieron una hidrólisis casi completa, es decir, dieron lugar principalmente ácidos grasos y glicerina, y una reducida cantidad de DAG y MAG. Esta enzima es considerada como sn-1,3 específica por algunos autores (Fernandez-Lafuente, 2010), mientras que otros la consideran inespecífica (Schmid y Verger, 1998). Los resultados obtenidos apuntan hacia esta última alternativa. Por el contrario PFL sí actuó con especificidad sn-1,3, produciendo casi exclusivamente DAG y MAG. Por último, la especificidad de PPL parece que se vio afectada por la presencia de iones Ca^{2+} ya que estos incrementaron la fracción molar de DAG y MAG obtenida. En la Figura 4-9 también se vuelve a apreciar cómo en los experimentos llevados a cabo a pH 10 con TLL y en ausencia de Ca^{2+} una gran cantidad de TAG permanece sin hidrolizar. Esto está en concordancia con el bajo grado de hidrólisis obtenido en estas condiciones. De manera que, como se mencionó anteriormente, a pH 10 sería necesario adicionar Ca^{2+} o trabajar a pHs inferiores para que la hidrólisis transcurra de manera satisfactoria.

Los glicéridos parciales, en especial los MAG, son los productos de hidrólisis más interesantes debido a su alto precio y amplio uso como emulsionante alimentario. Resulta por ello interesante conocer la selectividad de la hidrólisis para cada producto, DAG y MAG, que puede calcularse según las Ecuaciones (4-7) y (4-8):

$$S_{DAG} = \frac{\text{número de moles de TAG convertidos a DAG}}{\text{número total de moles de TAG convertidos}} = \frac{n_{DG} - n_{DG0}}{n_{TG0} - n_{TG}} \quad (4-7)$$

$$S_{MAG} = \frac{\text{número de moles de TAG convertidos a MAG}}{\text{número total de moles de TAG convertidos}} = \frac{n_{MG} - n_{MG0}}{n_{TG0} - n_{TG}} \quad (4-8)$$

En la Tabla 4-4 se muestran las selectividades obtenidas para cada producto bajo todas las condiciones ensayadas, así como la fracción de enlaces hidrolizados, f_h , calculada con la Ecuación (4-9):

$$f_h = \frac{\text{moles de FFA liberados}}{\text{moles totales de enlaces éster en el sistema}} = \frac{3(n_G - n_{G0}) + 2(n_{MG} - n_{MG0}) + (n_{DG} - n_{DG0})}{3(n_{TG0} - n_{TG})} \quad (4-9)$$

Los resultados de la Tabla 4-4 indican que se puede conseguir una selectividad considerablemente alta usando PFL (con y sin iones Ca^{2+}), al igual que con PPL en presencia de Ca^{2+} . Sin embargo, en este caso, la TLL sería más adecuada para la producción de FFA, es decir, cuando se desee una hidrólisis completa de los glicéridos.

Tabla 4-4. Selectividades de la reacción de hidrólisis para DAG, MAG y AGL en las distintas condiciones experimentales ensayadas.

	Sin Ca^{+2}			Con Ca^{+2}		
	SD_{AG}	SM_{AG}	f_h	SD_{AG}	SM_{AG}	f_h
TLL-pH 10-MC	0.78	0.28	0.38	0.31	0.07	0.77
TLL-pH 10-AR-1	0.39	0.33	0.63	0.24	0.08	0.81
TLL-pH 10-AR-2	0.44	0.17	0.65	0.31	0.04	0.78
TLL-pH 8- MC	0.19	0.1	0.84	0.26	0.06	0.81
TLL -pH 8- AR-1	0.27	0.12	0.78	0.23	0.06	0.83
TLL -pH 8- AR-2	0.26	0.14	0.78	0.41	0.05	0.71
PFL -pH 8- MC	0.37	0.47	0.60	0.44	0.37	0.58
PFL -pH 8- AR-1	0.43	0.45	0.56	0.53	0.44	0.50
PFL -pH 8- AR-2	0.52	0.31	0.55	0.54	0.33	0.53
PPL-pH 8- MC	0.23	0.18	0.79	0.65	0.43	0.42
PPL -pH 8- AR-1	0.24	0.16	0.79	0.74	0.32	0.40
PPL -pH 8- AR-2	0.17	0.1	0.86	0.74	0.28	0.41

La conclusión más destacable extraída de estos resultados es que la distribución de productos no se vio afectada significativamente por el tipo de sustrato usado, de manera similar a lo observado previamente para el grado de hidrólisis. Estos resultados indican que los aceites residuales podrían ser un sustrato tan bueno para la hidrólisis lipásica como el aceite de grado alimentario.

4.2. Hidrólisis enzimática de aceite usado en micelas inversas

A diferencia de las emulsiones O/W, las micelas inversas, en las que la enzima se ubica en nanodominios acuosos dispersos en una fase orgánica, constituyen un sistema isotrópico y termodinámicamente estable. La idoneidad de este sistema para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de aceite usado ha sido evaluada en este apartado. En primer lugar se ha realizado un estudio de las fases formadas por los componentes agua/aceite/i-octano en presencia del surfactante AOT para conocer en qué condiciones se forman las micelas inversas. Posteriormente se estudia el efecto de ciertos parámetros relevantes en estos sistemas como son la relación molar agua/surfactante (W_0), la fracción volumétrica de aceite en la fase grasa (Φ_R) y la concentración de enzima en la fase acuosa, analizando cómo afectan al transcurso y resultado de la hidrólisis.

Como sustrato se han empleado los mismos aceites residuales (AR-1 y AR-2) y mezcla control que en el apartado anterior, y como enzimas la TLL y la PFL, también empleadas anteriormente. De la misma manera, el objetivo principal sigue siendo saber si la hidrólisis de los aceites residuales puede llevarse a cabo satisfactoriamente en este sistema, y el de conocer el grado de hidrólisis alcanzado y la distribución de productos obtenida en función de las variables de operación.

4.2.1. Estudio de fases

Bajo las condiciones adecuadas, una disolución de surfactante en una fase orgánica incorpora cierta cantidad de agua en el interior de los agregados de surfactante, formándose el sistema conocido como micelas inversas. Además, las condiciones en las que se forma esta microemulsión se pueden extender añadiendo otro tipo de aditivos.

En este caso se han estudiado las fases formadas en el sistema agua-fase grasa, compuesta ésta a su vez por i-octano y aceite. Se han usado los tres aceites mencionados previamente. Como surfactante se ha usado AOT, y su concentración se ha mantenido constante siempre den 50 mM. El correspondiente diagrama de fases

pseudo ternario se muestra en la Figura 4-10. Este es muy similar al publicado por otros autores en condiciones parecidas (El-Laithy, 2003). En función de la fracción másica de cada uno de los componentes se pueden distinguir tres regiones en el diagrama: (i) una fase isotrópica en la que la mezcla tiene un aspecto transparente y presenta estabilidad a largo plazo, correspondiente a la región de microemulsión (ME); (ii) una región en la que se forma una nanoemulsión de aspecto azulado que también presenta estabilidad a largo plazo (NE) y (iii) una mezcla multifásica en la cual no se puede incorporar dentro de los agregados de AOT todo el agua añadida.

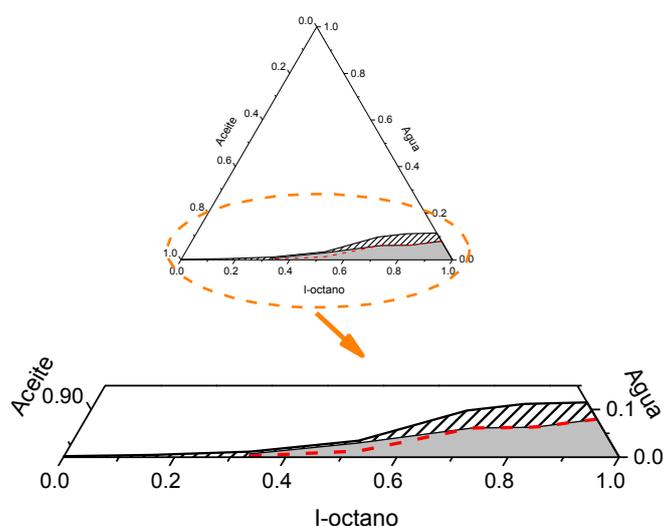


Figura 4-10. Diagrama pseudo ternario de fases del sistema agua/aceite/i-octano a 37 °C y [AOT]=50 mM. La zona gris muestra la región de microemulsión obtenida con los dos aceites residuales (AR-1 y AR-2). El área bajo la línea discontinua roja corresponde a la región de microemulsión para MC. El área rayada representa la región multifase de nanoemulsión de aspecto azulado para los tres aceites. La zona blanca corresponde a la mezcla multifase.

En la Figura 4-10 se puede comprobar cómo con los tres aceites se puede obtener un sistema de microemulsión W/O termodinámicamente estable. La región de formación de ME se ve afectada tanto por el tipo de aceite como por su fracción volumétrica en la fase continua. El sistema es capaz de solubilizar cada vez menos agua a partir valores de la fracción volumétrica de aceite en la fase continua de $\Phi_R = 0.20$, llegando a no aceptar nada de agua dentro de los agregados de AOT cuando $\Phi_R = 0.8$. A partir de $\Phi_R = 0.65$ desaparece la fase isotrópica. Teniendo en cuenta la estructura de las micelas en los sistemas W/O, el i-octano actúa favoreciendo la formación de las micelas de AOT en la fase oleosa (Majhi y Moulik, 1999; Vasquez y col., 2011). Esta modificación de la fase continua hace posible la formación de la microemulsión. Por

lo tanto se comprueba que el i-octano facilita la formación de la microemulsión. Es por ello que a partir de cierto valor de Φ_R las moléculas de i-octano no son suficientes para interactuar con la creciente cantidad de moléculas de aceite. La región multifase aparece cuando hay cierto exceso de agua o aceite en el medio. En estas condiciones la mezcla es transparente con tonos azulados, presentando también estabilidad a largo plazo. Mientras que la fracción másica de agua solubilizada en forma de ME nunca supera el 8 %, en NE se observa hasta cantidades del 12%.

Respecto al tipo de aceite, la región de ME es ligeramente mayor para los dos aceites usados (Figura 4-10). Polizelli y col. (2006) observaron que se puede obtener una microemulsión de agua en aceite usando monooleína como surfactante, mientras que esto no se consigue usando exclusivamente AOT. Por lo tanto, el mayor contenido en DAG, MAG y ácidos grasos libres (todas ellas sustancias con propiedades interfaciales) de los aceites residuales podría estar favoreciendo la formación del sistema de microemulsión W/O. En este sentido el uso de aceite residual sería más ventajoso en comparación con el aceite comercial.

4.2.2. Efecto de la relación agua/tensioactivo sobre el grado de hidrólisis

La relación molar agua/tensioactivo (W_0) es considerada como uno de los factores claves en las hidrólisis en ME (Franqueville y col., 2003; Han y Rhee, 1985; Papadimitriou y col., 1997). Por lo tanto se ha estudiado el efecto de este parámetro sobre el grado de hidrólisis obtenido a las 48 horas con TLL. Como puede observarse en la Figura 4-11 en todos los experimentos el máximo grado de hidrólisis se obtuvo en valores de W_0 en torno a 13, independientemente de Φ_R y el aceite empleado. Han y col. (1987) también observaron un óptimo de W_0 tanto para la velocidad inicial de reacción como para la conversión de equilibrio en hidrólisis de aceite de oliva con lipasa de *Candida rugosa*.

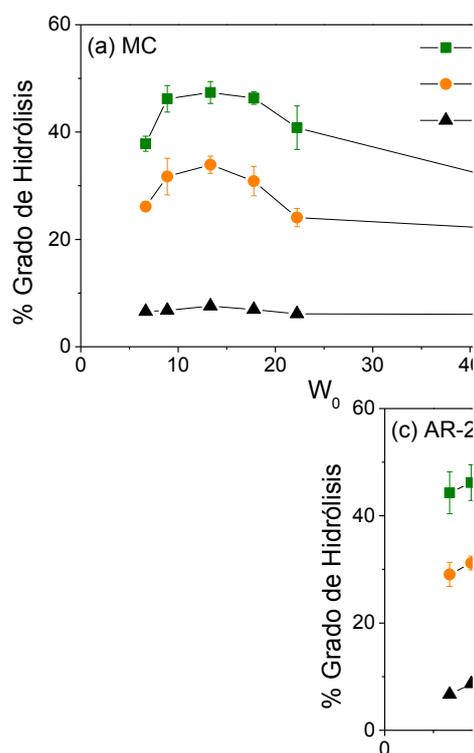


Figura 4-11. Grado de hidrólisis tras 48 horas de reacción, expresada como % de enlaces éster hidrolizados, en función de la relación agua/AOT (W_0) y a distintas fracciones volumétricas de aceite en la fase continua (Φ_R). Resultados para (a) MC, (b) AR-1 y (c) AR-2. [AOT]=50 mM; TLL=0.2 g/L (referidos al volumen total del medio), T=37 °C.

Se ha propuesto que este máximo podría corresponder con la cantidad de agua a la cual el tamaño de las micelas es similar al de las enzimas encapsuladas en su interior (Klyachko y Levashov, 2003). La disminución en el grado de hidrólisis observada al reducir el valor de W_0 puede atribuirse a la reducción de la cantidad de agua disponible para reaccionar, ya que el agua es un reactivo en la hidrólisis. Por otro lado, una cierta cantidad de agua es retenida por el AOT al hidratarse (Goto y col., 1995). Además al disminuir W_0 el tamaño de la micela se reduce, facilitando así la interacción entre las enzimas y el AOT, la cual puede desactivar las enzimas (Carvalho y Cabral, 2000). Por el contrario, a mayores valores de W_0 , el consiguiente incremento del tamaño de las micelas puede favorecer la movilidad de las enzimas o incluso cambios conformacionales (como dimerización), afectando negativamente al proceso de catálisis. También se ha sugerido que a mayores W_0 la concentración de sustrato en las inmediaciones de la micela de agua disminuye debido al aumento de polaridad de la misma (Chen y Pal, 1991; Luisi y col., 1990; Naoe y col., 2004). Por lo tanto estaría justificada la existencia de un valor óptimo de W_0 . Cabe destacar también que el valor

óptimo de W_0 es independiente de Φ_R (Figura 4-11), lo que sugiere que el tamaño de las micelas no se ve alterado por la cantidad de aceite en la fase continua. En base a estos resultados se elige $W_0=13.3$ para llevar a cabo los siguientes experimentos de hidrólisis.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que las ME son sistemas dinámicos cuando se usan como medio de reacción, ya que sus componentes actúan como reactivos. En este estudio este hecho es de particular importancia para el agua, que está presente en cantidades muy pequeñas y es consumida durante la hidrólisis. Cálculos hechos en base a los FFA producidos indican que casi la mitad del agua presente al inicio de la reacción se consume al cabo de 48 horas cuando $\Phi_R=0.6$, con lo que W_0 se reduciría desde su valor inicial de 13.3 hasta 7.0. Por lo tanto al irse consumiendo el agua llegará un momento en el que no quede agua disponible para ser usada como reactivo o en el que las condiciones de las micelas inversas no sean adecuadas para la actividad enzimática, por las razones expuestas previamente.

Por último, también es muy interesante el hecho de que el grado de hidrólisis obtenido con AR-2 sea muy similar al alcanzado con la mezcla control. Con AR-1 se alcanzaron valores ligeramente menores, posiblemente debido a la mayor cantidad de FFA en este aceite residual (como se indicó en el capítulo 3.1.1. de Materiales y Métodos), que pueden estar inhibiendo la reacción. Estos resultados apuntan a que los aceites residuales también podrían ser sustratos tan adecuados para la hidrólisis enzimática en sistemas de micelas inversas como el aceite de grado alimentario.

