



Universitat de Lleida

Exploración de nuevas fuentes de monoterpenos a partir de residuos agroalimentarios para su transformación en compuestos con aplicaciones en el campo de aromas y fragancias

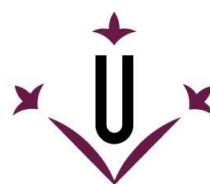
Nancy Milena Ortega Chacón

<http://hdl.handle.net/10803/670062>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

EXPLORACIÓN DE NUEVAS FUENTES DE MONOTERPENOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS PARA SU TRANSFORMACIÓN EN COMPUESTOS CON APLICACIONES EN EL CAMPO DE AROMAS Y FRAGANCIAS

Nancy Milena Ortega Chacón

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de
Lleida

Programa de Doctorat en Ciència i Tecnologia Agrària i Alimentària

Directors:
Mercè Balcells
Mercè Torres

A mi primer amor Leito, que, sin su inocente dislexia y su ternura, la vida sería muy aburrida.

A Eric, que gracias a su peludo, travieso e hiperactivo amor, hicieron de mi infancia un recuerdo maravilloso.

A Martha, que sin sus consejos, dedicación y hasta regaños, no sería la mujer que soy y seguramente no sabría dividir.

A Carme, que sin su apoyo, aliento y abrazos gorditos, no hubiese terminado esta tesis, ni me hubiese sacado el carnet.

A Sisco, que entre tortillas, purés e historias divertidas, me ha llenado de color y calorcito catalán los domingos.

A Juan Pablo y Emmanuel que con su magia, inocencia y amor me han engordado el corazón.

Y a Pau, mi cómplice de vida, mi lugar favorito, mi amor bonito. Sí, especialmente a ti, que ya todo te lo he dicho.



*You cannot hope to build a better world
without improving the individuals.
To that end, each of us must work for his own
improvement and, at the same time,
share a general responsibility for all humanity,
our particular duty being to aid those to
whom we think we can be most useful.*

*- Marie Curie –
(1867-1934)*

Agradecimientos

Hace poco más de cuatro años con un par de maletas debajo del brazo, un corazón lleno de miedos, temores e inseguridades y una mente llenita de sueños y a decir verdad un poco en caos, decidí emprender un nuevo viaje. Un viaje, que sin saberlo me enfrentaría conmigo misma y se convertiría no solo en la experiencia profesional más enriquecedora de mi vida, sino en mi propio re-encuentro.

Han sido cuatro años de subidas, bajadas, estancadas y acelerones. Cuatro años de aprendizajes, emociones, sentimientos y experiencias que han hecho sin duda una versión más fuerte y más segura de mí. Una versión que aprendió a jugar con la paleta de colores, que entendió que no todo es negro o blanco, una versión que sonrío, que disfruta de las pequeñas cosas y que es capaz incluso de comer caracoles, conducir un coche, saltar entre rocas por un río y sobrevivir a una cuarentena (cuarentesis) sin enloquecer.

En la historia de este viaje no he estado sola. Algunos iniciaron a mi lado y siguen caminando junto a mí, otros se me perdieron en el camino, algunos tuvieron un paso veloz y otros llegaron para quedarse. Así que este logro en parte, también es gracias a todos estos personajes que con sus aportes han hecho de este viaje, una aventura inolvidable y se han ganado además de mi agradecimiento, un lugar en mi corazón.

A mis directoras Mercè Balcells y Mercè Torres, gracias por sus enseñanzas, por compartir su conocimiento conmigo, por las charlas, las risas y las reflexiones compartidas.

A Cristóbal y Albert, por todo su apoyo, por creer en mí, por su energía y disposición, pero sobre todo por dejarme descubrir el mundo de los aromas y las fragancias.

A Ramón, por tener siempre una respuesta, por su paciencia infinita y por transmitirme tanta paz en los momentos de caos.

A Gemma, por su colaboración, sus abrazos y por cultivar una amistad que seguro permanecerá en el tiempo.

A Jordi por sus aportes y su disposición en las reuniones de grupo.

A Montse Llovera, Montse Prim, Jordi Vidal, Mireia Oromi y Robert Garrofé mil gracias por todos sus aportes y ayuda.

A mis compañeritos del departamento de química y DBA, Enrique y Albert que me enseñaron que el bullying es una forma de comunicación y no necesariamente mala. A Paulo por su amabilidad y su gran corazón. A los que ya no están, pero dejaron bonitos recuerdos y de seguro un lazo especial: Federico, Alexandra, Marjam, Pepita, Carmen S, Remei, Wilmersin y Gian Carlos. A los que llegaron y aún les queda gran parte de esta aventura: Jordi, María, Lucía y Guillem, mucho ánimo y a disfrutarse en lo posible cada etapa.

A mis profes de Hoy Voy (Lleida) Pere, Toni, Marcos y Bernardo, porque además de enseñarme a conducir, me mostraron que para conseguir aquello que creemos imposible, solo debemos ponerle freno al miedo y acelerar a fondo nuestra confianza. En especial quiero dar las gracias a Joan Pons, porque no cabe duda que su paciencia, vocación y gran corazón, me permitieron obtener la L, en medio del estrés propio de la tesis.

A Merche, Antonio y Paola, con quienes compartí tantos momentos lindos, entre bailes, bolos, música, vinos y charlas reflexivas.

A quienes se han ido convirtiendo en familia: Edinson, Anna, Nicolau y Gael, gracias por compartir un pedacito de su vida conmigo, por su sabiduría, risas y velitas. A Diana y Alberto (mis compis de la república independiente del edificio 5), gracias por cada momento compartido, por el inicio de una amistad y ¡Si señores! que se vengan más noches de veranito, entre vinos, humus, verduritas, guacamole y arepas. A Erika, Wilmar y Emmanuel, por hacerme parte de su familia, por el apoyo incondicional y por todo su amor. A Johanna, por la complicidad, los buenos momentos, las enseñanzas mutuas, pero sobre todo por la fraternidad, de seguro estos dos últimos años no hubiesen sido lo mismo sin su compañía. A Leidy por su bondad, sus palabras de aliento y generosidad. A Martín, por su amistad, por su compañía, por ser mi pepito grillo, mi chef y hasta mi terapeuta en los momentos grises.

A mis amigas de siempre: Angélica, Aleja y Yulieth, por ser mi soporte virtual y espiritual, por su amistad incondicional y por enseñarme que no importa si estamos en planetas diferentes, en cuarentena o en medio de un ataque zombi, siempre encontraremos la manera de coincidir, de disfrutarnos, de soñar y de reír juntas. A Alisson y Deisy por su permanencia y cariño tras casi veinte años de conocernos. A Marce, mi odontóloga favorita, por su ternura y positivismo. A Lau, por su cariño, y palabras de calma en los momentos adecuados. A Goretti, por su paz, sus consejos, su espiritualidad y su

hospitalidad. A Estebitan que, aunque poco nos vemos, mucho nos queremos.

A todos aquellos que en estas tierras catalanas e ibéricas me han hecho sentir en casa, me han abierto las puertas de su corazón y me han abrazado el alma: a las familias Gallart y Sirvent, a, Jordi, Nuria, Magda, Argi, Alicia, Fernandito, Migue, Irene, Cheli, Cristina, Josep, Mar, Frankie, Carlos, Mariana, Dudu, Olga, María, Marc y Pau C.

A mi familia, a quienes gracias a su cariño, amor y apoyo me hacen sentirlos y me ponen el corazón gordito sin importar el océano que nos separa. A mi abuelita Teresa, mi tía Virginia, mis Primas Carolina, Lorena y Consuelo. A mis chiquis Juan Pablo, Juan Camilo, Tomás y Joaquín. A Mari, Dani, Migue, Hili y Hilary.

Finalmente, este viaje no hubiese igual, sin la presencia de las personas más importantes de mi vida, mis papás y mi hermano que con su luz, valentía, tesón y entrega han hecho que hoy pueda estar donde estoy, a ellos gratitud infinita y mucho amor. Por último, agradezco a Carme y Sisco, que se convirtieron en dos angelitos inesperados, que además de alimentarme, cuidarme y mimarme durante estos últimos años, han sido un ejemplo de tenacidad y fortaleza, especialmente en algunos días difíciles, pero sobre todo les agradezco el amor y los lindos valores que inculcaron en quien hoy hace parte de mis días, mi cómplice de vida Pau. A ti amor, ¡gracias por TODO! has hecho de gran parte de este viaje una experiencia maravillosa.