4.2.3. Efecto de la fracción de aceite sobre el grado de hidrólisis

Una ventaja de las ME sobre las emulsiones O/W es que las reacciones pueden transcurrir a altas concentraciones de aceite. Sin embargo, como se indicó previamente, altas proporciones de aceite dificultan la formación de la ME. Los siguientes experimentos se han llevado a cabo para estudiar desde el punto de vista del máximo grado de hidrólisis alcanzable, hasta qué punto sería conveniente elevar Φ_R . Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4-12:

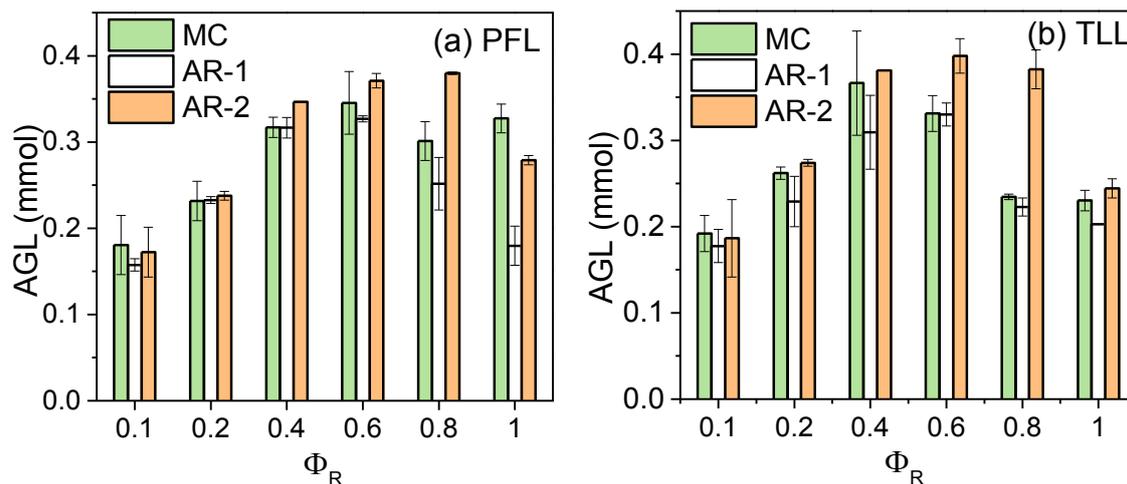


Figura 4-12. Efecto de la fracción volumétrica de aceite en la fase continua (Φ_R) sobre los ácidos grasos producidos por hidrólisis enzimática usando (a) PFL y (b) TLL. Resultados para MC, AR-1 y AR-2 tras 48 h de hidrólisis, concentración de enzima 0.2 g/L, $W_0=13.3$ y $T=37$ °C.

Como puede observarse la hidrólisis tiene lugar en todo el rango de valores de Φ_R . La máxima cantidad de FFA liberados se obtuvo en valores de Φ_R en torno a 0.6-0.8. Sin embargo al convertir estos valores a % de hidrólisis teniendo en cuenta la cantidad de aceite presente en cada caso, se puede apreciar cómo este es mayor para $\Phi_R=0.1$ y decrece progresivamente. Tsai y Chiang, (1991) obtuvieron valores similares hidrolizando aceite de oliva con lipasa de *Candida rugosa*.

La disminución del grado de hidrólisis con la concentración de aceite en la fase grasa puede atribuirse a la limitación impuesta por la cantidad de agua disponible, tal y como se discutió previamente. Sin embargo este hecho no explica la reducción en la cantidad de FFA a valores de Φ_R mayores de 0.6-0.8. El hecho de que al incrementar la concentración de sustrato no se observe un incremento proporcional en los AGL producidos sugiere algún tipo de inhibición de la enzima. Este efecto puede atribuirse a la propia liberación de ácidos grasos, que tienden a acumularse en la interfase debido a sus propiedades anfifílicas (Hwang y col., 2009). Las propiedades inhibitorias de los FFA sobre la actividad lipásica son bien conocidas (Chang y Chen, 1995; Hermansyah y col., 2006; Yao y col., 2005). A su vez, los MAG producidos también pueden interactuar con la enzima a nivel de la interfase (Reis y col., 2008), lugar de actuación de las lipasas.

La mayor cantidad de productos de reacción generados en los experimentos a altas Φ_R puede provocar que se alcance antes una concentración de saturación en las proximidades de la micela debido a limitaciones difusionales. Además, no hay que olvidar que Φ_R es un parámetro determinante para la formación de una fase u otra en el sistema agua/aceite/i-octano (Figura 4-10). Como se indicó previamente, la ME no se forma a valores mayores de $\Phi_R = 0.65$. Por lo tanto, a valores mayores, se formará una nanoemulsión W/O, lo que puede implicar una reducción de la actividad enzimática. Estos dos efectos conjugados explican el hecho de que los FFA liberados descendan a partir de cierto valor de Φ_R .

Dado que el valor de Φ_R seleccionado debe cumplir el doble requisito de producir la mayor cantidad de productos de reacción (FFA, MAG y DAG) a una conversión razonable, se ha seleccionado $\Phi_R=0.2$ como el valor que reúne estos requisitos de maneja más satisfactoria.

Por último, al igual que en el apartado anterior, los resultados obtenidos con aceites residuales fueron muy similares a los de la mezcla control. Cabe señalar que con AR-2 incluso se liberaron más ácidos grasos que con la MC. En base a estos resultados se refuerza la conclusión de que los aceites residuales son sustratos tan adecuados para la hidrólisis enzimática en sistemas de micelas inversas como el aceite de grado alimentario.

4.2.4. Efecto de la concentración de enzima

Con objeto de mejorar la viabilidad económica de este proceso de hidrólisis se debe optimizar la concentración de enzima utilizada, ya que es uno de los componentes más costosos del sistema. Por ello se ha estudiado la influencia de la concentración de enzima sobre el grado de hidrólisis y la productividad específica (P) de FFA de las mismas (expresada como mmol de FFA obtenidos por mg de enzima), tanto para TLL como PFL (Figura 4-13).

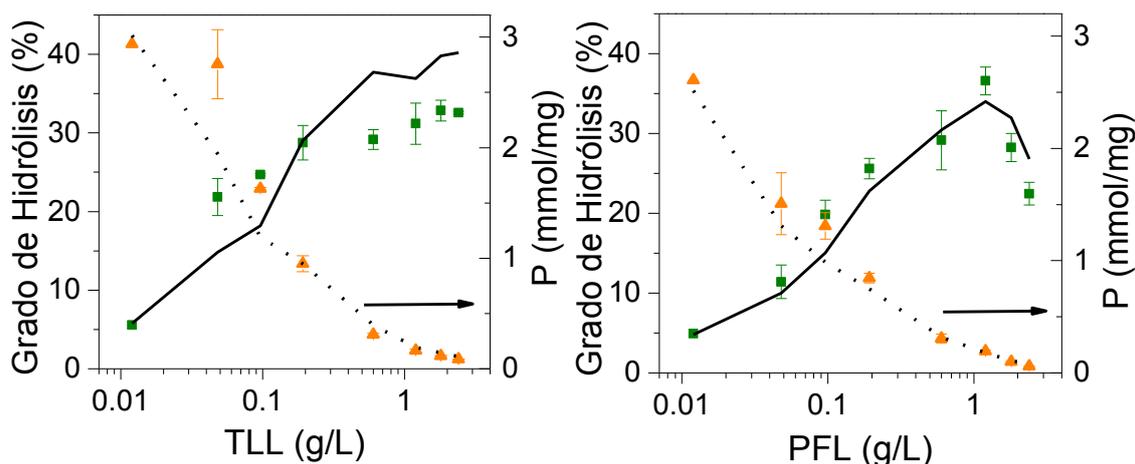


Figura 4-13. Efecto de la concentración de TLL y PFL sobre el grado de hidrólisis de AR-2 (en % respecto a enlaces éster iniciales, ■) y la productividad específica de la lipasa (P; expresada como mmol de ácido graso hidrolizado por mg de enzima, ▲). Los resultados obtenidos con MC se presentan en líneas (continua para grado de hidrólisis y discontinua para A_s). Resultados tras 48 h de hidrólisis, $W_0=13.3$ y $T=37$ °C.

El grado de hidrólisis tras 48 horas incrementó con la concentración de ambas enzimas hasta un máximo alrededor del 30-35% para concentraciones en torno a 1 g/L. Se puede comprobar como este incremento no es proporcional a la cantidad de enzima utilizada. Esto se ve reflejado en el constante descenso de la productividad específica (P) al aumentar la concentración de enzima. Este parámetro, que refleja la eficiencia de la enzima, toma valores muy bajos a partir de concentraciones de 0.2 g/L (menos de 1 mmol de FFA por mg de enzima). Por lo tanto, esta concentración parece un valor razonable, dando lugar a un grado de hidrólisis aceptable a valores no muy bajos de actividad específica.

Esta reducción de la productividad específica puede deberse a que no haya suficientes micelas de AOT para estabilizar en su interior a las enzimas. Además, la agregación de las enzimas se favorece a altas concentraciones, siendo la actividad de estos agregados menor que la de la enzima monomérica (Fernández-Lorente y col., 2003).

4.2.5. Hidrólisis enzimática de aceite usado en emulsión W/O. Estudio de la distribución de productos

Una vez seleccionados las condiciones más adecuadas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de aceite en micelas inversas, se ha llevado a cabo un estudio de la

distribución de productos existente a lo largo del tiempo. Dada la similitud de los resultados obtenidos con la mezcla control y los aceites AR-1 y AR-2, el siguiente estudio se realizará solamente con los dos aceites residuales.

Como puede apreciarse en las Figura 4-14 y Figura 4-15, ambos aceites dieron lugar a distribuciones de producto muy similares. Sí se aprecian ligeras diferencias en función de la enzima usada. La PFL dio lugar a mayores cantidades de DAG y MAG. En este sentido la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* parece más ventajosa.

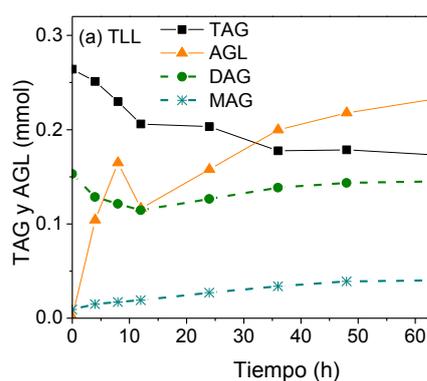


Figura 4-14. . Distribución de productos durante la hidrólisis enzimática de AR-1 en sistemas de ME con (a) TLL y (b) PFL. Condiciones de reacción: $W_0=13.3$, $\Phi_R=0.2$, [enzima]=0.2 g/L, [AOT]=50 mMol, $T=37$ °C.

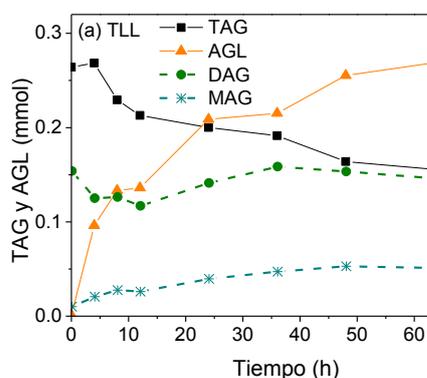


Figura 4-15. Distribución de productos durante la hidrólisis enzimática de AR-2 en sistemas de ME con (a) TLL y (b) PFL. Condiciones de reacción: $W_0=13.3$, $\Phi_R=0.2$, [enzima]=0.2 g/L, [AOT]=50 mMol, $T=37$ °C.

Independientemente de la enzima usada, la concentración de DAG en el medio permanece considerablemente constante a lo largo de todo el periodo de reacción estudiado, aumentando levemente cuando se usa PFL. Esto indica que los DAG producidos al hidrolizarse los TAG son a su vez hidrolizados a MAG, sin llegarse a

acumular en el medio en ningún momento. A su vez, buena parte de los MAG producidos son también hidrolizados a FFA y glicerina, particularmente con la TLL. Las selectividades en MAG son del 9% y 27% para TLL y PFL respectivamente. Un balance molar al sistema muestra que más de un 95 % de los MAG producidos por la TLL fueron posteriormente hidrolizados, siendo este valor del 84% para PFL.

Este resultado no es esperado, ya que a priori se considera a estas dos lipasas como sn-1, 3 específicas (Fernandez-Lafuente, 2010; Kojima y Shimizu, 2003). La alta cantidad de MAG hidrolizados podría deberse a una acilmigración de 2-MAG a 1-(3)-MAG (Holmberg y Osterberg, 1988; Li y col., 2010; Murgia y col., 2002). Sin embargo la acilmigración se considera un proceso lento, y además debería afectar por igual a ambas enzimas. Es más probable por tanto que este fenómeno se deba a que el comportamiento regio selectivo de TLL y PFL no sea el esperado, particularmente de la primera enzima. Ya se comentó en el capítulo anterior que hay autores que describen un comportamiento inespecífico para la TLL. Sin embargo, en este caso la enzima PFL tampoco actúa como sn-1, 3 específica. Este cambio podría deberse al confinamiento de las enzimas dentro de las micelas de agua.

Las curvas de distribución de productos también muestran que la reacción de hidrólisis puede detenerse tras 48 horas. La ralentización de la reacción pasado este tiempo puede atribuirse a la inhibición por producto y al agotamiento del agua disponible para la reacción, como se ha discutido previamente.

Por lo tanto, los resultados indican que este sistema de hidrólisis es más adecuado para la producción de FFA que de MAG o DAG. La ventaja del sistema de ME es que la separación de productos tras la hidrólisis es mucho más sencilla, ya que todos los productos se encuentran disueltos en la fase grasa.

Bloque II

En esta sección se evalúa el uso de alpeorujos como fuente única de carbono en la producción de biosurfactantes por dos cepas bacterianas. Consta de dos apartados diferenciados. En primer lugar se pretende confirmar la hipótesis de que se puede usar alpeorujos como única fuente de carbono y posteriormente analizar la posibilidad de una hidrólisis previa del mismo para la optimización del proceso de producción de biosurfactantes.

4.3. Viabilidad del uso de alpeorujos como fuente de carbono para la producción de biosurfactantes

Con el objeto de confirmar si es posible obtener biosurfactantes usando el alpeorujos como única fuente de carbono, se han llevado a cabo fermentaciones en estado líquido con dos microorganismos distintos, de los que se conoce previamente su capacidad de producir biosurfactantes. Se han estudiado distintos parámetros del medio de cultivo y comparado los resultados con otras fuentes de carbono más comunes. A su vez se han analizado los principales elementos a tener en cuenta para una posible optimización del proceso de producción.

4.3.1. Efecto del tipo y concentración de la fuente de carbono

Se ha estudiado el crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis* N1 (número de catálogo KT595698 de GenBank) y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (de la colección de la Universidad del Ulster) con tres fuentes de carbono distintas: glicerina, aceite residual AR-1 y alpeorujos. Es importante resaltar que el alpeorujos se utilizó tal cual fue recibido del suministrador. Se ha analizado el efecto de estas fuentes de carbono y su concentración sobre tres parámetros característicos del crecimiento celular y la producción de biosurfactante: peso seco (PS), tensión superficial (TS) y concentración de biosurfactante.

El peso seco es una medida del crecimiento celular durante el cultivo. Sin embargo, al ser el alpeorujó un producto con gran cantidad de partículas sólidas, esta medida viene afectada por un error considerable. Algo parecido ocurre al usar aceite residual, en este caso por la dificultad de separar por completo el aceite no consumido de los pellets de células. Es por ello que no se extraerán conclusiones a partir de esta información, la cual solo será usada a modo orientativo para analizar la capacidad de los microorganismos de crecer en el medio.

Por otro lado la tensión superficial sirve como indicativo de la presencia y concentración de sustancias con propiedades interfaciales. De esta manera, si la tensión superficial del medio de cultivo es baja, se deberá probablemente a la presencia de biosurfactantes, la cual disminuirá a mayores concentraciones de los mismos. Según Cooper (1986) se puede considerar que se está produciendo biosurfactante a valores de TS inferiores a los 40 mN/m.

Por último, mediante la determinación de la concentración de biosurfactante en el medio de cultivo, se tendrá la prueba directa de la capacidad de estos microorganismos de producir biosurfactantes a partir de alpeorujó. A su vez se podrá analizar de manera precisa el efecto de las distintas fuentes de carbono y su concentración sobre la producción de biosurfactante.

En primer lugar se analizó el efecto de la fuente de carbono y su concentración sobre el peso seco y la tensión superficial del medio de cultivo. Ambos factores afectaron de forma apreciable al PS y a la TS en las fermentaciones llevadas a cabo con *P. aeruginosa* (Figura 4-16). Se puede observar cómo independientemente de la fuente de carbono, el PS aumenta con la concentración de las mismas. Usando glicerina a concentraciones superiores al 2% se obtuvieron los mayores valores de PS. El mayor valor de PS para AR-1 al 2% no es un dato concluyente, ya que este puede deberse a aceite residual que no haya sido separado por completo durante la centrifugación. Por el contrario, el alpeorujó dio lugar a los PS más bajos para las tres concentraciones analizadas. Según estos resultados la fuente de carbono más favorable para el crecimiento de la cepa de *P. aeruginosa* es la glicerina. Esta bacteria también se desarrolla en aceite residual y alpeorujó, aunque de manera más limitada. Además el

aumento en la concentración de cualquiera de estas fuentes de carbono favorece su multiplicación.

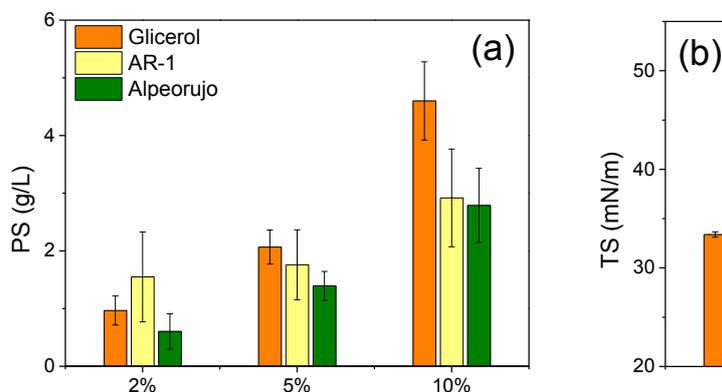


Figura 4-16. Influencia de la fuente de carbono (glicerina, aceite residual AR-1 y alpeorujo) y su concentración sobre (a) peso seco (PS, g/L) y (b) tensión superficial (TS, mN/m) del medio de cultivo en fermentaciones llevadas a cabo con la cepa de *P. aeruginosa* durante 7 días a 37 °C y 160 rpm. Al igual que en el resto de resultados presentados en esta sección, las barras de error corresponden a la desviación estándar de las tres réplicas realizadas

En cuanto a la información aportada por la ST para los cultivos de *P. aeruginosa* se puede observar cómo con glicerina y AR-1 se obtienen los menores valores (bajando hasta los 29 mN/m con glicerina al 5 y 10%), y que estos solamente descienden de forma ligera al aumentar la concentración de los mismos (Figura 4-16 b). Esto podría deberse a que la concentración de ramnolípidos producidos haya superado el valor de su CMC, de manera que un aumento en su concentración no se vería reflejado en una disminución en la TS del medio. Sin embargo, la TS disminuyó de manera considerable con la concentración de alpeorujo, desde los 45.1 a los 33.7 mN/m para 2 y 10 % respectivamente. Lo cual podría reflejar una mayor producción de ramnolípidos al aumentar la concentración de alpeorujo.

En las fermentaciones llevadas a cabo con la cepa de *B. subtilis* se observaron unos resultados ligeramente distintos. En este caso el PS solamente aumentó con la concentración de glicerina y alpeorujo, mientras que descendió ligeramente para el AR-1, que además dio lugar a los menores valores del mismo (Figura 4-17-a). De nuevo se obtuvieron los mayores valores de PS para la glicerina. Consecuentemente el *B. subtilis* se desarrolla mejor en alpeorujo que en aceite residual, siendo la glicerina la fuente de carbono más favorable para su crecimiento.

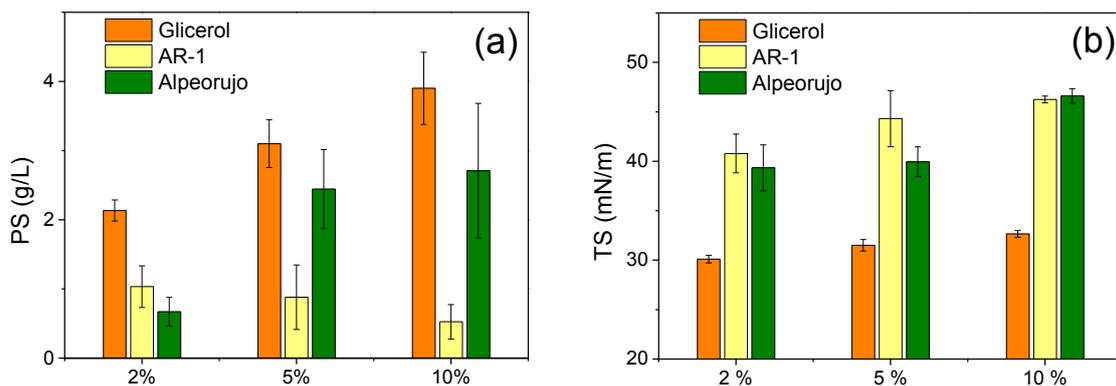


Figura 4-17. Influencia de la fuente de carbono (glicerina, aceite residual AR-1 y alpeorujó) y su concentración sobre (a) peso seco (PS, g/L) y (b) tensión superficial (TS, mN/m) del medio de cultivo en fermentaciones llevadas a cabo con la cepa de *B. subtilis* durante 7 días a 37 °C y 160 rpm.

Analizando los valores de TS, se observa cómo en este caso aumentan con la concentración de AR-1 y alpeorujó, subiendo desde 39.3 hasta 46.6 mN/m para alpeorujó al 2 y 10 % respectivamente (Figura 4-17-b). Esto podría deberse a una reducción en la producción de surfactinas al aumentar la concentración de cualquiera de estas fuentes de carbono. En este caso la glicerina también dio lugar a los menores valores de TS, que se mantuvieron en torno a los 33 mN/m para las tres concentraciones ensayadas.

Los resultados mostrados en las Figura 4-16 y Figura 4-17 sugieren que ambos microorganismos son capaces de crecer y de producir biosurfactantes usando exclusivamente alpeorujó como fuente de carbono. La cepa de *P. aeruginosa* parece crecer mejor y producir mayores cantidades de biosurfactante que la de *B. subtilis*, especialmente a elevadas concentraciones del mismo.

Los análisis de UPLC/MS de los extractos de los medios de cultivo permiten la identificación y cuantificación de las distintas especies de ramnolípidos y surfactina producidas por las cepas de *P. aeruginosa* y *B. subtilis* respectivamente. De esta manera se confirma que los biosurfactantes producidos por ambas cepas con alpeorujó como fuente de carbono son esencialmente los mismos que los obtenidos con fuentes convencionales. En la Figura 4-18 se puede comprobar cómo los cromatogramas obtenidos en los experimentos realizados son muy similares a los patrones de cada uno de los biosurfactantes

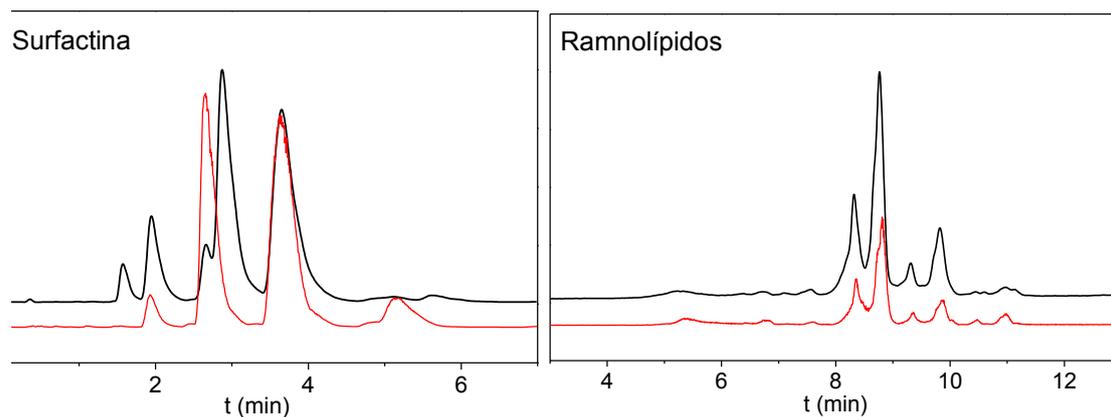


Figura 4-18. Comparación de los cromatogramas obtenidos para patrones (línea negra) y del biosurfactante producido por fermentación (línea roja).

Además de esto, la cuantificación directa de la concentración de biosurfactantes en el medio de cultivo servirá para confirmar las suposiciones previas sobre el efecto de las distintas fuentes de carbono y su concentración obtenidas a partir de la tensión superficial.

En primer lugar se verifica que ambas cepas produjeron las mayores cantidades de biosurfactante usando glicerina (Figura 4-19). No se observó un efecto claro sobre la concentración de ramnolípidos, que se mantuvo en torno a los 1500 mg/L, valor que es efectivamente superior al de la CMC de este biosurfactante, que oscila entre los 20 y los 210 mg/L (Dahrazma y Mulligan, 2004; Nitschkey col., 2005; Sotirova y col., 2008). Sin embargo, la concentración de surfactina se redujo desde los 21.72 hasta los 13.51 mg/L entre un 2 y un 10 % de glicerina. En el caso del aceite residual ambas cepas redujeron su rendimiento en biosurfactantes al aumentar su concentración, siendo este efecto más marcado para el *B. subtilis*, el cual no produjo surfactina con 10 % de AR-1. Finalmente, y como se ha mencionado anteriormente, estos análisis permiten confirmar que es posible producir ramnolípidos y surfactina a partir de alpeorujos. En las mejores condiciones se obtuvieron 191.46 mg/L de ramnolípidos y 3.12 mg/L de surfactina, para un 10 y un 2 % de alpeorujos respectivamente. El efecto de la concentración de este residuo sobre el rendimiento en biosurfactante fue el mismo que el observado sobre la TS: mientras que la cepa de *P. aeruginosa* incrementó su producción de biosurfactante con mayores cantidades de alpeorujos, la de *B. subtilis* la redujo.

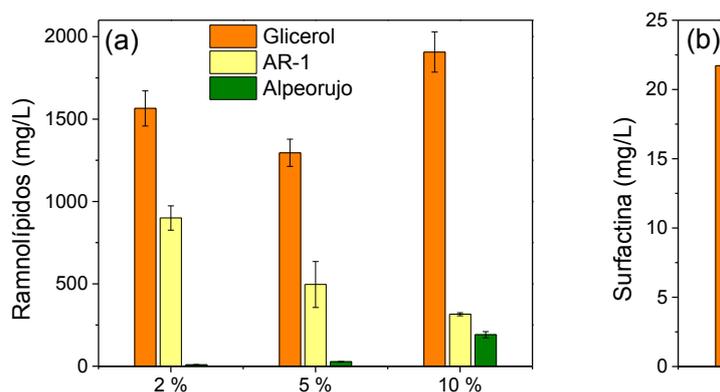


Figura 4-19. Influencia de la fuente de carbono (glicerina, aceite residual AR-1 y alpeorujó) y su concentración sobre (a) la concentración de ramnolípidos y (b) de surfactinas en el medio de cultivo tras 7 días de fermentación con *P. aeruginosa* y *B. subtilis* respectivamente.

Esta reducción en la concentración de surfactina sugiere que el alpeorujó inhibe la habilidad del *B. subtilis* para producirla. Esto podría deberse a las propiedades antimicrobianas de los fenoles presentes en el residuo, las cuales son bien conocida y están descritas en bibliografía (Obied y col., 2005; Perez y col., 1992). A su vez, Moreno y col. (1990) informaron que este efecto antimicrobiano de los fenoles es mayor para cepas Gram-positivas que para Gram-negativas. De manera que especies como la *P. aeruginosa* podrían ser más resistentes al alpeorujó, y por tanto más aptas para usarlo como fuente de carbono.

En términos de rendimiento producto/substrato ($Y_{P/S}$), el obtenido para ramnolípidos fue considerablemente superior al de surfactina (Tabla 4-5). En sus respectivas condiciones óptimas y con alpeorujó como fuente de carbono el rendimiento fue de 19.15 y 1.56 mg de biosurfactante/g de alpeorujó para ramnolípidos y surfactina respectivamente.

Tabla 4-5. Rendimiento producto/substrato ($Y_{P/S}$, mg biosurfactante/g alpeorujó) para ramnolípidos y surfactina producidos tras 7 días de fermentación por *P. aeruginosa* y *B. subtilis* respectivamente, en función de la fuente de carbono usada y su concentración.

Concentración	Glicerina		AR-1		Alpeorujó	
	Ramn.	Surf.	Ramn.	Surf.	Ramn.	Surf.
2 %	782.35	10.86	449.97	0.51	4.39	1.56
5 %	259.01	4.15	99.25	0.02	5.41	0.19
10 %	190.68	1.35	31.56	n.d.	19.15	0.06

n.d. = no detectado

Es importante tener en cuenta la diferencia en rendimientos obtenidos con glicerina y alpeorujos. Los mejores rendimientos obtenidos con alpeorujos para *P. aeruginosa* y *B. subtilis* fueron solamente un 12 y un 4 % de los obtenidos con glicerina al 2%. A pesar de esta notable diferencia, el alpeorujos podría ser una materia prima adecuada para la producción de biosurfactantes teniendo en cuenta que su precio oscila entre 10 y 40 euros por tonelada, considerablemente reducido en comparación de otros sustratos utilizados (Müller y Hausmann, 2011). Aunque los gastos en materias primas no son un elemento crítico en los costes totales de producción de biosurfactantes, la oportunidad de dar a este residuo un importante valor añadido es potencialmente importante.

Un último aspecto a tener en cuenta es la pureza de los extractos de biosurfactante del medio de cultivo obtenidos. En la Tabla 4-6 se puede observar cómo la pureza de los extractos de fermentaciones llevadas a cabo con alpeorujos es intermedia entre la obtenida con aceite residual y glicerina. Esto constituye una ventaja del alpeorujos frente al aceite residual, sobre todo a altas concentraciones. De hecho en los cultivos en los que se utiliza aceite residual es muy difícil separar el aceite no consumido del medio de cultivo, mientras que para el alpeorujos este problema no existe al ser un sólido fácilmente separable. Este hecho podría facilitar el post procesado del medio de cultivo en una hipotética aplicación industrial y suponer un considerable ahorro en una de las etapas más costosas del proceso de producción de biosurfactantes (Smyth y col., 2010).

Tabla 4-6. Pureza (en %) de ramnolípidos (Ramn) y surfactina (Surf) en los extractos crudos de los medios de cultivo tras 7 días de fermentación por *P. aeruginosa* y *B. subtilis* respectivamente, en función de la fuente de carbono usada y su concentración.

Concentración	Glicerina		AR-1		Alpeorujos	
	Ramn.	Surf.	Ramn.	Surf.	Ramn.	Surf.
2 %	69.09	6.38	20.23	0.05	6.62	1.24
5 %	57.97	1.06	10.52	0.01	6.86	0.13
10 %	62.93	0.52	5.11	n.d.	20.43	0.05

n.d. = no detectado

4.3.2. Estudio cinético de producción de biosurfactantes usando alpeorujó como única fuente de carbono

Una vez se ha comprobado que es posible producir ambos biosurfactantes usando exclusivamente alpeorujó como fuente de carbono, los siguientes pasos irán orientados hacia un mejor conocimiento y optimización del proceso de producción. Con este propósito se ha llevado a cabo un estudio cinético de la fermentación, midiendo PS y concentración de biosurfactante en el medio de cultivo a lo largo del tiempo. Estos estudios cinéticos se han realizado en las condiciones más favorables para la producción de biosurfactantes para cada microorganismo encontradas en el apartado anterior.

Como puede observarse en la Figura 4-20, tanto el PS como la concentración de biosurfactante incrementaron rápidamente durante la fase de crecimiento exponencial de ambos microorganismos, permaneciendo casi constantes en su fase estacionaria.

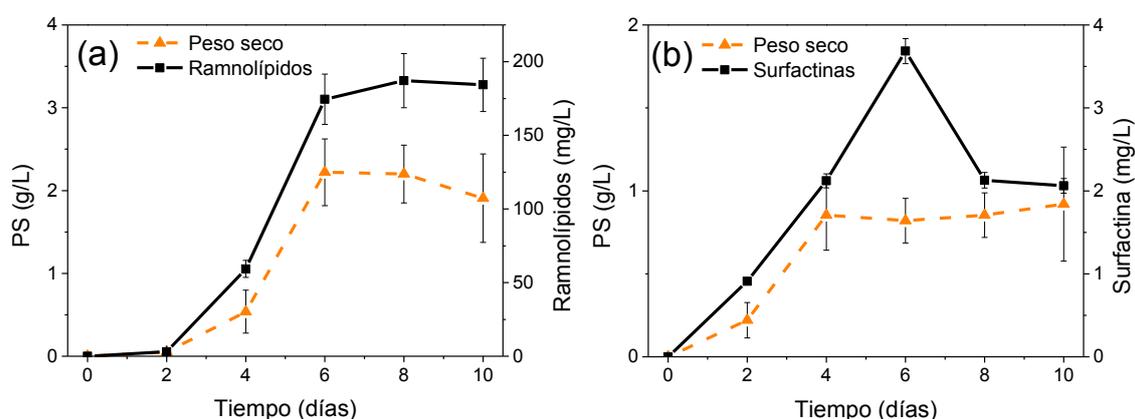


Figura 4-20. Evolución del peso seco (PS, g/L) y la concentración de biosurfactante en el medio (mg/L) para cultivos de (a) *P. aeruginosa* con 10% de alpeorujó y (b) *B. subtilis* con 2% de alpeorujó.