Resumen

Este proyecto de investigación está enfocado en el aprovechamiento de los residuos agroalimentarios, en su mayoría de frutas y verduras, para la obtención y/o extracción de aromas. Este tipo de residuos representa ser una fuente importante de materia orgánica, microorganismos y diferentes tipos de compuestos, entre ellos los terpenos, utilizados ampliamente en la industria de aromas y fragancias. Normalmente, estos compuestos son extraídos de fuentes naturales, mediante diferentes procesos, obteniéndose aceites esenciales, oleorresinas, destilados etc. Sin embargo, los rendimientos de estos procedimientos son bajos, obligando a subir los precios y encarecer los productos finales. Este hecho, ha provocado que algunos aromas sean obtenidos de forma sintética por medio de procesos que no son amigables con el medio ambiente y que adicionalmente no permiten tener un producto final con el sello de "origen natural" que es tan valorado en la actualidad. Por este motivo surge la necesidad de buscar fuentes y mecanismos para la obtención de estos compuestos, bajo condiciones sostenibles como en este caso, empleando residuos provenientes de la industria agroalimentaria.

El proyecto se dividió en 4 fases. La primera de ellas consistió en la selección de fuentes alternativas y la extracción de aromas. Dentro de esta fase se evaluó la obtención de terpenos de diferentes residuos a escala laboratorio y en escala pre-piloto. Resultado de esta última fue la obtención de un aceite esencial con un alto contenido de limoneno, además de otros compuestos de interés en la industria de aromas y fragancias. Para la extracción se evaluaron diversos disolventes y también fluidos supercríticos (FSC)- Se incluyeron además pretratamientos enzimáticos y físicos. Por lo tanto, además de seleccionar el residuo con un mayor contenido de terpenos, se mejoró el rendimiento de extracción.

La segunda fase consistió en el aislamiento de microorganismos presentes en los residuos, específicamente hongos filamentosos, capaces de producir aromas o biotransformar sustratos en compuestos de interés en este proyecto. Para esto, se evaluó inicialmente la actividad metabólica de los microorganismos mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPME) que permitió seleccionar un grupo de microorganismos que demostraron potencial para producir terpenos. Estos microorganismos fueron identificados mediante técnicas genéticas.

La tercera fase se centró en la elaboración de medios de cultivo a partir de los residuos agroalimentarios. Para ello se seleccionaron dos tipos de residuo, con los cuales se llevaron a cabo distintos ensayos que incluyeron pre-tratamientos enzimáticos. De esta fase resultó una alternativa de medio de cultivo que pudo ser aplicado tanto en medio sólido como en medio líquido.

La cuarta fase consistió en la obtención de aromas mediante la biotransformación de sustratos como limoneno y β -pineno por parte de los microorganismos previamente seleccionados en la segunda fase. Para ello, se realizó inicialmente la optimización de algunas de las condiciones del proceso, posteriormente se evaluó el potencial de estas cepas para biotransformar los sustratos a escala laboratorio y a

escala pre-piloto. Dentro de los medios de cultivo empleados se incluyó por un lado un medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta y el medio de cultivo preparado con los residuos en la tercera fase. Adicionalmente se llevó a cabo la biotransformación del limoneno contenido en el aceite esencial obtenido en la primera fase.

Con esto se consiguió, por un lado, identificar una fuente alternativa para la extracción de aromas a partir de los residuos agroalimentarios y así mismo un proceso que permitió la obtención de compuestos de interés, en el que se emplearon los residuos directa o indirectamente en cada una de sus etapas consiguiendo revalorizar los residuos y cumplir con el objetivo del proyecto.

Summary

This research project is focused on the use of agri-food wastes to obtain or extract aromas. Usually, this kind of wastes come from fruits and vegetables. In that regard, they represent an important source of organic matter, microorganisms and different types of compounds, such as terpenes, widely used in the aroma and fragrance industry. Usually, these compounds are extracted from natural sources, through distinct processes, from which, among others, essential oils, oleoresins and distillates are obtained in small quantities. Since the yields of these procedures are low, the final products are expensive. This situation implied the synthesis of some aromas through processes not environmentally friendly and, additionally, by removing the label of natural origin, highly valued nowadays. For this reason, there is a need to look for sources and mechanisms to obtain these compounds under sustainable conditions, such as this project, by using waste from the agri-food industry.

The project was divided in four phases. The first phase consisted in the selection of alternative aroma sources. In this phase, the terpenes content from different residues was evaluated by using distinct procedures at lab-scale and pre-pilot scale. Regarding to pre-pilot scale, it was possible to obtain a high limonene content essential oil, containing also other valuable compounds for aromas and fragrance industries. Among all techniques used, solvent extraction and supercritical fluids extraction (FSC) stood out, whereas enzymatic and physical pretreatments were also tested. For so, in addition to the selection of a higher terpene residue the extraction yield was also improved.

The second phase consisted in the isolation of microorganisms from the wastes, specifically filamentous fungi able to produce aromas or biotransform substrates into interesting compounds for this project. Therefore, the metabolic activity of the microorganisms was initially evaluated by using solid phase extraction technique (SPME). Subsequently, a specific group of microorganisms demonstrating abilities to produce terpenes was selected. These microorganisms were identified by using genetic techniques.

The third phase was focused on the culture media preparation from agri-food waste. In this regard, two types of residues were selected, carrying out distinct tests such as enzymatic pre-treatments. From this phase, an alternative culture media useful in solid and liquid media was obtained.

The fourth phase consisted in the aromas obtention by biotransformation of substrates such as limonene and β -pinene using microorganisms previously selected during the second phase. In that regard, some of the process conditions were initially optimized and the strains were selected depending on the ability to biotransform the substrates on a laboratory and pre-pilot scale. The cultures used were a conventional malt culture medium and the waste culture medium prepared in the third phase. Additionally, the biotransformation of the limonene from the essential oil obtained in the first phase was carried out.

In conclusion, it was possible to identify an alternative source of aromas extraction from agri-food waste and achieve a process for obtaining interesting compounds, being the waste used directly or indirectly in each of the stages. Allowing the recovery of waste and fulfilling the main objective of the project.

Resum

Aquest projecte de recerca està enfocat en l'aprofitament dels residus agroalimentaris per a l'obtenció i / o extracció d'aromes. Aquests residus provenen en gran part de fruites i verdures. D'aquesta forma, són una font important de matèria orgànica, microorganismes i diferents tipus de compostos, entre ells terpens, utilitzats àmpliament en la indústria d'aromes i fragàncies. Normalment, aquests compostos són extrets de fonts naturals, mitjançant diferents processos, dels quals s'obtenen, entre d'altres, olis essencials, oleoresines i destil·lats en petites quantitats amb rendiments baixos, repercutint en l'augment dels preus dels productes finals. Aquest fet, ha provocat que algunes aromes s'obtinguin de forma sintètica per mitjà de processos que no són respectables amb el medi ambient i que a més a més no permeten obtenir un producte final amb el segell d'origen natural que tan valorat és en l'actualitat. Per aquest motiu sorgeix la necessitat de buscar fonts i mecanismes per a l'obtenció d'aquests compostos, sota condicions sostenibles, com en aquest cas, emprant residus provinents de la indústria agroalimentària.

El projecte es va dividir en 4 fases. La primera d'elles va consistir en la selecció de fonts alternatives d'aromes. Dins d'aquesta fase es va avaluar el contingut de terpens de diferents residus, mitjançant diferents mecanismes, a escala de laboratori i a escala pre-pilot, d'aquesta última va ser possible obtenir un oli essencial amb un alt contingut de limonè, a més d'altres compostos d'interès per a la indústria d'aromes i fragàncies. Dins de les tècniques utilitzades es destaca l'extracció amb dissolvents i l'extracció mitjançant fluids supercrítics (FSC), que van incloure, també, pretractaments enzimàtics i físics. Per tant, a més a més de seleccionar el residu amb un major contingut de terpens, es va millorar el rendiment d'extracció.

La segona fase va consistir en l'aïllament de microorganismes dels residus, específicament fongs filamentosos capaços de produir aromes o biotransformar substrats en compostos d'interès per aquest projecte. Per això, es va avaluar inicialment l'activitat metabòlica dels microorganismes mitjançant la tècnica d'extracció en fase sòlida (SPME). Aleshores, es va permetre seleccionar un grup de microorganismes que van demostrar potencial per produir terpens. Aquests microorganismes van ser identificats mitjançant tècniques genètiques.