En las fermentaciones realizadas con *B. subtilis* se alcanzó el máximo valor de PS al cuarto día. Por otro lado, el máximo en la concentración de surfactina se obtuvo tras 6 días. Tal y como se observa en la Figura 4-20 las surfactinas se producen tanto en la fase exponencial como en el inicio de la fase estacionaria del crecimiento celular. En bibliografía se pueden encontrar ejemplos de ambos casos (Chen y col., 2006; Davis y col., 1999). El descenso en la concentración de surfactina observado en durante la fase estacionaria de crecimiento puede deberse a un consumo de las mismas

por parte del propio microorganismo o a un proceso de regulación del propio microorganismo, que degradaría las moléculas de surfactina para evitar su efecto inhibitorio (Maass y col., 2015; Nitschke y Pastore, 2004).

Para el caso de la *P. aeruginosa* la máxima concentración celular se alcanzó tras 6 días de fermentación, y la máxima concentración de ramnolípidos al octavo día. La mayor parte de ramnolípidos se produjeron durante la fase de crecimiento exponencial, produciéndose solo una pequeña parte de los mismos durante la fase estacionaria. En bibliografía existen trabajos que informan de la producción de ramnolípidos asociada a la fase de crecimiento (Desai y Banat, 1997; Déziel y col., 2000; Robert y col., 1989).

Por último es importante resaltar que tanto la cinética de crecimiento celular como de producción de biosurfactante es considerablemente más lenta que la presentada en bibliografía para fuentes de carbono convencionales como azúcares (Davis y col., 1999; Rahman y col., 2002). Esta diferencia podría deberse a que la concentración de nutrientes biodisponibles en el alpeorujos no sea muy elevada, y a que estos no sean tan fácilmente utilizables para estos microorganismos como lo pueden ser otras fuentes de carbono más sencillas. Además usando un residuo como fuente de carbono no es tan sencillo ajustar las condiciones del medio a los requerimientos metabólicos de los microorganismos como lo sería con un medio sintético (Henkel y col., 2012).

4.3.3. Importancia del aceite residual del alpeorujos en la producción de biosurfactante

La producción de biosurfactantes se ha asociado tradicionalmente con la necesidad de los microorganismos de degradar sustratos hidrofóbicos. Es por ello que la hipótesis inicial de que podía obtenerse biosurfactante usando alpeorujos como fuente de carbono se basaba en el contenido en aceite residual de este residuo. Con el propósito de confirmar este hecho se llevan a cabo fermentaciones con alpeorujos al que previamente se le ha extraído todo el aceite residual.

La Figura 4-21 muestra cómo para ambas bacterias la biomasa y el biosurfactante producido descienden considerablemente cuando se usó alpeorujos libre de aceite,

obteniéndose un 88.5 % y un 70.7% menos de ramnolípidos y surfactina respectivamente. Este resultado confirma que efectivamente el aceite residual presente en el alpeorujo es el nutriente principal implicado en el crecimiento de los microorganismos y la producción de biosurfactante.

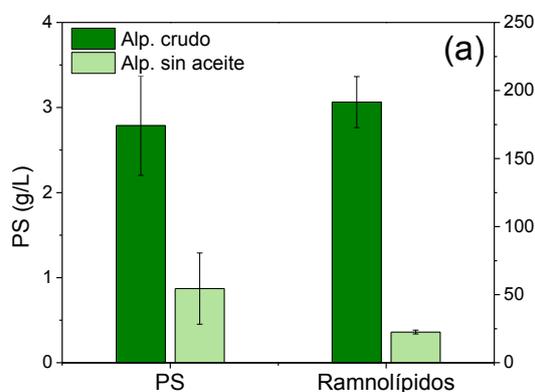


Figura 4-21. Influencia del aceite residual del alpeorujo en el peso seco (g/L) y la concentración de biosurfactante en el medio (mg/L) para cultivos de (a) *P. aeruginosa* con 10% de alpeorujo y (b) *B. subtilis* con 2% de alpeorujo.

Sin embargo, como puede observarse, ambas cepas produjeron cierta cantidad de biosurfactante a partir del alpeorujo libre de aceite. Esto sugiere la presencia de una fuente de carbono secundaria implicada en la producción. Esta probablemente esté relacionada con el material hemicelulósico del alpeorujo, y más concretamente con los azúcares solubles, los cuales podrían estar disponibles y ser fácilmente usados como fuente de carbono (Jain y col., 2013; Makkar y col., 2011). Sin embargo esta última suposición necesita investigación adicional, la cual será abordada en la sección 4.4.

4.3.4. Efecto inhibitorio del alpeorujo sobre el crecimiento microbiano y la producción de biosurfactante

Con el propósito de alcanzar una mejor comprensión de los problemas en la producción de biosurfactantes derivados del uso de alpeorujo, se han realizado experimentos combinándolo con glicerina como fuente de carbono. La concentración inicial de glicerina se mantuvo constante en 2% (cantidad que se sabe es consumida tras 7 días de fermentación), y se varió la concentración de alpeorujo, estudiando el efecto sobre el crecimiento celular y la producción de biosurfactante.

Como muestra la Figura 4-22, ambos microorganismos produjeron menos biosurfactante al usar la fuente de carbono combinada, siendo el efecto más acentuado al aumentar la cantidad de alpeorujito en el medio. Comparada con cultivos llevados a cabo solo con glicerina, la producción de ramnolípidos descendió en un 47.6% y un 75.9% en cultivos con un 2% y un 10% de alpeorujito respectivamente. Para surfactina esta reducción fue del 5.6% y 92.2% en las mismas condiciones. Sin embargo este efecto no se observa para el peso seco, el cual aumenta con la cantidad de fuente de carbono en el medio para ambos microorganismos.

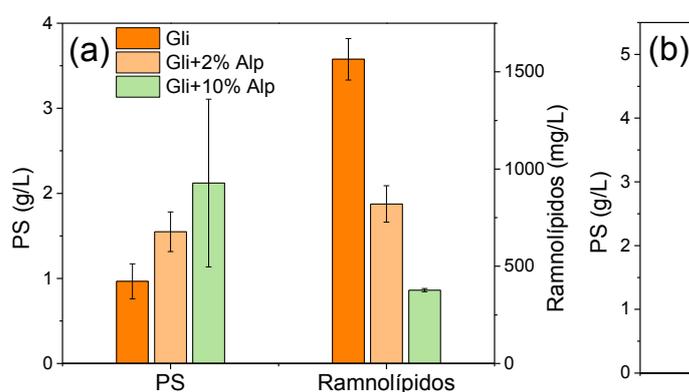


Figura 4-22. Influencia de la fuente de carbono (glicerol, glicerol + 2% de alpeorujito y glicerol + 10% de alpeorujito) sobre el peso seco (g/L) y la concentración de biosurfactante en el medio (mg/L) para cultivos de (a) *P. aeruginosa* y (b) *B. subtilis*.

Estos resultados indican que algún componente del alpeorujito tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de biosurfactante en ambas cepas. Previamente se discutió que el alpeorujito ejercía un efecto inhibitorio sobre la capacidad de producir surfactina de la cepa de *B. subtilis*. Sin embargo en estos nuevos experimentos se observa cómo la cepa de *P. aeruginosa* también puede ver reducida su habilidad para producir ramnolípidos, aunque este efecto no quedase patente previamente cuando se usaba alpeorujito como única fuente de carbono. No obstante el efecto inhibitorio se observa solo sobre la capacidad de producir biosurfactante y no sobre la habilidad del microorganismo para multiplicarse.

Como se indicó anteriormente, estas reducciones en la producción de biosurfactante podrían deberse a la presencia de fenoles en el alpeorujito. Por lo tanto el uso de cepas resistentes a estos compuestos o la eliminación de los mismos podrían

ser interesantes con objeto de optimizar el proceso de producción de biosurfactantes a partir de alpeorujó.

4.4. Hidrólisis del alpeorujo como método para la mejora en la producción de biosurfactantes

El objetivo principal de esta sección es el de estudiar el efecto de una hidrólisis previa del alpeorujo en el rendimiento en la producción de biosurfactantes. Al analizar la composición de este residuo se observa que uno de sus componentes mayoritarios son lignocelulosas (en torno al 30% según Dermeche y col., 2013). Sin embargo, y como se vio en la sección anterior, el aceite residual es el componente del alpeorujo al que está ligada principalmente la producción de biosurfactante, a pesar de representar solamente el 3.9 % del mismo. No obstante, al retirarlo sigue habiendo cierta producción de estas moléculas por parte de los microorganismos, que probablemente estén utilizando la pequeña fracción de azúcares solubles que contiene el residuo.

De esta manera, la solubilización de los azúcares del material celulósico y hemicelulósico del alpeorujo, convirtiéndolos así en nutrientes disponibles para ser incorporados por los microorganismos, podría suponer una mejora para el crecimiento de los mismos y en la producción de biosurfactantes. Por lo tanto en esta sección se estudiará la conveniencia de varios procesos de hidrólisis del material celulósico y hemicelulósico del alpeorujo, analizando el incremento en los azúcares biodisponibles tras los mismos y su repercusión sobre producción de biosurfactantes.

4.4.1. Efecto de la hidrólisis previa del alpeorujo sobre los azúcares solubles y la producción de biosurfactantes

Se han utilizado tres métodos de hidrólisis de alpeorujo:

- Hidrólisis enzimática (HE) usando celulasas y hemicelulasas, dando lugar a un alpeorujo hidrolizado enzimáticamente (AHE)
- Pretratamiento ácido suave seguido de hidrólisis enzimática (PHE), dando lugar a alpeorujo-PHE (APHE). Con el pretratamiento se pretende facilitar la posterior hidrólisis enzimática al romper el recubrimiento de lignina y hemicelulosa que rodea a la celulosa, reduciéndose la estructura cristalina y el grado de polimerización de la celulosa (Xiros y col., 2013).

- Hidrólisis ácida (HA), obteniéndose alpeorujillo-HA (AHA). Con este último método se pretende alcanzar el máximo grado de hidrólisis de celulosas y hemicelulosas.

Mediante los tres métodos de hidrólisis se consiguió un considerable incremento de la cantidad de azúcares solubles (Tabla 4-7), que en el alpeorujillo crudo representan el 9.5% en base seca. Haagensen y col. (2009) obtuvieron rendimientos similares hidrolizando enzimáticamente alpeorujillo tras un pretratamiento de oxidación alcalina.

Tabla 4-7. Relación másica entre los azúcares solubles tras la hidrólisis (A_0) respecto al alpeorujillo en base seca (Alp) y respecto a los azúcares solubles antes de la hidrólisis (A) para los tres métodos de hidrólisis ensayados: HE, PHE y HA.

	Tiempo de hidrólisis	Condiciones de hidrólisis	A_0/Alp	A_0 / A
HE	72 h	Suave	0.30 ± 0.01	3.12 ± 0.13
PHE	30 min + 72 h	Media/Suave	0.38 ± 0.02	4.02 ± 0.16
HA	2 h	Severa	0.41 ± 0.01	4.34 ± 0.14

El incremento en los azúcares solubles tras la hidrólisis supone una mejora sustancial en la cantidad de fuente de carbono biodisponible que aporta el alpeorujillo. De hecho, como puede observarse en la Figura 4-23, ambos microorganismos consumieron gran parte de los azúcares hidrolizados. Sin embargo se aprecia una fracción de los mismos que no es consumida al finalizar los cultivos, que probablemente corresponda a azúcares no fermentables. Si se considera que con HA se consigue una hidrólisis completa, los resultados sugieren que la fracción de azúcares fermentables para ambos microorganismos es la misma. No obstante, cuando se utiliza alpeorujillo hidrolizado mediante HE o PHE, la cepa de *B. subtilis* puede utilizar una fracción ligeramente superior que la *P. aeruginosa* de los azúcares liberados.

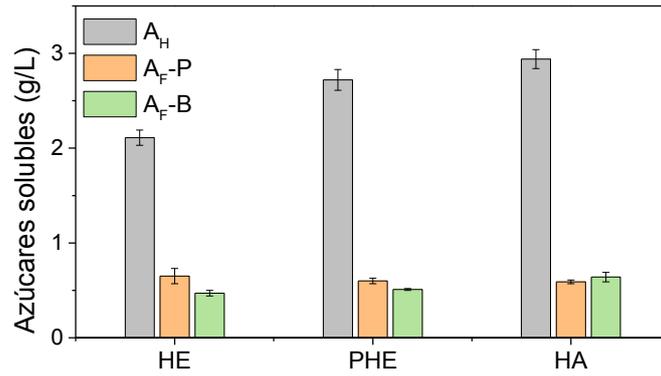


Figura 4-23. Concentración de azúcares solubles en el medio de cultivo tras la hidrólisis del alpeorujo (A_H) y tras la fermentación con *P. aeruginosa* (A_F -P) y con *B. subtilis* (A_F -B) para los tres métodos de hidrólisis ensayados: HE, PHE y HA.

A continuación se analiza el efecto de los distintos métodos de hidrólisis ensayados sobre el peso seco, la tensión superficial y la concentración de biosurfactante en el medio de cultivo. La Figura 4-24-a muestra cómo el crecimiento celular no varía significativamente de un tratamiento a otro, a excepción de la *P. aeruginosa* creciendo en alpeorujo HA, caso en el que el incremento en los azúcares biodisponibles se ve reflejado en un incremento del peso seco.

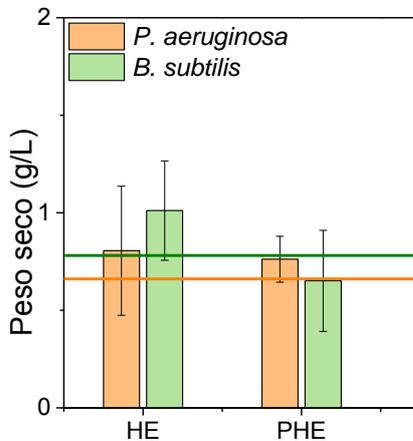


Figura 4-24. Influencia del método de hidrólisis de alpeorujo (HE, PHE o HA) sobre (a) el peso seco y (b) tensión superficial del medio de cultivo, en fermentaciones llevadas a cabo con *P. aeruginosa* y con *B. subtilis*. Experimentos realizados durante 6 días, a 37 °C y con 2% en peso de alpeorujo. Las líneas horizontales marcan los valores obtenidos en las mismas condiciones usando alpeorujo sin hidrolizar.

Analizando los datos de TS (Figura 4-24-b) se observa un ligero aumento de la misma al aumentar la severidad del tratamiento hidrólisis en ambas cepas, lo cual sugiere una disminución de la concentración de biosurfactantes con la misma.

Efectivamente, esto se confirma al analizar los ramnolípidos y surfactina producidos. La Figura 4-25 muestra las concentraciones de estos biosurfactantes en el medio al finalizar el cultivo. Ambas cepas mostraron el mismo comportamiento frente a los tres métodos de hidrólisis, produciendo mayor cantidad de biosurfactantes con el alpeorujito-HE y la menor con alpeorujito-HA. Específicamente la cepa de *P. aeruginosa* produjo 29.49 mg/L y 5.99 mg/L de ramnolípidos con HE y HA respectivamente, mientras que el *B. subtilis* dio lugar a 13.73 mg/L y 5.08 mg/L de surfactina en las mismas condiciones. Por lo tanto, y a pesar de que los azúcares solubles producidos mediante la hidrólisis enzimática son el 71.8% de los alcanzados con la ácida, la cantidad de biosurfactante obtenido con ambos microorganismos es considerablemente mayor usando HE.

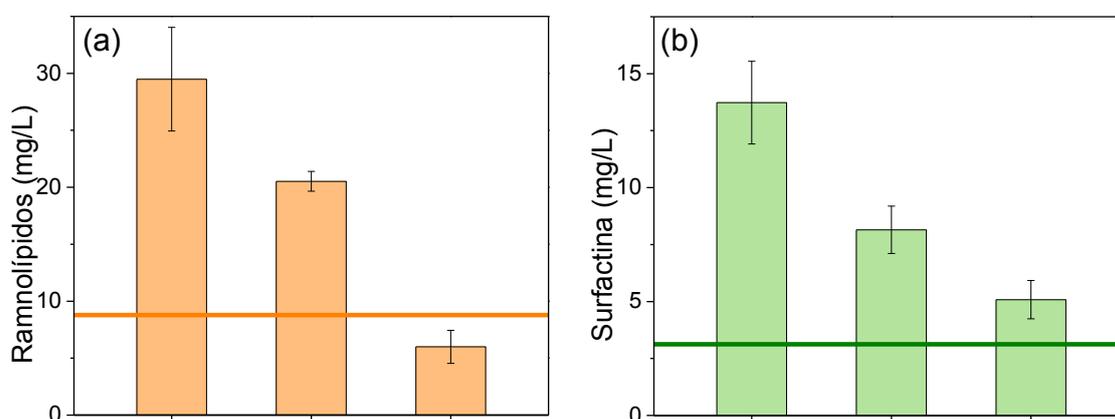


Figura 4-25. Influencia del método de hidrólisis de alpeorujito (HE, PHE o HA) sobre la concentración de biosurfactante en el medio para cultivos de (a) *P. aeruginosa* y (b) *B. subtilis*. Experimentos realizados durante 6 días, a 37 °C y con 2% en peso de alpeorujito hidrolizado. La línea horizontal indica la concentración obtenida en las mismas condiciones usando alpeorujito sin hidrolizar.

Este descenso en el rendimiento con el aumento de la severidad del tratamiento de hidrólisis puede deberse a la liberación de sustancias que inhiban el metabolismo de los microorganismos. Marin y col. (2015) observaron una menor concentración celular en el medio de cultivo y mayor tensión superficial al usar pulpa de sisal hidrolizada químicamente que cuando se llevó a cabo enzimáticamente. Los autores apuntan a que este efecto se puede deber a la presencia de furfurales e hidroximetilfurfurales, que son producidos por la deshidratación de azúcares durante la hidrólisis ácida (Almeida y col., 2009; Ask y col., 2013). Con lo cual, tanto el PHE como la HA, a pesar de liberar más azúcares del alpeorujito, son menos convenientes

en cuanto a la producción de biosurfactante se refiere. Otra desventaja de estos dos métodos de hidrólisis en los que se requiere el uso de ácido es la formación de residuos tras la neutralización del mismo (Laser y col., 2002)

Por otro lado, si se comparan estos resultados con los obtenidos con alpeorujito sin hidrolizar (8.78 mg/L y 3.12 mg/L para ramnolípidos y surfactina respectivamente) se puede observar cómo la concentración de biosurfactante producido es mayor en todos los casos en los que se utiliza alpeorujito hidrolizado, exceptuando los ramnolípidos producidos a partir de alpeorujito HA.

El rendimiento de muchos procesos que utilizan residuos como fuente de carbono se ve incrementado cuando son sometidos a tratamientos previos (Taherzadeh y Karimi, 2008; Yang y Wyman, 2008). De la misma manera, las sustanciales mejoras en la productividad de biosurfactante alcanzada tras la hidrólisis enzimática del alpeorujito confirman que un adecuado pretratamiento del residuo puede ser un factor clave para optimizar su producción. Además es importante tener en cuenta que mientras muchos residuos necesitan algún pretratamiento físico antes de la fase de hidrólisis (Sun y Cheng, 2002), el alpeorujito es una pasta triturada. Este hecho podría suponer una ventaja del alpeorujito frente a otros residuos en el desarrollo de un proceso económicamente viable.

4.4.2. Estudio cinético de producción de biosurfactantes a partir de alpeorujito hidrolizado. Comparación con la glucosa como fuente de carbono.

Se ha llevado a cabo un estudio cinético con objeto de comparar la glucosa, una fuente de carbono utilizada de forma habitual en fermentaciones, con el alpeorujito hidrolizado enzimáticamente, el método más favorable en cuanto a producción de biosurfactante según los resultados expuestos anteriormente. A efecto de que la comparación sea efectiva, la concentración de glucosa al inicio del experimento será igual que la de azúcares solubles obtenido tras la hidrólisis enzimática del alpeorujito (2.11 g/L para una concentración del 2% de alpeorujito).

En términos generales, los resultados obtenidos para peso seco y producción de biosurfactante fueron bastante similares con ambas fuentes de carbono y para los dos microorganismos (Figuras 4-26 y 4-27).

El consumo de azúcares de la cepa de *P. aeruginosa* tuvo lugar en las primeras 24 horas de fermentación para ambas fuentes de carbono. En los experimentos realizados con alpeorujo-HE se observa una fracción de azúcares que no es consumida, y que permanece constante hasta el final de la fermentación en torno a los 0.65 g/L (Figura 4-26-b). Teniendo en cuenta que al usar glucosa el consumo de la misma es casi completo, estos azúcares no consumidos del alpeorujo-HE corresponderán a la fracción no fermentable. Esta misma fracción de azúcares no fermentables se observa también para los cultivos de *B. subtilis*, aunque es ligeramente inferior, tomando valores alrededor de los 0.5 g/L. De nuevo el consumo de la fracción fermentable de azúcares del alpeorujo-HE tuvo lugar durante las primeras 24 horas, mientras que en este caso el consumo de la glucosa se extendió hasta las 144 horas (Figura 4-27).

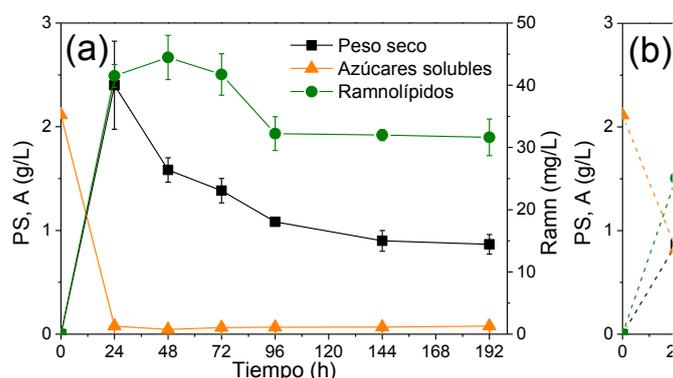


Figura 4-26. Peso seco (PS, g/L), concentración de azúcares solubles (A, g/L) y de ramnolípidos (eje derecho, Ramn, mg/L) en el medio de cultivo frente al tiempo de fermentación para los cultivos realizados con *P. aeruginosa*; usando como fuente de carbono (a) glucosa y (b) alpeorujo-HE al 2%.

Respecto al crecimiento celular, la *P. aeruginosa* alcanzó su máximo a las 24 y 48 horas para glucosa y alpeorujo-HE (Figura 4-26). Se observa por tanto cómo usando glucosa la velocidad de crecimiento y la multiplicación celular es mayor. Estas diferencias sugieren que el alpeorujo-HE no proporciona un medio tan favorable al crecimiento como lo hace la glucosa. Para el *B. subtilis* la glucosa de nuevo dio lugar a mayores valores de peso seco, aunque los resultados fueron similares con ambas fuentes de carbono. Su valor aumentó rápidamente las primeras 24 horas, y siguió

creciendo moderadamente hasta las 144, momento en el cual se comienza a observar la fase de muerte celular (Figura 4-27).

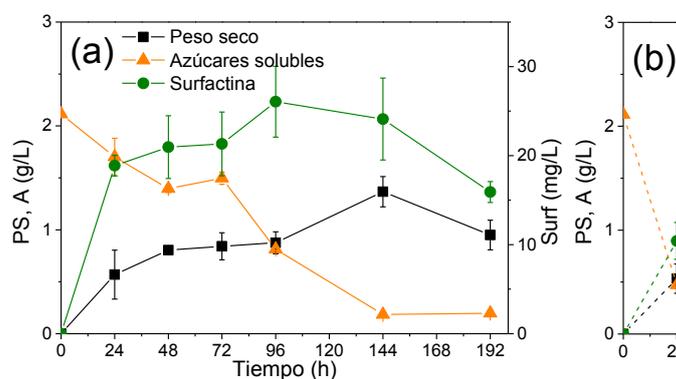


Figura 4-27. Peso seco (PS, g/L), concentración de azúcares solubles (A, g/L) y de surfactina (eje derecho, Surf, mg/L) en el medio de cultivo frente al tiempo de fermentación para los cultivos realizados con *B. subtilis*; usando como fuente de carbono (a) glucosa y (b) alpeorujo-HE al 2%.

Finalmente, en relación a la producción de biosurfactante, los resultados obtenidos fueron una vez más bastante similares para ambas fuentes de carbono. Cuando la cepa de *P. aeruginosa* crece en glucosa, la concentración de ramnolípidos alcanza un valor de 44.46 mg/L tras las primeras 48 horas de fermentación. Durante las siguientes 48 horas se observa un descenso en su concentración hasta los 30 mg/L, valor que se mantiene constante hasta el final del experimento. Clien y col. (2007) observaron una reducción similar en la concentración de ramnolípidos al usar NaNO_3 como fuente de nitrógeno. Al usar alpeorujo-HE no se observa este máximo ni el descenso posterior. En este caso los ramnolípidos alcanzan una concentración de 30 g/L tras las primeras 24 horas, la cual se mantuvo constante hasta el final del experimento.

La cepa de *B. subtilis* presentó el mismo perfil para ambas fuentes de carbono, la concentración de surfactina incrementó durante las primeras 96 horas de cultivo hasta los 26.05 y 18.99 mg/L para glucosa y alpeorujo-HE. Tras este máximo la concentración de surfactina comienza a descender suavemente, efecto que ya se expuso en el capítulo anterior.

En vista de estos resultados se puede afirmar que el alpeorujo-HE es una fuente de carbono comparable a la glucosa en términos de producción de biosurfactante. Especialmente si se tiene en cuenta los beneficios de usar un residuo agroindustrial barato como fuente de carbono para obtener una sustancia de alto valor añadido, a la

vez que se evitan los problemas medioambientales que el alpeorujito pueda ocasionar. Por otro lado, además de los mayores rendimientos obtenidos con alpeorujito hidrolizado en comparación a su uso en crudo, la cinética de la producción de ambos biosurfactantes es considerablemente más rápida usando el residuo hidrolizado. Este hecho supone una gran ventaja a la hora de producir biosurfactantes a una mayor escala.

También es necesario prestar atención fracción de azúcares hidrolizados que no es consumida por los microorganismos. Sería interesante considerar el uso de cepas que fuesen capaces de incorporar estos azúcares, lo cual podría suponer un aumento del rendimiento en la producción de biosurfactantes. En esta línea Meijnen y col. (2008) modificaron genéticamente la cepa de *P. putida* S12 de manera que fuese capaz de metabolizar la xilosa, empleándola en el crecimiento celular. Henkel (2012) apunta a que este tipo de ingeniería genética es necesario para una eficiente utilización de los residuos lignocelulósicos como fuente de carbono en la producción de biosurfactante.

4.4.3. Efecto de la concentración de alpeorujito hidrolizado. Comparación con el alpeorujito crudo.

Una de las conclusiones alcanzadas en la sección anterior es que la concentración de alpeorujito ejerce un efecto importante sobre el biosurfactante producido. Mientras que la *P. aeruginosa* incrementó considerablemente su rendimiento en ramnolípidos al aumentar la cantidad de alpeorujito en el medio, la cepa de *B. subtilis* vio reducida de manera significativa su producción de surfactina.

A continuación se muestran los resultados de los mismos experimentos, llevados a cabo en este caso con alpeorujito-HE. Comparando los resultados, se observa una mejora considerable de la producción de biosurfactante para las tres concentraciones ensayadas y los dos microorganismos estudiados (Figura 4-28)

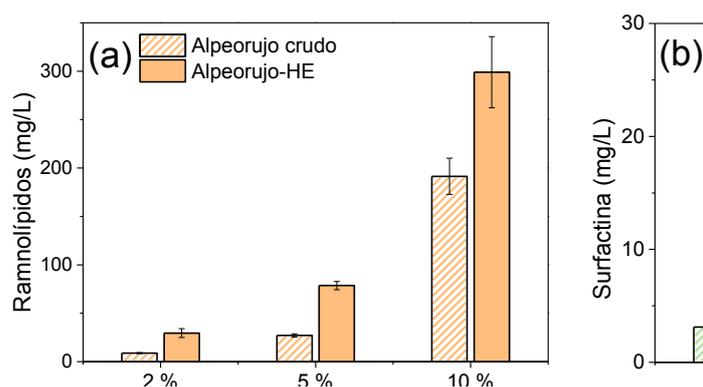


Figura 4-28. Concentración de (a) ramnolípidos y (b) surfactina obtenidos a partir de alpeorujito crudo (barras ralladas) y de alpeorujito-HE (barras coloreadas). Los resultados corresponden a cultivos realizados durante 144 horas, a 37 °C y 160 rpm con *P. aeruginosa* y *B. subtilis* respectivamente.

En términos relativos, la hidrólisis enzimática del alpeorujito supone un mayor incremento en la producción de surfactina, aunque como se ha dicho, mejora la producción de ambos biosurfactantes. En el caso de los ramnolípidos, el mayor incremento se observa al 2% de alpeorujito-HE donde la concentración es 3.4 veces mayor que si se usa alpeorujito crudo. Además, al igual que cuando se usa alpeorujito sin tratar, la máxima concentración de ramnolípidos se obtiene con un 10% de alpeorujito-HE y alcanza un valor de 298.98 mg/L, mejorándose la producción en un 50%.

Es interesante observar el comportamiento de la producción de surfactinas frente al aumento en la concentración de alpeorujito-HE, ya que es diferente al que presenta cuando el *B. subtilis* se alimenta con alpeorujito crudo. Usando el residuo pretratado enzimáticamente la máxima concentración de surfactina se obtuvo con un 5% del mismo en el medio, en lugar del 2%, y alcanza un valor de 26.5 mg/L, alrededor de unas 29 veces más que la obtenida con un 5% de alpeorujito crudo, y 8.5 veces más que el mejor rendimiento obtenido con el residuo bruto.

El máximo en la concentración de surfactina observado con un 5% de alpeorujito-HE sugiere que este pretratamiento enzimático y el consiguiente aumento en los azúcares biodisponibles podrían contrarrestar el efecto inhibitorio del sustrato sobre la producción de surfactina. Sin embargo, a una concentración del 10%, dicho efecto inhibitorio vuelve a hacerse patente, como se puede observar por la marcada reducción en su producción.

A la vista de estos resultados se puede afirmar que el incremento de los azúcares biodisponibles derivado de la hidrólisis enzimática del alpeorujó da lugar a una considerable mejora en la producción de ramnolípidos y surfactina. En ninguno de los casos se alcanzan los rendimientos obtenidos con glicerina en el capítulo anterior. De nuevo se debe tener en cuenta el bajo precio del producto de partida, sin embargo queda claro que el proceso de producción de biosurfactantes a partir de alpeorujó aún sigue siendo susceptible de una amplia mejora. En este sentido, y como se observó en el capítulo anterior, la concentración de alpeorujó es un factor clave que necesitaría ser optimizado para una hipotética producción de biosurfactante a mayor escala.

En términos de rendimientos producto/sustrato ($Y_{P/S}$) se observa la misma tendencia para alpeorujó crudo e hidrolizado enzimáticamente con ambos microorganismos (Tabla 4-8). Un incremento en la concentración de sustrato conlleva un incremento de $Y_{P/S}$ en los cultivos de *P. aeruginosa* y un descenso en los de *B. subtilis*. Se observa por tanto cómo la cepa de *B. subtilis* es más susceptible a la inhibición de la producción de biosurfactante provocada por el alpeorujó que la de *P. aeruginosa*. Es importante remarcar que esta inhibición también tiene lugar al usar alpeorujó-HE, ya que probablemente sea debida a la presencia fenoles en el residuo (Gursoy-Haksevenler y Arslan-Alaton, 2014).

Tabla 4-8. Rendimientos producto/sustrato ($Y_{P/S}$, en mg biosurfactante/g alpeorujó seco) para ramnolípidos y surfactina producidos a partir de alpeorujó crudo e hidrolizado enzimáticamente.

Concentración Alp	Ramnolípidos $Y_{P/S}$		Surfactina $Y_{P/S}$	
	Alp. Crudo	Alp-HE	Alp. Crudo	Alp-HE
2%	12.32	41.38	4.38	19.28
5%	15.20	44.10	0.52	14.87
10%	53.73	83.91	0.16	4.48

4.4.4. Presencia de fenoles en el medio de cultivo. Análisis de su influencia sobre el crecimiento microbiano y la producción de biosurfactantes.

En secciones previas se ha discutido el efecto inhibitorio del alpeorujó sobre la producción de biosurfactante, el cual probablemente es originado por los fenoles que este residuo contiene. El comportamiento de las dos cepas estudiadas a altas concentraciones de alpeorujó sugiere que la *P. aeruginosa* es más resistente a la

presencia de estos compuestos que el *B. subtilis*. Esta diferencia puede guardar relación con el hecho de que la *P. aeruginosa* sea una bacteria Gam-negativa, menos sensible a los fenoles que las Gram-positivas como el *B. subtilis* (Ramos-Cormenzana y col., 1996). Con objeto de obtener más información sobre este efecto se ha medido la concentración de fenoles en el medio de cultivo.