La tercera fase es va centrar en l'elaboració de medis de cultiu obtinguts a partir de residus agroalimentaris. Per això es van seleccionar dos tipus de residu, sobre els quals es van dur a terme diferents assajos, incloent pre-tractaments enzimàtics. D'aquesta fase en va resultar un medi de cultiu alternatiu que va poder ser aplicat tant en medi sòlid com en medi líquid.

La quarta fase va consistir en l'obtenció d'aromes mitjançant la biotransformació de substrats com el limonè i el β -pinè per part dels microorganismes prèviament seleccionats en la segona fase. Per a això, es va realitzar inicialment l'optimització d'algunes de les condicions del procés i posteriorment es va avaluar el potencial d'aquestes soques per biotransformar els substrats a escala laboratori i a escala pre-pilot. Dins dels medis de cultiu emprats, es va incloure d'una banda un medi de cultiu

convencional elaborat amb extracte de malta i d'altra banda, el medi de cultiu preparat en la tercera fase a partir de residus. Addicionalment, es va dur a terme la biotransformació del limonè contingut en l'oli essencial obtingut en la primera fase. Amb això es va aconseguir, d'una banda, identificar una font alternativa per a l'extracció d'aromes a partir dels residus agroalimentaris i així mateix, aconseguir un procés per a l'obtenció de compostos d'interès, en el qual, es van emprar els residus directa o indirectament en cadascuna de les seves etapes. Aconseguint valoritzar els residus i complir amb l'objectiu de el projecte.

Abreviaciones

AE	Aceites esenciales
ALC	Medio de cultivo elaborado con residuos de alcachofa
ATR	Reflectancia total atenuada
CAR-M	Aceite esencial de mandarina comercial
CelPecID	Mezcla de enzimas celulasa ID y pectinasa ID
Cel-SA	Celulasa SA
CG	Cromatografía de gases
CG-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a masas
COSY	Correlación homonuclear
CPME	Ciclopentilmetil éter
DBA-M	Aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroalimentarios
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
DW	Valor estadístico de Durbin-Watson
EAU	Extracción con ultrasonidos
EMA	Medio de cultivo elaborado con extracto de malta
FEMA	Flavor extract manufacturers association
FIV	Factores de inflación de la varianza
FSC	Extracción con fluidos supercríticos
FT-IR	Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier
gl	Grados de libertad
Hex/Dee	Mezcla hexano dietil éter 9:1
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
HSSE	Extracciones sorptivas del espacio de cabeza
I.R Exp	Índice de retención experimental
I.R T	Índice de retención teórico
ICP-OES	Espectrofotómetro de emisión atómica
ILs	Líquidos iónicos
IPP	Isopentenil difosfato
MAE	Error medio absoluto
NIST	National Institute of Standards and Technology
PA	Poliacrilato polar
PDMS	Polidimetilsiloxano
Pec-SA	Pectinasa SA
PLEs	Líquidos presurizados
PTFE	Politetrafluoroetileno
R²	Coefficiente de correlación múltiple
R² ajustado	Coefficiente de correlación múltiple ajustado
RMN	Resonancia magnética nuclear

SDBS	Spectral Database for Organic Compounds
SFF	Fermentación en estado sólido
SmF	Fermentación sumergida
SPME	Extracción en fase sólida
tR	Tiempo de retención
UOD	Umbral olfativo de detección
σ	Desviación estándar

Índice

<i>Resumen</i>	11
<i>Summary</i>	13
<i>Resum</i>	15
<i>Abreviaciones</i>	17
1. Introducción	23
1.1. Residuos y economía circular	25
1.1.1. Residuos agroalimentarios	27
1.1.1.1 Compuestos de valor añadido en los residuos	27
1.1.1.2 Obtención biotecnológica de productos de interés industrial a partir de residuos	28
1.1.2. Residuos de frutos cítricos	33
1.1.2.1 Compuestos de alto valor presentes en los residuos de mandarina.....	34
1.2. Compuestos de interés en la industria de aromas y fragancias.....	39
1.2.1. Fuentes naturales de aceites esenciales	39
1.2.2. Compuestos terpénicos y algunos de sus derivados	41
1.2.3. Métodos de extracción y obtención de aromas Compuestos terpénicos y algunos de sus derivados	44
1.2.3.1 Métodos de extracción de fuentes naturales.....	46
1.2.3.2 Métodos de obtención biotecnológica	51
1.2.3.3 Métodos combinados de extracción directa y obtención biotecnológica	58
1.2.4. Métodos de análisis e identificación de aromas	60
1.2.4.1 Análisis mediante la extracción en fase sólida	60
1.2.4.2 Técnicas de identificación	62
2. Objetivos	65
3. Materiales y métodos.....	69
3.1. Materiales	71
3.1.1. Residuos	71
3.1.1. Patrones y reactivos	71

3.2. Métodos	72
3.2.1. Caracterización de los residuos	72
3.2.1.1 Porcentaje de humedad	72
3.2.1.2 Propiedades fisicoquímicas	72
3.2.2. Extracción de aromas a partir de los residuos agroalimentarios .	73
3.2.2.1. Estimación inicial del contenido de terpenos presentes en de los residuos agroalimentarios	75
3.2.2.2 Extracción de terpenos de residuos de mandarina.....	75
3.2.2.3. Escalado pre-piloto de extracción de terpenos	81
3.2.3. Aislamiento e identificación de los microorganismos de los residuos agroalimentarios	85
3.2.3.1 Selección de microorganismos.....	85
3.2.4. Preparación de medios de cultivo a partir de residuos	88
3.2.4.1 Extracto de malta	88
3.2.4.2 Residuos secos de mandarina y alcachofa.....	88
3.2.4.3 Residuo seco de mandarina pre-tratado	89
3.2.5. Obtención de aromas a partir de procesos de biotransformación	90
3.2.5.1 Optimización del protocolo de biotransformación de sustratos	90
3.2.5.2 Evaluación del potencial de biotransformación de los sustratos limoneno y β -pineno por los microorganismos.....	93
3.2.6. Seguimiento del contenido de terpenos	98
3.2.6.1 GC-MS y CG-FID.....	98
4. Resultados y discusión	101
4.1. Selección de residuos como fuentes alternativas de aromas	104
4.1.1. Porcentaje de humedad en los residuos	104
4.1.2. Extracción de aromas a escala laboratorio	105
4.1.2.1 Estimación inicial del contenido de terpenos contenidos en los residuos agroalimentarios.....	106
4.1.2.2 Extracción de terpenos de los residuos de mandarina	112
4.1.3. Escalado pre-piloto del proceso de extracción del aceite esencial de los residuos de mandarina de los lotes 2016 y 2018	150
4.1.3.1. Extracción en reactor de 2 L de capacidad	151
4.1.3.2. Concentración de los extractos obtenidos tras el proceso de escalado	156

4.1.3.3. Caracterización del aceite esencial obtenido de los residuos de mandarina	164
4.2. Aislamiento e identificación de microorganismos de los residuos alimentarios	176
4.2.1. Aislamiento de microorganismos de los residuos.....	177
4.2.2. Evaluación de la actividad metabólica de los microorganismos seleccionados.....	177
4.2.3. Identificación de las cepas seleccionadas mediante técnicas genéticas	183
4.2.4. Toxicidad de los microorganismos seleccionados	184
4.3. Preparación de medios de cultivo a partir de residuos agroalimentarios	186
4.3.1. Residuos secos de mandarina y alcachofa. Toxicidad de los microorganismos seleccionados.....	187
4.3.2. Residuos secos de mandarina pre-tratados enzimáticamente	191
4.4. Procesos de biotransformación de sustratos para la obtención de aromas	197
4.4.1. Optimización de algunas fases del proceso de biotransformación.....	198
4.4.2. Biotransformación de sustratos	203
4.4.2.1. Biotransformación del limoneno estándar.....	204
4.4.2.2. Biotransformación del limoneno contenido en el aceite extraído de los residuos (DBA-M)	237
4.4.2.3. Biotransformación del β -pineno estándar	247
4.5. Respuesta sensorial de los aromas obtenidos	261
5. Conclusiones	263
6. Referencias.....	267
ANEXOS.....	295
Anexo I	297
Anexo II	299
Anexo III	302

Anexo IV.....	303
Anexo V	307
Anexo VI.....	308
Anexo VII.....	322

1. Introducción

1.1. Residuos y economía circular

Actualmente la demanda de recursos a nivel global, supera en un 20% la capacidad de producción biológica de la Tierra, debido a niveles de consumo que no son sostenibles (Villarán, 2018). Esta situación no solo se traduce en una sobre explotación de los recursos y el impacto negativo que esto puede generar en el planeta, sino también en una mayor generación de residuos y subproductos provenientes de las diferentes actividades económicas, domésticas y agrícolas.

Durante los últimos años la comunidad científica, de la mano con las industrias, han intentado dar solución a esta sobre-explotación de recursos y a su vez a la gestión de los residuos generados. No obstante, uno de los principales desafíos ha consistido en la implementación de un concepto denominado economía circular, cuyo propósito es la búsqueda y aplicación de procesos competitivos, innovadores y sobre todo sostenibles que eviten principalmente el agotamiento de los recursos naturales, el impacto ambiental y por ende la producción de desechos (Fundación para la economía circular, 2017). Incluso el Parlamento Europeo en una de sus directivas en el año 2008 sobre los residuos, propuso una jerarquía en la gestión de todos estos desechos generados de las distintas actividades, como se indica en la **figura 1.1**. Sin embargo, estos esfuerzos no han sido suficientes y las cifras de los últimos años han demostrado que este equilibrio entre la productividad y la sostenibilidad es cada vez más complejo.



Figura 1.1. Jerarquía de los subproductos. Elaboración propia a partir de los datos del Parlamento Europeo 2018.

Por ejemplo, en el 2016, los residuos totales generados en los 28 países de la Unión Europea como producto de las diferentes actividades, ascendieron a 2.538 millones de toneladas, lo que se traduce en cinco toneladas por habitante. Del total de estos residuos cerca de un 25% terminaron en vertederos, un 47% fueron reciclados, especialmente los relacionados con plásticos, papel etc. y cerca del 28% fueron revalorizados (Eurostat 2017; Ministerio de agricultura, pesca y alimentación 2017). Un panorama distinto se evidenció en España donde hasta un 57% de los residuos terminaron en vertederos tal y como se muestra en la **figura 1.2**.

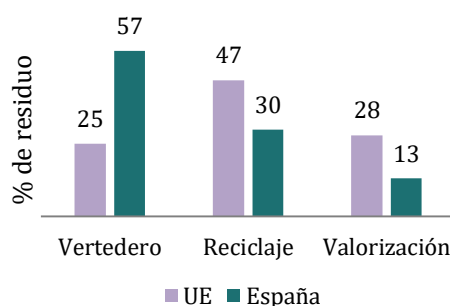


Figura 1.2. Tratamiento de residuos provenientes de la agricultura en España y la Unión Europea (UE) en el año 2016. Elaboración propia a partir de Eurostat, 2017.

De acuerdo con esta información, se hace evidente la necesidad de seguir en la búsqueda de mecanismos que permitan disminuir la cantidad de desechos que terminan en los vertederos y/o aumentar la revalorización de los mismos para que pueden ser útiles en otras actividades (Londoño, *et al.* 2012), más teniendo en cuenta que muchos de estos residuos, provienen de la industria agroalimentaria.

Durante el año 2016 España produjo el 25% de la cantidad total de frutas y verduras de la Unión Europea, con casi 32 millones de toneladas, (Eurostat 2017). De forma que, si se tiene en cuenta que, según la FAO, el 45% del total de la producción, se pierde en la cadena que va desde la agricultura hasta el consumidor (FAO 2011), la cantidad total de residuos generada en ese año fue de aproximadamente 14 millones de toneladas. Una cifra alarmante, ya que muchos de estos residuos terminaron en vertederos y no fueron aprovechados o reutilizados de forma sostenible.

Muchos de estos subproductos ofrecen la oportunidad de ser empleados de forma sostenible, por medio de la economía circular, mediante procesos limpios de extracción o de fermentación en algunos casos para la obtención de nuevos compuestos de valor añadido, enzimas, microorganismos etc., que pueden ser empleados en otros sectores.

1.1.1. Residuos agroalimentarios

1.1.1.1 Compuestos de valor añadido en los residuos

Los desechos de la industria agroalimentaria en su gran mayoría provienen de frutas y verduras. Este tipo de desechos presentan una fuente rica en compuestos como fibras, proteínas, polifenoles, fitoesteroles, terpenos entre otros que son de gran interés en la elaboración de piensos, fertilizantes, complementos alimenticios y cosméticos (Abu-Reidah 2017; Petkowicz 2017; FAO 2013; Mortier 2016; Scano 2014).

Sin embargo, y pese a que dentro de los desechos se encuentra una gran variedad de compuestos de interés, los más explotados en la actualidad son carotenoides, inulina, algunos compuestos fenólicos, flavonoides y los glucosinolatos, dadas sus aplicaciones.

Por ejemplo, los carotenoides evitan daños por fotosensibilidad en bacterias, animales y humanos, además inhiben la inducción tumoral provocada por los rayos UV y agentes químicos, disminuyendo las lesiones malignas que pudiesen presentarse en humanos, de ahí su interés en productos alimenticios o farmacéuticos (Cardoso 2017).

Por otro lado, los compuestos fenólicos y flavonoides, presentan aplicaciones antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antivirales, antimutagénicas entre otras (Havsteen 2002).

La inulina posee un efecto prebiótico, capaz de aumentar la absorción intestinal de algunos minerales, incrementando la saciedad y por ende demostrando beneficios importantes en la salud (Azorin 2009).

En cuanto a los glucosinolatos presentes en la mayoría de verduras de invierno, tales como coles, nabos, espinacas, acelgas, coles de Bruselas, brócoli, entre otras, pueden ser hidrolizados mediante la enzima mirosinasa y dar como resultado sulforafano, un compuesto que se ha demostrado poseer un efecto preventivo frente al cáncer de colon (Lattè, 2011).

1.1.1.2 Obtención biotecnológica de productos de interés industrial a partir de residuos

La biotecnología industrial permite llevar a cabo el desarrollo de nuevos productos, por medio de procesos más eficientes y sostenibles por lo que, poder aplicar estos procesos sobre diferentes tipos de residuos con el fin de obtener compuestos o productos que puedan ser empleados industrialmente, se convierte en una muy buena alternativa.

Dentro de los procesos biotecnológicos que más se llevan a cabo, están aquellos en los que se emplean microorganismos de cepas conocidas comerciales, como agentes capaces de transformar estos residuos para obtener aditivos, proteínas, enzimas u otros productos como ácidos orgánicos, biocombustible, biopolímeros y biomasa, que pueden ser empleados de forma diversa (Villarán 2018). En la **tabla 1.1**, se describen los principales productos de valor añadido, obtenidos por procesos biotecnológicos a partir de subproductos agroalimentarios.

Tabla 1.1. Productos de valor añadido, obtenidos, por medio de procesos biotecnológicos a partir de residuos agroalimentarios.

Productos de valor añadido	Residuo	Microorganismo
Enzimas		
Amiolíticas	Mango	<i>Fusarium solani</i> ¹
	Plátano	<i>Rhizopus stolonifer</i> ²
Lignocelulolíticas	Palma	<i>Trichoderma reesei</i> ³
	Plátano	<i>Pseudomona putida</i> ⁴
Pectinolíticas	Cáscara de piña	<i>Aspergillus niger</i> ⁵
	Piel de naranja	<i>Penicillium chrysogenum</i> ⁶
Tanasas	Cereza de Barbados	<i>Aspergillus sp.</i> ⁵
	Bagazo de anacardo	<i>Penicillium sp.</i> ⁷
Proteasas	Cáscara de algarrobo africano	<i>Aspergillus sp.</i> ⁸
	Cáscara de granada	<i>Bacillus subtilis</i> ⁹
Ácidos orgánicos		
Ácido láctico	Piel de patata	<i>Lactobacillus casei</i> ¹⁰
	Maíz dulce, mango, naranja	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ¹¹
Ácido cítrico	Cáscara de piña	<i>Aspergillus niger</i> ¹²
	Pulpa de manzana	<i>Yarrowia lipolytica</i> ¹³
Biocombustible		
Etanol	Extracto de dátil	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ¹⁴
Biopolímeros		
Goma xantana	Zumo de dátil	<i>Xanthoromyces campestris</i> ¹⁵
Curdlan	Zumo de dátil	<i>Rhizobium radiobacter</i> ¹⁶
Biomasa		
Levadura de panadería	Azúcar de dátil	<i>Saccharomices cerevisiae</i> ¹⁷
Probiótico	Polvo de dátil	<i>Lactobacillus casei</i> ¹⁸

¹Kumar 2013; ²Unakal 2012; ³Norsalwani 2012; ⁴Dabhi 2014; ⁵Silva 2014; ⁶Mrudula 2011; ⁷Prommajak 2014; ⁸Radha 2012; ⁹Oyeleke 2011; ¹⁰Mudaliyar 2012; ¹¹de la Torre 2018; ¹²Panda 2016; ¹³Prabha 2014; ¹⁴Gupta 2011; ¹⁵Besbes 2006; ¹⁶Salah 2011; ¹⁷Khan 1995; ¹⁸Shahravy 2012.