La Figura 4-28-a muestra la evolución de la concentración de compuestos fenólicos en el medio de cultivo durante el estudio cinético presentado en el apartado 4.4.2. Se puede observar cómo para los cultivos de *B. subtilis* la concentración de fenoles permanece casi constante, a valores similares a los obtenidos para el control (experimento llevado a cabo sin inóculo). Por el contrario, en los cultivos de *P. aeruginosa*, la concentración de fenoles descendió de manera continuada, alcanzando un valor del 71.5% respecto del inicial al cabo de 192 horas. Esta reducción en la concentración de fenoles es coherente con los resultados de trabajos previos que informan de que este microorganismo es capaz de metabolizar compuestos fenólicos (Mercadé y col., 1993; Venieri y col., 2010).

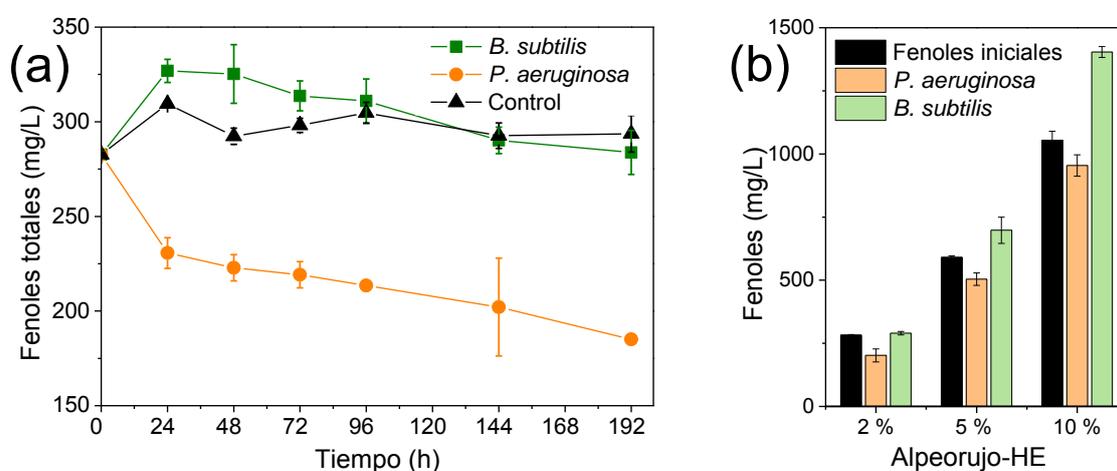


Figura 4-29. (a) Concentración de fenoles en los estudios cinéticos de *P. aeruginosa* y *B. subtilis* con alpeorujó-HE al 2%. El control corresponde a ensayos realizados sin inoculación. (b) Concentración de fenoles al inicio del cultivo y tras 6 días de fermentación para *P. aeruginosa* y *B. subtilis* a diferentes concentraciones de alpeorujó-HE.

En la Figura 4-29-b se muestra la concentración de fenoles al final del cultivo para distintas concentraciones de alpeorujó. Se puede comprobar cómo la reducción de la concentración de fenoles en los cultivos de *P. aeruginosa* es independiente de la cantidad de alpeorujó-HE. Por lo tanto, de existir, la velocidad a la que este

microorganismo es capaz de asimilar los fenoles parece ser reducida. En el caso del *B. subtilis* la concentración al final del cultivo es mayor que al inicio del mismo, siendo este efecto más claro al aumentar la concentración de alpeorujó. Se ha descrito la producción de lacasas por ciertas cepas de *Bacillus* y su habilidad para hidrolizar lignina (Chang y col., 2014; Sheikhi y col., 2012), por lo que esto podría explicar este incremento en la concentración de fenoles. Sin embargo esta hipótesis necesita más investigación para poder ser confirmada.

Se puede concluir por tanto que la reducción de la concentración de fenoles en los cultivos de *P. aeruginosa* y el incremento en los de *B. subtilis*, confirman que la primera es más resistente a los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujó. Además estos resultados concuerdan con la discusión realizada previamente acerca del efecto de la concentración de alpeorujó sobre la producción de biosurfactante por ambas cepas. En esta línea sería interesante estudiar el uso de cepas más resistentes o incluso que fuesen capaces de incorporar mayores cantidades de compuestos fenólicos como nutrientes y utilizarlos en la producción de biosurfactantes.

5. Conclusiones

El objetivo central de esta Tesis ha sido explorar nuevas vías de aprovechamiento de los residuos derivados de la industria oleícola. En líneas generales, a partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que es posible obtener sustancias con propiedades interfaciales tanto a partir de aceites usados mediante hidrólisis enzimática como a partir de alpeorujos mediante procesos de fermentación.

De manera más específica, en lo referente a la primera sección de la Tesis, queda demostrado que los aceites residuales de fritura son sustratos similares al aceite de grado alimenticio en lo que respecta a la obtención de productos de hidrólisis (ácidos grasos, mono- y diglicéridos). Esto es válido tanto para sistemas en emulsión aceite/agua como agua/aceite. El hecho de que no se aprecien diferencias significativas entre aceite usado y de grado alimentario abre la posibilidad de utilizar el residuo como materia prima para la hidrólisis enzimática de aceite vegetal. De esta manera, la obtención de productos químicos de alto valor añadido podría constituir una nueva estrategia de valorización para los aceites vegetales residuales. A su vez, de los resultados obtenidos en esta sección, se concluye lo siguiente:

1. De la optimización de los parámetros de las emulsiones aceite/agua (O/W) se obtiene que:

-
- El área interfacial de las emulsiones incrementa con la fracción volumétrica de aceite y con la relación emulsionante/aceite, mientras que la energía aplicada no tuvo un efecto significativo sobre este parámetro. Además, el G600 dio lugar a gotas en emulsión de menor tamaño que la GA, y por tanto a mayores áreas interfaciales específicas.
 - El principal parámetro que afecta a la estabilidad de las emulsiones es la fracción volumétrica de aceite, el único en el caso las emulsiones preparadas con GA. Sin embargo, la energía aplicada y su interacción con la fracción de aceite también estabilizaron las emulsiones preparadas con G600. A su vez se ha encontrado que en estas emulsiones la cantidad de surfactante ejerce un efecto negativo sobre su estabilidad, posiblemente debido a que al obtenerse gotas de menor tamaño no haya suficiente tensioactivo para cubrirlas por completo y prevenir su coalescencia.
 - Usando GA y a elevadas fracciones volumétricas de aceite (0.15) aparece una fase de retardo en la que no se observa desestabilización de la emulsión. Este fenómeno puede ser ventajoso para llevar a cabo reacciones de hidrólisis sin que se alteren las condiciones de la emulsión preparada.
2. Usando las condiciones de emulsificación más adecuadas encontradas en la etapa anterior se obtuvieron menores grados de hidrólisis usando G600, a pesar de que este emulsionante presenta mayores áreas interfaciales. La GA parece ser por tanto más adecuada para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis, ya que su influencia sobre la actividad enzimática es menor.
 3. Los datos de velocidad inicial de hidrólisis permiten seleccionar una concentración de enzima adecuada para llevar a cabo las hidrólisis en sistemas O/W, fijándose esta en 0.25 g/L. Además, se comprueba que la adsorción de las tres enzimas ensayadas (TLL, PFL y PPL) en la interfase grasa/agua se comporta según la isoterma de Langmuir. De entre ellas, la

TLL mostró la mayor velocidad máxima de hidrólisis y afinidad por la interfase grasa/agua.

4. En la hidrólisis enzimática de aceites vegetales el pH del medio acuoso juega un papel crucial. Si es superior al pKa de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis estos se encontrarán disociados, situándose en la interfase aceite/agua y bloqueando la adsorción de la enzima sobre la misma, lo que se ve reflejado en una drástica reducción de la actividad enzimática. Los ácidos grasos pueden ser retirados por precipitación mediante la adición de iones Ca^{2+} . A pHs inferiores al pKa la adición de iones Ca^{2+} no ejerce un efecto relevante ya que los ácidos grasos liberados estarán protonados.
5. El mayor grado de hidrólisis (porcentaje de enlaces ester hidrolizados) se consiguió con la enzima TLL a pH 8 y en ausencia de iones Ca^{2+} , un 64.4%. Con PFL y PPL el grado de hidrólisis fue ligeramente menor. Sin embargo usando estas enzimas la diferencia entre aceites usados y de grado alimentario fue mínima, mientras que con TLL sí se observa una diferencia considerable.
6. También se observaron diferencias en la distribución de glicéridos en función de la enzima usada. Por un lado la lipasa TLL mostró un comportamiento inespecífico, hidrolizando la mayoría de glicéridos hasta ácidos grasos y glicerina. Por el contrario PFL y PPL (esta última solo en presencia de iones Ca^{2+}) sí mostraron especificidad sn-1,3. Por lo tanto estas dos enzimas son más interesantes de cara a la producción de monoglicéridos, los productos de hidrólisis con un mayor valor añadido.

En lo referente a los resultados específicos del sistema en emulsión aceite en agua (W/O) se concluye que:

1. Estudiando el diagrama pseudo-ternario de las fases agua/isooctano/aceite se observa que la región de formación de la microemulsión W/O es más extensa para los dos aceites usados que la obtenida con la MC. Consecuentemente, el uso de aceites residuales ofrece la ventaja de poder

estabilizar mayores cantidades de agua en microemulsiones W/O que los vírgenes.

2. Se ha analizado la relación molar agua/AOT (W_0), obteniéndose un valor óptimo para cantidades de agua tales que el tamaño de la micela es similar al de la enzima. Además se ha encontrado que el valor óptimo de W_0 es independiente del tipo de aceite utilizado y de su concentración en la fase orgánica.
3. El sistema de microemulsión W/O permite trabajar con concentraciones de aceite mayores que cuando se usan emulsiones O/W, pudiendo llegar a tener exclusivamente aceite en la fase grasa. La fracción volumétrica a la que se producen más ácidos grasos oscila entre el 60 y el 80 %. Sin embargo, atendiendo a los valores de grado de hidrólisis, esta desciende continuamente con el aumento de la fracción grasa. Es por ello que es necesario llegar a un compromiso entre fracción volumétrica de aceite en la fase grasa y grado de hidrólisis. Analizando los resultados obtenidos se considera que un valor del 20 % cumple ambos requisitos de manera satisfactoria.
4. En cuanto a la concentración de enzima utilizada en este sistema se observa que el grado de hidrólisis aumenta hasta concentraciones de 1g/L en el medio. Sin embargo al aumentar la concentración de enzima se favorecen la interacción entre ellas al mismo tiempo que se saturan las micelas, fenómenos que afectan negativamente a la actividad específica. De nuevo es necesario seleccionar un valor de compromiso entre ambos efectos, eligiéndose 0.2 g/L.
5. Al estudiar la distribución de productos de hidrólisis a lo largo del tiempo se observa que la concentración de diglicéridos permanece constante para las dos enzimas ensayadas (TLL y PFL). Esto implica que los DAG producidos al hidrolizarse los TAG son a su vez hidrolizados sin llegar a acumularse.

6. De las dos enzimas utilizadas la PFL dio lugar a una mayor cantidad de MAG. Sin embargo en ambos casos los MAG producidos fueron hidrolizados en su mayoría. En este caso ambas enzimas presentan una especificidad sn-1,3 menor que en las emulsiones O/W, con lo cual la cantidad de MAG producida también fue menor.

Por otro lado, respecto a la segunda sección de la Tesis, se ha comprobado que el alpeorujó puede sustentar el crecimiento de dos cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. Ambos microorganismos produjeron biosurfactantes utilizando alpeorujó como única fuente de carbono. A fecha de hoy el alpeorujó no cuenta con una aplicación clara, a pesar de que su alto contenido en materia orgánica lo convierte en un subproducto de potencial interés. En esta Tesis se ha probado que es posible obtener biosurfactantes a partir de este residuo, planteando una aplicación del alpeorujó que podría llegar a ser económicamente viable. De manera más específica se puede concluir que:

1. Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* PAO1 y *Bacillus subtilis* N1 fueron capaces de crecer en cultivos líquidos y producir ramnolípidos y surfactina respectivamente usando exclusivamente alpeorujó como fuente de carbono.
2. Los fenoles presentes en el alpeorujó ejercen un efecto inhibitorio sobre la habilidad para producir biosurfactantes de ambas cepas. La cepa de *Pseudomonas* presentó una mayor resistencia a estos compuestos, e incluso incrementó la cantidad de ramnolípidos producidos al aumentar la concentración de alpeorujó en el medio de cultivo.
3. La fracción de aceite residual es el principal constituyente del alpeorujó crudo implicado en la producción de biosurfactante. El resto de la producción es sustentado por los azúcares solubles presentes en el mismo.
4. Hidrolizando la fracción celulósica y hemicelulósica del alpeorujó se libera una cantidad considerable de azúcares solubles, mejorando la biodisponibilidad del material orgánico presente en este residuo. Se ha comprobado que usando alpeorujó hidrolizado como fuente de carbono la cantidad de biosurfactante producido por ambas cepas incrementa de

manera significativa. Por lo tanto, un pretratamiento adecuado del alpeorujó puede ayudar a aprovechar de manera íntegra toda la materia orgánica que contiene.

5. De los tres métodos ensayados, la hidrólisis enzimática fue la que supuso un mayor incremento en la producción de biosurfactantes, a pesar de ser la que hidrolizó en menor grado el alpeorujó. Por el contrario, los subproductos formados en los dos otros métodos de hidrólisis a consecuencia del uso de ácidos redujeron el rendimiento de biosurfactante de ambas cepas.
6. La cinética de crecimiento y de producción de biosurfactantes de ambos microorganismos fue más rápida al usar alpeorujó hidrolizado enzimáticamente que crudo. Este hecho puede suponer una ventaja clave a la hora de diseñar un proceso a gran escala, ya que la productividad mejora considerablemente al usar alpeorujó hidrolizado.
7. Ambos microorganismos mostraron un comportamiento muy similar al crecer con glucosa como fuente de carbono que el observado con alpeorujó hidrolizado enzimáticamente. De esta manera se confirma que el alpeorujó puede ser una alternativa viable a ciertas fuentes de carbono tradicionales usadas en fermentaciones.
8. El aumento de carbono biodisponible tras la hidrólisis del alpeorujó enmascara parcialmente el efecto inhibitorio de los fenoles, de manera que es posible obtener mayores cantidades de surfactina incrementando, hasta cierto punto, la concentración de alpeorujó.
9. Solamente la cepa de *Pseudomonas* mostró cierta habilidad para metabolizar parte de los fenoles presentes en el alpeorujó.

6. Bibliografía

Abu Tayeh, H., Najami, N., Dosoretz, C., Tafesh, A., Azaizeh, H., 2014. Potential of bioethanol production from olive mill solid wastes. *Bioresour. Technol.* 152, 24–30. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.102.

Albuquerque, J., 2004. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour. Technol.* 91, 195–200. doi:10.1016/S0960-8524(03)00177-9.

Albuquerque, J. a, González, J., García, D., Cegarra, J., 2007. Effects of a compost made from the solid by-product (“alperujo”) of the two-phase centrifugation system for olive oil extraction and cotton gin waste on growth and nutrient content of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Bioresour. Technol.* 98, 940–5. doi:10.1016/j.biortech.2006.04.014.

Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Perego, P., 2011. Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor. *Food Chem.* 128, 704–710. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.092.

Almeida, J.R.M., Bertilsson, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Gorsich, S., Lidén, G., 2009. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 625–638. doi:10.1007/s00253-009-1875-1.

Anneken, D.J., Both, S.; Christoph, R., Fieg, G., Steinberner, U., Westfechtel, A., 2000. Fatty acids, in: *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag.

- Ask, M., Bettiga, M., Duraiswamy, V.R., Olsson, L., 2013. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. *Biotechnol. Biofuels* 6, 181. doi:10.1186/1754-6834-6-181.
- Banat, I.M., De Rienzo, M. a. D., Quinn, G. a., 2014a. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9915–9929. doi:10.1007/s00253-014-6169-6.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 427–444. doi:10.1007/s00253-010-2589-0.
- Banat, I.M., Satpute, S.K., Cameotra, S.S., Patil, R., Nyayanit, N. V., 2014b. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front. Microbiol.* 5, 1–18. doi:10.3389/fmicb.2014.00697.
- Bednarski, W., Adamczak, M., Tomasik, J., Płaszczyk, M., 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresour. Technol.* 95, 15–18. doi:10.1016/j.biortech.2004.01.009.
- Benincasa, M., Abalos, a, Oliveira, I., Manresa, a, 2004. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85, 1–8. doi:10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41.
- Bergström, S., Theorell, H., Davide, H., 1946. On a metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Ark Kemi Miner. Geol.* 23, 1–12.
- Biodienet project, 2009. El Libro - The Handbook for Local Initiatives for Biodiesel from Recycled Oil.
- Bornscheuer, U.T., 2000. *Enzymes in Lipid Modification*, 1st ed. Wiley-VCH.
- Bornscheuer, U.T., 1995. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 578–586. doi:10.1016/0141-0229(94)00096-A.
- Brozzoli, V., Bartocci, S., Terramoccia, S., Contò, G., Federici, F., D'Annibale, A., Petruccioli, M., 2010. Stoned olive pomace fermentation with *Pleurotus* species and its evaluation as a possible animal feed. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 223–228. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.09.008.