Por ejemplo, los ácidos orgánicos son empleados en diferentes sectores industriales, como en el procesamiento de alimentos, productos farmacéuticos, nutrición e industria de piensos, agentes antimicrobianos etc. (Ricke 2003; Vaidya 2019).

Por otro lado, los biopolímeros, que son uno de los principales desperdicios de actividades industriales y agrícolas que contribuyen a la contaminación ambiental (Bayón 2018), han demostrado tener un grupo de propiedades interesantes en el campo de la medicina pues pueden ser incluidos en

implantes y en el envasado de alimentos (Mohiuddin 2017) al ser extraídos correctamente de residuos agrícolas (Niranjan 2010).

En cuanto a las enzimas son empleadas ampliamente en procesos industriales como catalizadores de procesos metabólicos complejos (Chapman 1999), como es el caso de pectinasas y amilasas usadas en la industria alimentaria (Cho 2020; Taniguchi 2009), las celulasas en la industria de combustibles (Srivastava 2018) y las tanasas para reducir las concentraciones de ácido tánico en las aguas residuales de curtiduría (Tanash 2012) entre otras. Se ha demostrado que pueden ser extraídas de residuos agroalimentarios y subproductos hortofrutícolas, dentro de los cuales se destacan los residuos de caqui, plátano, mandarina y naranja reduciendo considerablemente los costos de su producción (Villarán 2018).

Finalmente, una alternativa dentro de la revalorización de los residuos agroalimentarios, reside en el uso eficiente de la biomasa, incluida la biomasa relacionada con biodiversidad de microorganismos presentes en estos o con la biomasa microbiana que pueda crecer en ellos (López 2018).

Teniendo en cuenta que la producción industrial de microorganismos, como: hongos filamentosos, bacterias, levaduras y microalgas, ha aumentado considerablemente en los últimos años, dada su aplicabilidad en diferentes procesos como biocatalizadores para ayudar a mejorar la calidad de los productos o incrementar su producción (Khan 1995; Chávarri 2010; Albrecht 2014). Se ha incrementado simultáneamente la producción de sustratos comerciales para su mantenimiento, que ha resultado en un encarecimiento de los procesos. Una alternativa más rentable se basa en el empleo de subproductos agroalimentarios como sustratos o medios de cultivo que reemplazan los comerciales (Villarán 2018; Mussato 2012).

En la **tabla 1.2** se indican microorganismos que han sido cultivados en residuos y que han presentado una revalorización de éstos al funcionar como sustratos o soporte sólido en diferentes procesos biotecnológicos.

Tabla 1.2. Uso de residuos agroalimentarios como medios de cultivo para diferentes tipos de microorganismos (Martins 2011).

Microorganismo	Residuo/medio de cultivo	Referencia
Hongos		
<i>Aspergillus niger</i>	Pieles de limón y naranja. Pulpa de manzana, cáscara de pistacho salvado de trigo, cáscara de coco, cáscara de nuez, hojas de arbusto de creosota, residuos de frijol	Orzua 2009
<i>Aspergillus niveus</i>	Bagazo de azúcar de caña	Guimaraes 2009
<i>Aspergillus oryzae</i>	Residuo de arveja	Shankar 2007
<i>Aspergillus sojae</i>	Maíz triturado, harina de maíz, elote	Ustok 2007
<i>Bjerkandera adusta</i>	Paja de trigo	Dinis 2009
<i>Ganoderma applanatum</i>		
<i>Phlebia rufa</i>		
<i>Trametes versicolor</i>		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Paja de arroz	Yu 2009
<i>Penicillium sp. soybean</i>	Salvado	Wolski 2009
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Aceite de sésamo	Singh 2008
<i>Trichosporon fermentans</i>	Paja de arroz	Huang 2009
Levaduras		
Levadura de panadería AF37X	Sorgo dulce	Yu 2008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Flores mahula	Mohanty 2009
Bacterias		
<i>Nocardia lactamdurans</i>	Salvado de trigo, arroz, aceite de soja, harina de soja	Kagliwal 2009
<i>Bacillus sphaericus</i>	Salvado de trigo	El-Bendary 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pasta de semillas de flores de <i>Jatropha curcas</i>	Mahanta 2008
<i>Streptomyces</i>	Pulpa de café	Orozco 2008

Los productos y servicios que los microorganismos pueden brindar, cubren un amplio espectro, que va desde la agricultura, la salud humana, el medio ambiente y la industria.

Por ejemplo, en el ámbito de la agricultura algunos géneros de bacterias *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Bacillus* y hongos *Trichoderma*, *Penicillium*, *Paecilomyces* o *Beauveria* han permitido mejorar considerablemente la absorción de

fertilizantes, proteger las raíces de posibles fitopatógenos y hasta incorporar nutrientes tales como nitrógeno del ambiente a las plantas sin sobre explotar el suelo (Kloepper 1994; Ahmad 2008). Como consecuencia de ello, estos microorganismos se usan como biopesticidas, bioestimulantes y biofertilizantes, tanto así que su uso se ha reglamentado en la unión europea (Reglamento UE 2017/1432).

En la salud humana, especies como *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* empleadas en la fabricación de hormonas, anticuerpos, antígenos etc. (Jozala 2016).

En cuanto a la aplicación de microorganismos en el medio ambiente resulta bastante interesante, puesto que al estar involucrados en procesos industriales más limpios el impacto que tienen sobre la naturaleza es menor, en comparación con los procesos tradicionales en los que la generación de desechos y contaminantes es mayor (Lokko 2018). Incluso se estima que muchos de los microorganismos empleados podrían convertirse en biodescontaminantes o biorremediadores de ambientes acuosos, gaseosos o sólidos contaminados. (López 2018).

Finalmente, la obtención de enzimas, como se ha mencionado en apartados anteriores, resulta ser de las aplicaciones más importantes en la actualidad, pues cerca del 50% de las enzimas comercializadas y empleadas en productos detergentes, de cosmética, textil entre otros, proviene de hongos y un 35% de bacterias. Las especies con mayor producción de enzimas son la bacteria *Bacillus subtilis* y el hongo *Aspergillus oryzae* (Patel 2017).

Otra de las aplicaciones que se han reportado y ha tomado fuerza durante los últimos años está relacionada con el uso de microorganismos para biotransformar la biomasa, en procesos en cascada, que permiten emplear en primera instancia materias primas provenientes de subproductos que son transformados por los microorganismos en energía, compost, biocombustibles, bioelectricidad o productos de valor añadido entre otros (Lewandowsky 2018; O'Callaghan 2016).

En la **figura 1.3** se indican las principales aplicaciones de los microorganismos, en procesos de biotransformación aplicados en los últimos años, para la obtención de diferentes productos de valor añadido.



Figura 1.3. Compuestos naturales obtenidos mediante biotransformaciones, empleando microorganismos aislados con sus posibles aplicaciones. (Pessoa 2019)

1.1.2. Residuos de frutos cítricos

De la gran cantidad de residuos provenientes de frutas y vegetales con potencial de revalorización, se destacan los residuos provenientes de frutos cítricos, debido a que es el cultivo más abundante a nivel mundial dada la alta demanda de frutos y productos derivados de naranja, mandarina y limón principalmente (Liu 2012; Marín 2007).

Dentro de la cadena productiva de este tipo de frutos, hay varios participantes, que van desde los cultivadores, pasando por empresas procesadoras, centros de distribución y exportadores hasta que los frutos finales o productos elaborados con estos llegan al consumidor. Sin embargo, en medio de toda esta producción de jugos, pulpas, concentrados y frutas en fresco, también hay una gran generación de residuos (Braddock 1995).

En la actualidad, se producen más de 120 millones de toneladas de cítricos en el mundo, correspondiendo el 53,4% a naranjas, el 31,5% a mandarinas, 8,3% a limones y limas y el 6,7% a pomelos. De la cantidad total, cerca de un 40% es empleado para extraer aproximadamente la mitad de peso del fruto como zumo (Maluenda 2019; Londoño 2012; Chohn 1997). Las demás partes del fruto como las pieles, las semillas y parte de la pulpa se convierte básicamente en residuos. Se estima que alrededor de unos 20 millones de toneladas de residuos cítricos, son producidos a nivel mundial, tan solo en España se producen 600 mil toneladas por año (Marín 2007), siendo una cantidad alarmante si se tiene en cuenta que muchos de estos residuos terminan en vertederos o en procesos de reutilización específicos que no terminan de disminuir en gran medida el impacto de estos desechos en el planeta.

De los residuos de los frutos cítricos, se obtienen dos grandes grupos, sólidos y líquidos, que representan, gracias a su origen, un gran potencial para ser reutilizados, pues su composición principal está dada por agua azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, minerales, flavonoides, vitaminas, y aceites esenciales (AE), en concentraciones que varían de acuerdo a la fracción de fruta empleada (piel, tallo, hojas, pulpa o zumo), su estado de madurez etc. (Izquierdo 2003; Braddock 1995).

Dentro de los residuos líquidos, se encuentran a su vez de dos tipos. Aquellos que generalmente se encuentran muy diluidos y son obtenidos mayoritariamente en los procesos de extracción del zumo, lavado de las pieles y aquellos que son el resultado de procesos de centrifugación que se han llevado a cabo tras la obtención de aceites esenciales (AE) (Mahato 2017; Coll 1998) y las melazas, que son obtenidas mediante el prensado y evaporación de las pieles de naranja o mandarina especialmente que son fracciones ricas en azúcares y proteínas que han sido empleadas en alimentos para el ganado lechero (Liotta 2019; Wing 2018).

En cuanto a los residuos sólidos, la fracción principal que los compone, corresponde a las pieles puesto que del peso total de un fruto un 30% corresponde a la piel, y por tanto es de esperar que predominen en los residuos. No obstante, son éstas, las que presentan una mayor concentración de compuestos de interés (Schieber 1998), por lo que su revalorización y empleo en distintos campos se hace imprescindible.

1.1.2.1 Compuestos de alto valor presentes en los residuos de mandarina

Después de las naranjas, las mandarinas son el segundo fruto cítrico de mayor interés a nivel alimentario, gracias a sus diversas propiedades, sabor etc. En total se consumen alrededor del mundo unos 30,3 millones de toneladas en fruto fresco, la producción de zumos de este fruto es escasa y está más relacionada con las naranjas. La Unión Europea aporta el 11% de la producción mundial de este fruto (Maluenda 2019), por lo que los residuos principalmente sólidos de este cítrico se producen en cantidades gigantes, que no son de fácil control, dado que la mayoría de pieles son desechadas domésticamente. Desaprovechando todas las aplicaciones que pudiesen tener, de acuerdo a la composición de sus pieles y semillas, que son las partes que mayormente son descartadas.

En la **figura 1.4**, se muestran las partes que constituyen el fruto con los principales tipos de compuestos contenidos en cada una de estas. Estas

partes son: la epidermis, flavedo, albedo, endocarpio, septas, semillas y el eje central (Lux 2019; Londoño 2012).

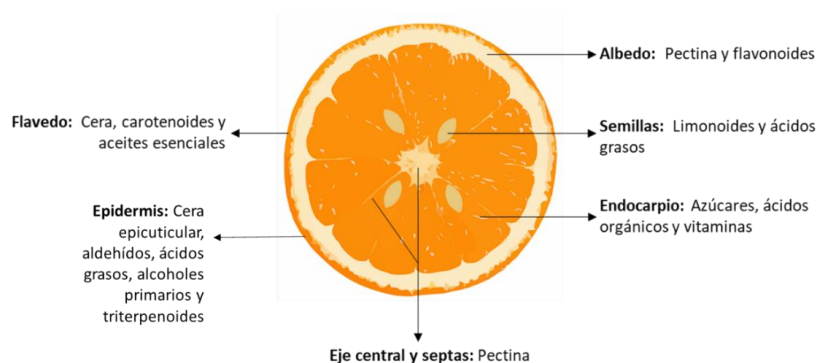


Figura 1.4. Distribución de la composición de los frutos cítricos. Elaboración propia a partir de Lux 2019 y Londoño 2012.

Teniendo en cuenta esta composición, es de esperar que, en los residuos sólidos de este fruto, se pueda encontrar una mezcla de todos estos componentes, principalmente de los contenidos en el flavedo, la epidermis, el albedo, las semillas el eje central, ya que el endocarpio es lo que más se emplea tanto en el consumo humano como en la elaboración de zumos y otros productos. Por tanto, resulta interesante identificar las aplicaciones y las diferentes alternativas de extracción.

Epidermis: Esta parte constituye básicamente la piel del fruto, su función principal es la de proteger y limitar los procesos de transpiración por medio de la exudación de cera epicuticular, compuesta principalmente por aldehídos y ácidos grasos de 16 y 18 carbonos (ácido 10,16 dihidroxihexadecanoico, ácido 9,16 dihidroxihexadecanoico entre otros), algunos alcoholes primarios y triterpenoides, estos dos últimos en poca concentración (Londoño 2012; Rafiq 2018; Czech 2020). Esta cera además es la encargada de darle el brillo tan particular a este tipo de frutos. La concentración de cera en la epidermis, es distinta de acuerdo con la variedad de mandarina, el clima y principalmente el estado de maduración. En estado inmaduro se han reportado concentraciones de $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y pasados seis meses de maduración unos $110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Sala 1992).

Teniendo en cuenta que la mayoría de residuos son generados cuando la fruta ya está madura y lista para el consumo, se esperaría que las cantidades

de estas ceras estuviesen en sus valores máximos. Por lo que su extracción podría convertirse en un sustituto a las ceras comerciales (Martínez 2000).

Finalmente, la epidermis alberga una biodiversidad de microflora interesante, compuesta por hongos y bacterias (Londoño 2012).

Flavedo: es la parte que separa el albedo de la epidermis. Está conformada por pequeñas vesículas, en cuyo interior se encuentran concentrados los pigmentos y los aceites esenciales (AE) (Farin 1983).

En cuanto a los pigmentos se destacan principalmente los carotenoides que predominan en la fruta tras su maduración, pues en estado inmaduro predominan las clorofilas. El contenido global de carotenos en la mandarina oscila entre 80 a 140 mg/kg. Dentro de los cuales un 23,4% corresponde a la β -criptoxantina, un 18% a la 9Z-violaxantina y 13,3% a la β -citraurina, todos estos compuestos causantes de la coloración amarilla-naranja de esta fruta. Adicionalmente se identifican en menores proporciones carotenos como neocromo, luteoxantina y luteína entre otros (Ma 2017; Giuffrida 2019).

Dentro de los principales usos que se le atribuyen a este tipo de compuestos, esta su acción como pigmentos naturales en textiles, cosmética y alimentos, de forma que, se convierten en una alternativa frente a los pigmentos sintéticos (Maoka 2020).

Respecto a los AE, son sustancias presentes en muchas plantas y frutos, especialmente en los cítricos, como es el caso de la mandarina. Se puede decir que son extractos naturales, de mezclas complejas, de aproximadamente 400 compuestos, cuyas concentraciones dependen del de la variedad de mandarina, el origen del cultivo y la extracción que se emplee para obtenerlos (Mahato 2017). Se caracterizan por tener aromas especiales y estar conformados principalmente por compuestos volátiles, en un rango del 85 - 99%, que son el resultado de los metabolitos secundarios de las plantas y de compuestos no volátiles entre un 1 y un 15% (Bakkali 2007; Fisher 2008; Obidi 2013;).