Cammarota, M.C., Freire, D.M.G., 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresour. Technol.* 97, 2195–210. doi:10.1016/j.biortech.2006.02.030.

Campanari, S., e Silva, F. a., Bertin, L., Villano, M., Majone, M., 2014. Effect of the organic loading rate on the production of polyhydroxyalkanoates in a multi-stage process aimed at the valorization of olive oil mill wastewater. *Int. J. Biol. Macromol.* 71, 34–41. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.006.

Campos, J.M., Montenegro Stamford, T.L., Sarubbo, L.A., de Luna, J.M., Rufino, R.D., Banat, I.M., 2013. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol. Prog.* 29, 1097–1108. doi:10.1002/btpr.1796.

Canakci, M., 2007. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Bioresour. Technol.* 98, 183–190. doi:10.1016/j.biortech.2005.11.022.

Cardoso, S.M., Coimbra, M. a., Lopes da Silva, J. a., 2003. Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydr. Polym.* 52, 125–133. doi:10.1016/S0144-8617(02)00299-0.

Carvalho, C.M., Cabral, J.M., 2000. Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* 82, 1063–85.

Chang, Q.-L., Chen, J.-Y., 1995. Inhibition of lipase-catalyzed hydrolysis of sunflower oil in AOT/isooctane reversed micelles. *Bioprocess Eng.* 13, 157–159. doi:10.1007/BF00369699.

Chang, Y.C., Choi, D., Takamizawa, K., Kikuchi, S., 2014. Isolation of *Bacillus* sp. strains capable of decomposing alkali lignin and their application in combination with lactic acid bacteria for enhancing cellulase performance. *Bioresour. Technol.* 152, 429–436. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.032.

Chen, C.-Y., Baker, S.C., Darton, R.C., 2006. Batch production of biosurfactant with foam fractionation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 1923–1931. doi:10.1002/jctb.

Chen, J.-P., Pai, H., 1991. Hydrolysis of milk fat with lipase in reversed micelles. *J. Food Sci.* 56, 234–237. doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb08018.x.

Christiansen, A., Backensfeld, T., Weitschies, W., 2010. Effects of non-ionic surfactants on in vitro triglyceride digestion and their susceptibility to digestion by pancreatic enzymes. *Eur.J. Pharm. Sci.* 41, 376–82. doi:10.1016/j.ejps.2010.07.005.

Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł., Czaczyk, K., 2012. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 401–419. doi:10.1007/s11274-011-0854-8.

Clien, S.Y., Lu, W. Bin, Wei, Y.H., Chen, W.M., Chang, J.S., 2007. Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Biotechnol. Prog.* 23, 661–666. doi:10.1021/bp0700152.

Cochrane, S.A., Vederas, J.C., 2014. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A gold mine of antibiotic candidates. *Med. Res. Rev.* 1292–1327. doi:10.1002/med.21321.

Cooper, D.G., 1986. Biosurfactants. *Microbiol. Sci.* 3, 145–9.

Cordova, J., Nemmaoui, M., Ismaïli-Alaoui, M., Morin, A., Roussos, S., Raimbault, M., Benjlali, B., 1998. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 5, 75–78. doi:10.1016/S1381-1177(98)00067-8.

Cruz-Peragón, F., Palomar, J.M., Ortega, A., 2006. Ciclo energético integral del sector oleícola en la provincia de Jaén (España). *Grasas y Aceites* 57, 219–228.

Dahrazma, B., Mulligan, C.N., 2004. Extraction of copper from a low-grade ore by rhamnolipids. *Pr. Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manag.* 8, 166–172.

Davis, D. a., Lynch, H.C., Varley, J., 1999. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 322–329. doi:10.1016/S0141-0229(99)00048-4.

Demirbas, A., 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Appl. Energy* 86, S108–S117. doi:10.1016/j.apenergy.2009.04.036.

Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., 2013. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem.* 48, 1532–1552. doi:10.1016/j.procbio.2013.07.010.

Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47-64.

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., Villemur, R., 2000. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim. Biophys. Acta.* 1485, 145–152. doi:10.1016/S1388-1981(00)00039-1.

- Díaz, R., Saparrat, M.C.N., Jurado, M., García-Romera, I., Ocampo, J.A., Martínez, M.J., 2010. Biochemical and molecular characterization of *Corioloropsis rigida* laccases involved in transformation of the solid waste from olive oil production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 133–42. doi:10.1007/s00253-010-2723-z.
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A.J., Bohlmann, G., 2013. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6437. doi:10.1039/c3cs35506c.
- Divakar, S., Manohar, B., 2007. Use of lipases in the industrial production of esters, in: Polaina, J., MacCabe, A.P. (Eds.), *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. Springer, The Netherlands, p. 633.
- El-Laithy, H.M., 2003. Preparation and physicochemical characterization of dioctyl sodium sulfosuccinate (aerosol OT) microemulsion for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech* 4, 1–10. doi:10.1208/pt040111.
- Elmadfa, I., Kornsteiner, M., 2009. Fats and fatty acid requirements for adults. *Ann. Nutr. Metab.* 55, 56–75. doi:10.1159/000228996.
- FAO, 2008. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos. *Estud. FAO. Aliment. y Nutr.* doi:978-92-5-3067336.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or “alperujo.” *J. Agric. Food Chem.* 50, 6804–6811. doi:10.1021/jf011712r.
- Fernandez-Lafuente, R., 2010. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 62, 197–212. doi:10.1016/j.molcatb.2009.11.010.
- Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Fuentes, M., Mateo, C., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., 2003. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 232–7. doi:10.1002/bit.10560.
- Franqueville, E., Loutrari, H., Mellou, F., Stamatis, H., Friboulet, A., Kolisis, F., 2003. Reverse micelles, a system for antibody-catalysed reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 21, 15–17. doi:10.1016/S1381-1177(02)00130-3.
- Georgieva, T.I., Ahring, B.K., 2007. Potential of agroindustrial waste from olive oil industry for fuel ethanol production. *Biotechnol. J.* 2, 1547–55. doi:10.1002/biot.200700128.

- Geys, R., Soetaert, W., Van Bogaert, I., 2014. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 30C, 66–72. doi:10.1016/j.copbio.2014.06.002
- Gobierno de España, 2015. Informe del Consumo de Alimentación en España. URL <http://www.magrama.gob.es/es/>
- Goto, A., Yoshioka, H., Manabe, M., Goto, R., 1995. NMR spectroscopic study on the dissolution of water in sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate/toluene solution. *Langmuir* 4873–4875.
- Gursoy-Haksevenler, B.H., Arslan-Alaton, I., 2014. UV fluorescence, FTIR, and GC–MS analyses and resin fractionation procedures as indicators of the chemical treatability of olive mill wastewater. *Desalin. Water Treat.* 1–11. doi:10.1080/19443994.2014.992979.
- Haagensen, F., Skiadas, I. V., Gavala, H.N., Ahring, B.K., 2009. Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass and Bioenergy* 33, 1643–1651. doi:10.1016/j.biombioe.2009.08.006.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M., Manresa, A., 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 379–387. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00961.x.
- Han, D., Rhee, J.S., 1985. Batchwise hydrolysis of olive oil by lipase in AOT-isooctane reverse micelles. *Biotechnol. Lett.* 7, 651–656. doi:10.1007/BF01040203.
- Han, D., Rhee, J.S., Lee, S.B., 1987. Lipase reaction in AOT-isooctane reversed micelles: effect of water on equilibria. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 381–8. doi:10.1002/bit.260300309.
- Hasenhuettl, G.L., Hartel, R.W., 2008. Food emulsifiers and their applications, 2nd ed. Springer. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Hayes, D.G., 2004. Enzyme-Catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81, 1077–1103. doi:10.1007/s11746-004-1024-2.
- Hayes, D.G., 2000. Lipid modification in water-in-oil microemulsions, in: Bornscheuer, U.T. (Ed.), *Enzymes in Lipid Modification*. Wiley-VCH, p. 424.
- Henkel, M., Müller, M.M., Kügler, J.H., Lovaglio, R.B., Contiero, J., Syldatk, C., Hausmann, R., 2012. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources:

Concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochem.* 47, 1207–1219. doi:10.1016/j.procbio.2012.04.018.

Hermansyah, H., Kubo, M., Shibasaki-Kitakawa, N., Yonemoto, T., 2006. Mathematical model for stepwise hydrolysis of triolein using *Candida rugosa* lipase in biphasic oil–water system. *Biochem. Eng. J.* 31, 125–132. doi:10.1016/j.bej.2006.06.003.

Holmberg, K., Osterberg, E., 1988. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 1544–1548. doi:10.1007/BF02898325.

Hu, M., Li, Y., Decker, E.A., McClements, D.J., 2010. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. *Food Hydrocoll.* 24, 719–725. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.03.010.

Hwang, S., Lee, S., Ahn, I.-S., Jung, J.-K., 2009. Highly efficient production of monoglycerides by the continuous removal of fatty acids from lipase-catalyzed oil hydrolysis. *Biocatal. Biotransformation* 27, 290–295. doi:10.3109/10242420903109376.

Jain, R.M., Mody, K., Joshi, N., Mishra, A., Jha, B., 2013. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 52–8. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.08.030.

Jarvis, F.G., Johnson, M.J., 1949. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 71, 4124–4126. doi:10.1021/ja01180a073.

Jéquier, E., 1999. Response to and range of acceptable fat intake in adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53 Suppl 1, S84–8; discussion S88–93. doi:10.1038/sj.ejcn.1600746.

Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A.J., 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* 99, 195–199. doi:10.1016/j.biortech.2006.12.010.

Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Fernández-Serrano, M., García-Román, M., 2008. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in o/w emulsions. Study of the initial rates and the reaction time course. *Biochem. Eng. J.* 40, 473–484. doi:10.1016/j.bej.2008.02.002.

Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Fernández-Serrano, M., García-Román, M., 2006. Kinetic model for the enzymatic hydrolysis of tributyrin in O/W emulsions. *Chem. Eng. Sci.* 61, 5010–5020. doi: 10.1016/j.ces.2006.03.050.

- Jurado, E., García-Román, M., Luzón, G., Altmajer-Vaz, D., Jiménez-Pérez, J.L., 2011. Optimization of lipase performance in detergent formulations for hard surfaces. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 11502–11510. doi:10.1021/ie201486a.
- Kabanov, A. V, Levashov, A. V, Klyachko, N.L., Namyotkin, S.N., Pshezhetsky, A. V, 1988. Enzymes entrapped in reversed micelles of surfactants in organic solvents: A theoretical treatment of the catalytic activity regulation. *J. Theor. Biol.* 327–343.
- Kanicky, J.R., Shah, D.O., 2002. Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids. *J. Colloid Interface Sci.* 256, 201–207. doi:10.1006/jcis.2001.8009.
- Karmee, S.K., 2008. Lipase catalyzed synthesis of ester-based surfactants from biomass derivatives. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2, 144–154. doi:10.1002/bbb.60.
- Kierkels, J.G., Vleugels, L.F., Geladé, E.T., Vermeulen, D.P., Kamphuis, J., Wandrey, C., van den Tweel, W.J., 1994. *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorption and the kinetics of hydrolysis in a dynamic emulsion system. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 513–21. doi:10.1016/0141-0229(94)90023-X.
- Klibanov, A.M., 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409, 241–246.
- Klyachko, N.L., Levashov, A. V, 2003. Bioorganic synthesis in reverse micelles and related systems 8, 179–186. doi:10.1016/S1359-0294.
- Kojima, Y., Shimizu, S., 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 219–226. doi:10.1016/S1389-1723(03)80185-8.
- Kojima, Y., Yokoe, M., Mase, T., 1994. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1564–8.
- Konishi, M., Imura, T., Fukuoka, T., Morita, T., Kitamoto, D., 2007. A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows high binding affinity towards lectins on a self-assembled monolayer system. *Biotechnol. Lett.* 29, 473–80. doi:10.1007/s10529-006-9261-x.
- Kosswig, K., 2000. Surfactants, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag.

- Koutrouli, E.C., Kalfas, H., Gavala, H.N., Skiadas, I. V., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 2009. Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp. *Bioresour. Technol.* 100, 3718–3723. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.037.
- Kuiken, B.A., Behnke, W.D., 1994. The activation of porcine pancreatic lipase by cis-unsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214, 148–160. doi:10.1016/0005-2760(94)90039-6
- Kwon, D.Y., Rhee, J.S., 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 89–92. doi:10.1007/BF02676129.
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal, M.J., Lynd, L.R., 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour. Technol.* 81, 33–44. doi:10.1016/S0960-8524(01)00103-1.
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J.-C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J.-L., Asther, M., Labat, M., 2001. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem.* 75, 501–507. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00227-8.
- Li, W., Du, W., Li, Q., Sun, T., Liu, D., 2010. Study on acyl migration kinetics of partial glycerides: Dependence on temperature and water activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 63, 17–22. doi:10.1016/j.molcatb.2009.11.012.
- Li, Z., Wrenn, B.A., 2004. Effects of ferric hydroxide on the anaerobic biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil in freshwater sediments. *Water Res.* 38, 3859–3868. doi:10.1016/j.watres.2004.07.010.
- Lima, T.M.S., Procópio, L.C., Brandão, F.D., Leão, B. a., Tótola, M.R., Borges, A.C., 2011. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. *Bioresour. Technol.* 102, 2957–2964. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.109.
- Linares, A., Manuel Caba, J., Ligeró, F., De La Rubia, T., Martínez, J., 2003. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavido-alba*. *Chemosphere* 51, 887–891. doi:10.1016/S0045-6535(03)00096-1.
- Lotfabad, T.B., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A.R., Adelzadeh, M.R., Noghabi, K.A., 2009. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 69, 183–93. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.11.018.

- Lotti, M., Alberghina, L., 2007. Lipases: Molecular Structure and Function, in: Polaina, J., MacCabe, A.P. (Eds.), *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. Springer, the Netherlands, p. 633.
- Luisi, P.L., Haring, G., Maestro, M., Rialdi, G., 1990. Proteins solubilized in organic solvents via reverse micelles: thermodynamic studies. *Thermochim. Acta* 162, 1–16.
- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J.M., Clark, J.H., Hidalgo, J.M., Luna, D., Marinas, J.M., Romero, A.A., 2008. Biofuels: a technological perspective. *Energy Environ. Sci.* 1, 542. doi:10.1039/b807094f.
- Maass, D., Moya Ramírez, I., García Román, M., Jurado Alameda, E., Ulson de Souza, A.A., Borges Valle, J.A., Altmajer Vaz, D., 2015. Two-phase olive mill waste (alpeorujo) as carbon source for biosurfactant production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* n/a–n/a. doi:10.1002/jctb.4790.
- Magina, M. a, Gilioli, A., Moresco, H.H., Colla, G., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M.C., 2010. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Lat. Am. J. Pharm.* 29, 376–382.
- Majhi, P.R., Moulik, S.P., 1999. Microcalorimetric Investigation of AOT self-association in oil and the state of pool water in water/oil microemulsions. *J. Phys. Chem. B* 103, 5977–5983. doi:10.1021/jp9838590.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1, 5. doi:10.1186/2191-0855-1-5.
- Marchant, R., Banat, I.M., 2012a. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol. Lett.* 34, 1597–605. doi:10.1007/s10529-012-0956-x.
- Marchant, R., Banat, I.M., 2012b. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol.* 30, 558–65. doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.003.
- Marin, C.P., Kaschuk, J.J., Frollini, E., Nitschke, M., 2015. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. *Ind. Crops Prod.* 66, 239–245. doi:10.1016/j.indcrop.2015.01.001.
- Martín García, A. I., Moumen, A., Yáñez Ruiz, D.R., Molina Alcaide, E., 2003. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage

olive cake and olive leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 107, 61–74. doi:10.1016/S0377-8401(03)00066-X.

McNamara, C.J., Anastasiou, C.C., O’Flaherty, V., Mitchell, R., 2008. Bioremediation of olive mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 61, 127–134. doi:10.1016/j.ibiod.2007.11.003.

Meena, K.R., Kanwar, S.S., 2015. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–9. doi:10.1155/2015/473050.