Dentro de los compuestos volátiles, resaltan los monoterpenos y sesquiterpenos y sus respectivos derivados oxigenados (Flamini 2007), que presentan olores característicos y de gran interés en la industria de aromas, fragancias y cosmética convirtiendo los residuos cítricos en una fuente potencial de materias primas para estos sectores, tal y como se detallará en el numeral 1.2.2. Por otro lado, los rendimientos reportados de extracción

del aceite de mandarina oscilan entre un 0,1 – 3% dependiendo del tipo de extracción realizada (Londoño 2012).

Albedo: esta parte de la mandarina y de todos los demás cítricos, es la parte que separa el flavedo del endocarpio. Es una parte rica en pectina y flavonoides (Londoño 2012).

Los flavonoides representan un grupo de compuestos con gran variedad estructural. Se encuentran en todas las plantas, también dentro de las mandarinas y por ende incluidos en los residuos sólidos de esta fruta. Aquellos que más predominan son las flavonas, flavanonas, calconas y dihidrocalconas (Zhang 2018). La presencia de estos compuestos, durante los últimos años ha despertado un interés, dados los efectos anticancerígenos, antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatorios, cardioprotectores y neuroprotectores que se han asociado con el consumo de cítricos o productos derivados, según lo informado por estudios in vitro e in vivo (Barreca 2017) y atribuidos principalmente a los flavonoides, en particular a las flavanonas (Barros 2012; Zou 2016).

En lo que respecta a la pectina, este compuesto es un polímero del ácido galacturónico, que consiste en un heteropolisacarido natural y biodegradable. Su principal aplicación se ha visto reflejada como agente estabilizador, espesante, neutralizante de bebidas ácidas etc. (Chin 2014; Wosiacki 2001). Ya se han evidenciado varios reportes de la extracción de este compuesto de las pieles de la mandarina, mediante hidrólisis ácida (Liu 2006), uso de membranas (Moresi 2008), extracción asistida por microondas (Kratchanova 2004) y con agua subcrítica (Tanaka 2011).

Semillas: contienen cerca de un 35% de aceite, el cual ha demostrado tener potencial de aplicación en el consumo humano, gracias a sus características y composición (Shahidi 2005).

Resulta ser una sustancia pálida o amarillenta, dependiendo de las variedades de fruto empleadas en su extracción. Además, presenta un aroma suave o almendrado y está conformado principalmente por triglicéridos, esteroides, fosfolípidos, esteroides, hidrocarburos, limonoides y ácidos grasos (Londoño 2012). Estos dos últimos especialmente le atribuyen características importantes.

Se han identificado cerca de 60 ácidos grasos en el aceite de las semillas de mandarina. Ácidos grasos insaturados (65%) como el ácido linoleico, oleico y linolénico, entre otros, además de pequeñas concentraciones de ácido

mirístico y ácidos saturados (31%) en menor abundancia, dentro de los que resaltan el ácido palmítico y esteárico, en la **tabla 1.4**, se indican los porcentajes de cada uno de estos en el aceite de las semillas (Saidani 2004; Rosa 2019).

Tabla 1.4. Principales ácidos grasos identificados en el aceite de las semillas de mandarina con su respectivo porcentaje. (Saidani 2004)

Ácido Graso		%
Insaturados		
	Ácido linoleico	>30
	Ácido oleico	>18
	Ácido linolénico	2-12
Saturados		
	Ácido palmítico	22-31
	Ácido esteárico	1,6

Los limonoides comprenden un grupo de triterpenos tetracíclicos. Estos compuestos, principalmente la limonina y la obacunona, son los responsables del amargor que pueden tomar los zumos de las frutas cítricas, especialmente en las mandarinas, de forma que, en el momento de la preparación de productos derivados de estas frutas se hace necesario realizar alguna dilución o remoción de los mismos, ya que un alto contenido de éstos serían el indicativo de mala calidad en los zumos, concentrados de fruta u otros productos derivados (Manners 2003).

Dentro de las aplicaciones más relevantes de este tipo de compuestos, se destaca su potencial antitumoral, anticancerígeno en el sistema digestivo, particularmente inhiben la carcinogénesis de colón (Champagne 1992; Chidambar 2011), por lo que su presencia en las semillas daría un valor especial a estos residuos y podrían convertirse en una fuente potencial que permita aprovechar los beneficios de este grupo de compuestos.

En este contexto, los residuos de los frutos cítricos son una fuente importante no solo de material orgánico, sino de compuestos que pueden reemplazar componentes similares (la mayoría sintéticos, costosos y nocivos con el medio ambiente) a los que actualmente son empleados en procesos industriales. Una de las opciones, es emplearlos como fuente de aromas. O bien para su extracción directa o como material de partida para obtener otros compuestos de interés en la misma industria. En este sentido, se hace necesario desarrollar mecanismos que permitan revalorizar estos residuos, en procesos sostenibles y circulares, tanto a pequeña como gran escala, que

permitan a su vez, ir reduciendo la generación de desechos que inevitablemente se convierten en una amenaza para el medio ambiente.

1.2. Compuestos de interés en la industria de aromas y fragancias

Ya en el año 3000 a. C., los egipcios usaban hierbas aromáticas, aceites, perfumes e incienso. Ya en el año 3000 a. C., los egipcios usaban hierbas aromáticas, aceites, perfumes e incienso, como alternativas curativas a distintas afecciones (Keville 1995). Incluso se ha reportado el uso de hierbas, especias, aceites y resinas para fragancias que eran empleados particularmente en los alimentos. Por ejemplo, las especias durante el imperio Romano se usaron para dar sabor, para ayudar a conservar e incluso para enmascarar sabores desagradables como la carne o el pescado en descomposición. Sin embargo, no fue sino hasta principios del siglo XIX, que los avances en procesos de destilación condujeron a mecanismos de extracción de aceites esenciales y fue allí, donde algunos de los principales compuestos responsables de aromas cotidianos fueron identificados (Margetts 2004).

Estos compuestos, son moléculas volátiles de bajo peso molecular (<400Da) capaces de generar respuestas en células receptoras por medio de la actividad olfativa por inhalación directa o vía retronasal, lo que resulta de igual manera en la percepción del aroma (Bicas 2016).

En general se pueden encontrar en diferentes fuentes naturales: alimentos, vino, especias, perfumes y aceites esenciales. Sin embargo, tan solo se extrae una cuarta parte de la cantidad total que puede ser extraída de estas fuentes naturales, volúmenes que no son suficientes para la demanda que existe. Como consecuencia, la mayoría de estos compuestos se producen mediante síntesis química (Mussato 2012).

1.2.1. Fuentes naturales de aceites esenciales

Dentro de la industria de aromas y fragancias se emplean varias fuentes de extracción, dentro de estas se destacan principalmente las plantas, las cuales se obtienen aceites esenciales, extractos, oleorresinas, tinturas, destilados etc. (Arctander 1960).

Las partes de la planta utilizadas para formar estos extractos varían desde el brote, la flor, la fruta, la piel, la semilla, el grano, el tallo, la hoja, la corteza,

el exudado hasta la raíz. De cualquiera de estas partes se obtienen principalmente aceites esenciales que contienen la mayoría de los componentes aromáticos volátiles de baja masa molecular con un perfil organoléptico distintivo y una gama única de componentes químicos orgánicos. Algunos ejemplos de plantas y las partes utilizadas convencionalmente desde hace mucho tiempo, en saborizantes y aromas se dan en la **tabla 1.5** (Margetts 2004).

Tabla 1.5. Material vegetal empleado en aromas y fragancias convencionalmente. (Margetts 2004).

Nombre común	Nombre científico	Partes empleadas
Pimienta de Jamaica	<i>Pimiento dioica</i>	Hoja y vaya
Almendra amarga	<i>Prunus amygdalus var. amara</i>	Núez
Bálsamo de tolu	<i>Toluifera balsamum</i>	Exudado de goma
Grosella Negra	<i>Ribes nigrum</i>	Hoja y brote
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Corteza y hoja
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Hojas
Hinojo dulce	<i>Foeniculum vulgare var. dulce</i>	Semillas
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Bulbo
Jengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Rizoma
Lúpulo	<i>Humulus lupulus</i>	Flor femenina
Jazmín	<i>Jasminum officinale</i>	Flor
Limón	<i>Citrus limon</i>	Piel y fruta
Limoncillo	<i>Cymbopogon citratus, C. flexuosus</i>	Hierba
Algarrobo	<i>Ceratonia siliqua</i>	haba
Menta	<i>Mentha spp.</i>	Floración superior y hoja
Melocotón	<i>Prunus persica</i>	Hoja, fruto , grano
Pino escocés	<i>Pinus sylvestris</i>	Aguja y rama
Rosa	<i>Rosa alba</i>	Rosa, escaramujo y hoja
Vainilla	<i>Vanilla planifolia</i>	Fruta/vaina

Por lo general, para la obtención de AE, se aplican varias técnicas de destilación, muchas de las cuales son procesos tradicionales que se han utilizado durante muchos años. La técnica más común es la destilación de

vapor (Wright 1995), sin embargo, se han venido desarrollando nuevas metodologías que permiten mejorar su aprovechamiento y por ende ampliar las aplicaciones y uso de los mismos, tal y como se detallará en apartados posteriores.