Meijnen, J.-P., de Winde, J.H., Ruijsenaars, H.J., 2008. Engineering *Pseudomonas putida* S12 for efficient utilization of D-xylose and L-arabinose. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5031–7. doi:10.1128/AEM.00924-08.

Mercadé, M.E., Manresa, M.A., Robert, M., Espuny, M.J., de Andrés, C., Guinea, J., 1993. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Bioresour. Technol.* 43, 1–6. doi:10.1016/0960-8524(93)90074-L.

Mizumoto, S., Hirai, M., Shoda, M., 2006. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 869–75. doi:10.1007/s00253-006-0389-3.

Mnif, I., Ghribi, D., 2015. High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 691–706. doi:10.1007/s11274-015-1830-5.

Montgomery, D.C., 2008. *Design and Analysis of Experiments*, 8th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.

Moreno, E., Quevedo, J., Ramos-Cormenzana, A., 1990. Antimicrobial activity of wastewaters from olive oil mills, in: Cheremisoff, P.N. (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Control Technology*. Gulf Publishing Co., Houston, pp. 731–757.

Müller, M.M., Hausmann, R., 2011. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 251–264. doi:10.1007/s00253-011-3368-2.

Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133, 183–198. doi:10.1016/j.envpol.2004.06.009.

Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Eng. Geol.* 60, 371–380.

Muñoz Ciudad, C., Sosvilla Rivero, S., Maudos Villarroya, J., Salamanca, J., Soler, A., Chorén, P., Robledo, J.C., 2013. Informe económico del año 2013 de la Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas.

Murgia, S., Caboi, F., Monduzzi, M., Ljusbert-Wahren, H., Nylander, T., 2002. Acyl migration and hydrolysis in monoolein-based systems. *Progr. Colloid Polym. Sci* 120, 41–46.

Naoe, K., Awatsu, S., Yamada, Y., Kawagoe, M., Nagayama, K., Imai, M., 2004. Solvent condition in triolein hydrolysis by *Rhizopus delemar* lipase using an AOT reverse micellar system. *Biochem. Eng. J.* 18, 49–55. doi:10.1016/j.bej.2003.10.001.

Neves Petersen, M.T., Fojan, P., Petersen, S.B., 2001. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J. Biotechnol.* 85, 115–147.

Niaounakis, M., Halvadakis, C.P., 2006. Characterization of olive processing waste, in: Niaounakis, M., Halvadakis, C.P. (Eds.), *Olive Processing Waste Management Literature Review and Patent Survey*. Elsevier, pp. 23–64.

Nitschke, M., Costa, S.G., Haddad, R., Gonçalves, L., Eberlin, M.N., Contiero, J., 2005. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnol. Prog.* 21, 1562–6. doi:10.1021/bp050198x.

Nitschke, M., Pastore, G.M., 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour. Technol.* 97, 336–341. doi:10.1016/j.biortech.2005.02.044.

Nitschke, M., Pastore, G.M., 2004. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 112, 163–72. doi:10.1385/ABAB:112:3:163.

Noah, K.S., Bruhn, D.F., Bala, G.A., 2005. Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121–124, 465–473.

Noriyasu, K., Gou, S., 2002. WO0212159A1.

Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stockmann, R., 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 53, 823–837. doi:10.1021/jf048569x.

Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633–54. doi:10.3390/ijms12010633.

Papadimitriou, V., Xenakis, A., Cazianis, C.T., Kolisis, F.N., 1997. Structural and catalytic aspects of cutinase in w/o microemulsions. *Colloid Polym Sci.* 275, 609–616.

Park, K.M., Kwon, C.W., Choi, S.J., Son, Y.H., Lim, S., Yoo, Y., Chang, P.S., 2013. Thermal deactivation kinetics of *Pseudomonas fluorescens* lipase entrapped in AOT/isooctane reverse micelles. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9421–7. doi:10.1021/jf402539m.

Parra, A., Rivas, F., Lopez, P.E., Garcia-Granados, A., Martinez, A., Albericio, F., Marquez, N., Muñoz, E., 2009. Solution and solid phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 1139–1145. doi:10.1016/j.bmc.2008.12.041.

Patel, S., Ahmed, S., Eswari, J.S., 2015. Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1177–1193. doi:10.1007/s11274-015-1880-8.

Pattara, C., Cappelletti, G.M., Cichelli, A., 2010. Recovery and use of olive stones: Commodity, environmental and economic assessment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 1484–1489. doi:10.1016/j.rser.2010.01.018.

Perez, J., Rubia, T.D., Moreno, J., Nez, J.M., 1992. Activity of Olive Oil Waste Waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 489–495.

Polizelli, M.A., Telis, V.R.N., Amaral, L.Q., Feitosa, E., 2006. Formation and characterization of soy bean oil/surfactant/water microemulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 281, 230–236. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.02.043.

Pubchem. Compound summary for CID.

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/264#section=Top>.

Quek, A., Balasubramanian, R., 2014. Life cycle assessment of energy and energy carriers from waste matter - A review. *J. Clean. Prod.* 79, 18–31. doi:10.1016/j.jclepro.2014.05.082.

Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., McClean, S., Marchant, R., Banat, I.M., 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol. Prog.* 18, 1277–81. doi:10.1021/bp020071x.

Ramos-Cormenzana, A., Juárez-Jiménez, B., Garcia-Pareja, M.P., 1996. Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 38, 283–290. doi:10.1016/S0964-8305(96)00061-3.

Raza, Z.A., Rehman, A., Khan, M.S., Khalid, Z.M., 2007. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. *Biodegradation* 18, 115–121. doi:10.1007/s10532-006-9047-9.

Reis, P., Holmberg, K., Miller, R., Krägel, J., Grigoriev, D.O., Leser, M.E., Watzke, H.J., 2008. Competition between lipases and monoglycerides at interfaces. *Langmuir* 24, 7400–7. doi:10.1021/la800531y.

Reis, R., Pacheco, G., Pereira, A., Freire, D., 2013. Biosurfactants: production and applications, in: Chamy, R. (Ed.), *Biodegradation-Life of Science*. pp. 31–61. doi:45092.

Rincón, B., Borja, R., Martín, M.A., Martín, A., 2009. Evaluation of the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion process of acidified olive mill solid residue from a previous hydrolytic-acidogenic step. *Waste Manag.* 29, 2566–73. doi:10.1016/j.wasman.2009.04.009.

Rincón, B., Feroso, F., Borja, R., 2012. Olive oil mill waste treatment: Improving the sustainability of the olive oil industry with anaerobic digestion technology, in: Boskou, D. (Ed.), *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. InTech, p. 19.

Robert, M., Mercadé, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M. a., Guinea, J., 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Lett.* 11, 871–874. doi:10.1007/BF01026843.

Robins, M.M., 2000. Emulsions — creaming phenomena. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5, 265–272. doi:10.1016/S1359-0294(00)00065-0.

Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Oliveira, R., 2006. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochem. Eng. J.* 32, 135–142. doi:10.1016/j.bej.2006.09.012.

- Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresour. Technol.* 99, 5261–5269. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.027.
- Rodríguez-Ruiz, J., Belarbi, E.-H., Sánchez, J.L.G., Alonso, D.L., 1998. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnol. Tech.* 12, 689–691. doi:10.1023/A:1008812904017.
- Roelants, S.L.K.W., De Maeseneire, S.L., Ciesielska, K., Van Bogaert, I.N., Soetaert, W., 2014. Biosurfactant gene clusters in eukaryotes: regulation and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–13. doi:10.1007/s00253-014-5547-4.
- Rosen, M.J., Kunjappu, J.T., 2012. *Surfactants and interfacial phenomena*, 4th ed. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Rufino, R. D., Sarubbo, L. A., Campos-Takaki, G. M., 2007. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 729–734. doi:10.1007/s11274-006-9278-2.
- Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J. A., Stazi, S.R., García-Romera, I., 2005. Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere* 60, 1393–1400. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.093.
- Sampedro, I., Marinari, S., D'Annibale, A., Grego, S., Ocampo, J.A., García-Romera, I., 2007. Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 60, 116–125. doi:10.1016/j.ibiod.2007.02.001.
- Saparrat, M.C.N., Jurado, M., Díaz, R., Romera, I.G., Martínez, M.J., 2010. Transformation of the water soluble fraction from “alpeorujo” by *Corioloropsis rigida*: the role of laccase in the process and its impact on *Azospirillum brasiliense* survival. *Chemosphere* 78, 72–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.050.
- Schmid, R.D., Verger, R., 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* 37, 1608–1633. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V.
- Sheikhi, F., Roayaei Ardakani, M., Enayatizamir, N., Rodriguez-Couto, S., 2012. The determination of assay for laccase of *Bacillus subtilis* WPI with two classes of chemical compounds as substrates. *Indian J. Microbiol.* 52, 701–7. doi:10.1007/s12088-012-0298-3.

Siles, J.A., Pérez-Mendoza, D., Ibáñez, J.A., Scervino, J.M., Ocampo, J.A., García-Romera, I., Sampedro, I., 2014. Assessing the impact of biotransformed dry olive residue application to soil: Effects on enzyme activities and fungal community. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 89, 15–22. doi:10.1016/j.ibiod.2014.01.001.

Skagerlind, P., Jansson, M., Bergenståhl, B., Hult, K., 1995. Binding of *Rhizomucor miehei* lipase to emulsion interfaces and its interference with surfactants. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 4, 129–135. doi:10.1016/0927-7765(94)01167-4.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R.O., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Energy, D. of, 2011. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Lab. Anal. Proced.* doi:NREL/TP-510-42618.

Smyth, T.J.P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., Banat, I.M., 2010a. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants, in: Timmis, K. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology SE* - 290. Springer Berlin Heidelberg, pp. 3687–3704. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_290.

Smyth, T.J.P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., Banat*, I.M., 2010b. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids, in: Timmis, K. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 3706–3723. doi:10.1007/978-3-540-77587-4.

Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Zerkowski, J.A., Foglia, T.A., 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol. Lett.* 29, 1341–1347. doi:10.1007/s10529-007-9407-5.

Sotirova, A.V., Spasova, D.I., Galabova, D.N., Karpenko, E., Shulga, A., 2008. Rhamnolipid – Biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. *Curr. Microbiol.* 56, 639–644. doi:10.1007/s00284-008-9139-3.

Souza Monteiro, A., Domingues, V.S., Souza, M. Vd, Lula, I., Gonçalves, D.B., de Siqueira, E.P., Dos Santos, V.L., 2012. Bioconversion of biodiesel refinery waste in the bioemulsifier by *Trichosporon mycotoxinivorans* CLA2. *Biotechnol. Biofuels* 5, 29. doi:10.1186/1754-6834-5-29.

Suárez, M., Romero, M.-P.P., Ramo, T., Macià, A., Motilva, M.-J.J., 2009. Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1463–72. doi:10.1021/jf8032254.

Subbiah, V., Zwol, P. Van, 2014. Glycerol Esters from Real Waste Cooking Oil Using a Robust Solid Acid Catalyst 1545–1549. doi:10.1007/s11244-014-0337-x.

Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7.

Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621–51. doi:10.3390/ijms9091621.

Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, I.M., 2007. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 686–91. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02256.x.

TMR, 2012. Biosurfactants Market - Global Scenario, Raw Material and Consumption Trends, Industry Analysis, Size, Share and Forecasts 2011 - 2018.

Toop, G., Alberici, S., Spoettle, M., van Steen, H., 2013. Trends in the UCO market Trends. *Ecofys* 31.

Tortosa, G., Albuquerque, J.A., Ait-Baddi, G., Cegarra, J., 2012. The production of commercial organic amendments and fertilisers by composting of two-phase olive mill waste (“alperujo”). *J. Clean. Prod.* 26, 48–55. doi:10.1016/j.jclepro.2011.12.008.

Tsai, S.W., Chiang, C.L., 1991. Kinetics, mechanism, and time course analysis of lipase-catalyzed hydrolysis of high concentration olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 206–11. doi:10.1002/bit.260380213

Urum, K., Pekdemir, T., 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57, 1139–1150.

Vasquez, V.R., Williams, B.C., Graeve, O. a, 2011. Stability and comparative analysis of AOT/water/isooctane reverse micelle system using dynamic light scattering and molecular dynamics. *J. Phys. Chem. B* 115, 2979–2987. doi:10.1021/jp109202f.

Venieri, D., Rouvalis, A., Iliopoulou-Georgudaki, J., 2010. Microbial and toxic evaluation of raw and treated olive oil mill wastewaters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 1380–1388. doi:10.1002/jctb.2444.

Vitolo, S., Petarca, L., Bresci, B., 1999. Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresour. Technol.* 67, 129–137. doi:10.1016/S0960-8524(98)00110-2.

Xiros, C., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2013. Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Wiley Interdiscip. Rev. Energy Environ.* 2, 633–654. doi:10.1002/wene.49.

Yang, B., Wyman, C.E., 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2, 26–40. doi:10.1002/bbb.49.

Yao, C., Tang, S., He, Z., Deng, X., 2005. Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT/isooctane reversed micelles. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 35, 108–112. doi:10.1016/j.molcatb.2005.06.005.

Yao, X., Wang, N., Fang, Y., Phillips, G.O., Jiang, F., Hu, J., Lu, J., Xu, Q., Tian, D., 2013. Impact of surfactants on the lipase digestibility of gum arabic-stabilized O/W emulsions. *Food Hydrocoll.* 33, 393–401. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.04.013.

Zhang, Y., 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresour. Technol.* 89, 1–16. doi:10.1016/S0960-8524(03)00040-3.

7. Anexos

Anexo I: Abreviaciones

- MC: mezcla control de aceites de grado alimentario
- AR-1: aceite residual 1
- AR-2: aceite residual 2
- ALP: alpeorujó
- TLL: lipasa de *Thermomyces lanuginosus*
- PFL: lipasa de *Pseudomonas fluorescens*
- PPL: lipasa de páncreas porcino
- LU: unidades lipásicas
- G600: Glucopón 600
- GA: Goma arábica
- MAG: monoacilglicerol
- DAG: diacilglicerol
- TAG: triacilglicerol
- AGL: ácidos grasos libres

- O/W: emulsión aceite en agua
- W/O: emulsión agua en aceite
- a: área interfacial específica (cm^2/mL)
- IE: índice de estabilidad
- BS: back-scattering o porcentaje de luz reflejada por la emulsión (%)
- Φ : Fracción volumétrica de fase grasa en la emulsión O/W (%v)
- S: Masa de emulsionante por volumen de fase grasa (mg/mL)
- E: Energía aplicada durante la sonicación por volumen de fase grasa (J/mL)
- W_0 : relación molar agua/surfactante
- Φ_R : Fracción volumétrica de aceite en la fase grasa para emulsiones W/O (%v)
- ME: región de microemulsión W/O en el sistema aceite/i-octano/agua
- NE: región de nanoemulsión en el sistema aceite/i-octano/agua
- P: productividad específica (mmol/mg)
- PS: peso seco (mg/L)
- TS: Tensión superficial (mN/m)
- $Y_{P/S}$: rendimiento producto/substrato ($\text{mg biosurfactante}/\text{g fuente de carbono}$)
- HE: Hidrólisis enzimática usando celulasas y hemicelulasas
- PHE: Pretratamiento ácido suave seguido de hidrólisis enzimática
- HA: Hidrólisis ácida
- AHE: alperujo hidrolizado enzimáticamente
- APHE: alperujo hidrolizado con un pretratamiento ácido suave seguido de una hidrólisis enzimática
- AHA: alperujo hidrolizado con ácido
- A_H : Concentración de azúcares solubles en el medio de cultivo tras la hidrólisis del alperujo (g/L)
- A_{F-P} : Concentración de azúcares solubles en el medio de cultivo tras la fermentación con *Pseudomonas aeruginosa*, (g/L)
- A_{F-B} : Concentración de azúcares solubles en el medio de cultivo tras la fermentación con *Bacillus subtilis*, (g/L)

Anexo II: Producción bibliográfica

Artículos en revistas científicas:

- Moya Ramírez, I., Fernández Arteaga, A., Jurado Alameda, E., García Román, M. Enzymatic hydrolysis of waste frying oils in O/W emulsion. Optimization of reaction conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (Enviado)
- Moya Ramírez, I., García Román, M., Fernández Arteaga, A. Waste Frying Oil Hydrolysis in a Reverse Micellar System. *ACS Sustainable Chem. Eng.* (En revision)
- Moya Ramírez, I., Tsaousi, K., Rudden, M., Marchant, R., Jurado Alameda, E., García Román, M., Banat, I.M., 2015. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour. Technol.* 198, 231–236.
- Moya Ramírez, I., Altmajer-Vaz, D., Banat, I.M., Marchant, R., Jurado Alameda, E., García Román, M. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. *Bioresour. Technol.* (Aceptado para publicación). doi:10.1016/j.biortech.2016.01.016