Los aceites esenciales, en general, constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta. Son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos (López 2004). Pero sus aplicaciones son extensas de ahí su interés en extraerlos.

Desde el punto de vista farmacológico, las propiedades de los aceites esenciales son muy variables debido a la heterogeneidad de sus componentes. Algunas de las moléculas presentes en los aceites esenciales de ciertas plantas poseen gran interés terapéutico. Algunas de estas acciones, por sus efectos sobre la piel, han encontrado también su aplicación en cosmética, dado su poder antiséptico, espasmolíticos etc., además de convertirse en fuentes de aromas que pueden ser aislados y aprovechados en la fabricación de fragancias (Verdura 1998).

Los aceites esenciales pueden contener más de 300 compuestos diferentes, dentro de los que se incluyen alcoholes, carbonilos, ácidos, lactonas, ésteres, terpenoides y sus derivados entre otros. En este documento se detallarán con mayor profundidad los terpenos y sus derivados, dada su gran importancia en la industria de aromas y fragancias.

1.2.2. Compuestos terpénicos y algunos de sus derivados

La industria del aceite esencial produce grandes cantidades de hidrocarburos terpénicos como subproducto de la purificación y concentración de aceites esenciales.

Estos compuestos, también llamados isoprenoides, son una de las clases más grandes de químicos naturales formados por el reordenamiento de dos o más moléculas de isopreno (C_5). Cuya estructura se indica en la **figura 1.5**.

Su biosíntesis puede ocurrir por dos vías. La ruta del ácido mevalónico en el citoplasma de las células de plantas, animales, levaduras, bacterias, algas, hongos y protozoos o la ruta del metileritritol fosfato en los cloroplastos de algas verdes, algunas plantas y parásitos plasmodio. Ambas rutas conducen a la síntesis de los precursores isopentenil difosfato (IPP) y su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) respectivamente. Estos precursores se

adicionan entre sí y dan lugar a las distintas estructuras de los terpenos como se indica en la **figura 1.5** (Waseem 2015; Pazouki 2016).

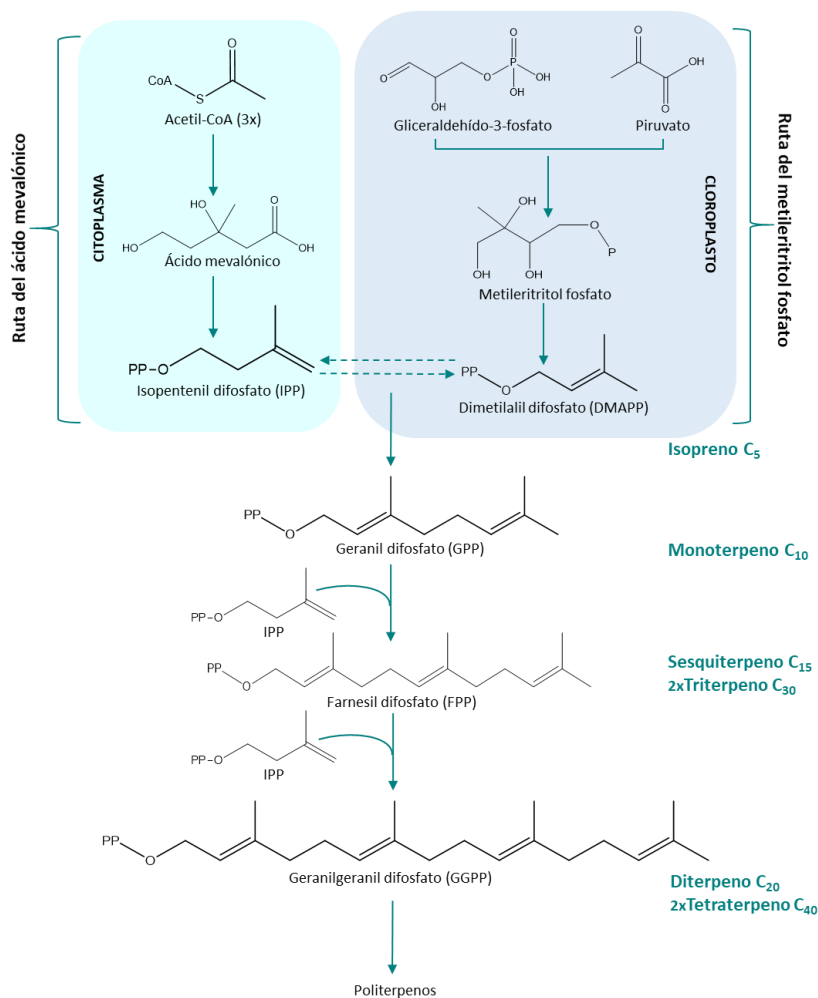


Figura 1.5. Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que los conforman (Waseem 2015; Pazouki 2016).

Las principales clases de terpenos incluyen los monoterpenos (C₁₀) y sesquiterpenos (C₁₅). Otras clases incluyen hemiterpenos (C₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) y tetra terpenos (C₄₀). Estos compuestos pueden o no, estar ciclados, oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, fenoles etc.) y/o metilados. Estos cambios estructurales les confieren ciertas características incluyendo una versatilidad de aromas y aplicaciones

industriales importantes. Cabe resaltar que los monoterpenos y sesquiterpenos se encuentran en mayor abundancia en la naturaleza y constituyen cerca del 90% de los aceites esenciales. La mayoría son insolubles o parcialmente solubles en agua y en condiciones especiales pueden ser inestables en presencia de luz o al contacto con el aire (Margetts 2004).

Su importancia a nivel industrial es bastante amplia, se consideran un buen material de partida en síntesis de aromas. Uno de los principales monoterpenos y uno de los más abundantes en la naturaleza es el limoneno, llega incluso a representar más del 90% del aceite de la piel de la naranja, lo que le confiere un valor adicional, puesto que de ser aprovechado o extraído eficientemente lo convertiría en un precursor económico y con una amplia aplicabilidad (Fenaroli 1971; Bauer 2001), de hecho se estima que cerca de 36 mil toneladas de este compuesto son extraídas mediante extracción en frío y presión de los aceites esenciales de las pieles de frutos cítricos al año (Berger 2002). Su aroma es bastante cítrico y muy apreciado por perfumistas. Adicionalmente sus derivados son bastante valorados en la industria de aromas.

Dentro de estos derivados, se destacan aquellos que están oxigenados como: carveol con un aroma similar a la menta verde y la alcaravea; la carvona cuyos toques mentolados simulan el olor de la yerbabuena; el alcohol perílico que recuerda el olor de la madera fresca; el mentol cuyo aroma es fresco y es el principal componente de la *Menta piperita* (Bicas 2009).

Por otro lado, se encuentran los monoterpenos α y β -pineno, que ocupan el segundo y tercer lugar de los terpenos más abundantes en la naturaleza y por ende con mayores usos en la industria. Son mayoritariamente extraídos de la turpentina y su papel en la industria es muy amplio, especialmente en perfumería y cosmética, su aroma varía desde los toques de eneldo, perejil o albaca a pino fresco, dependiendo de si están en su forma α o β (Bicas 2009). Se estima que al año se obtienen aproximadamente 26 mil toneladas de pineno del aceite de pino (Berger 2002).

Limoneno, α y β -pineno, son precursores en la síntesis, obtención o transformación de otros compuestos de interés en aromas y fragancias. Es el caso de compuestos como: α -terpineol cuyo aroma recuerda a la tila y el té; el borneol que presenta un aroma picante, herbal y con toques mentolados; alcanfor con un aroma fresco, herbal, picante y penetrante; citronelal responsable del olor a limón del aceite de citronela y que está presente en la

mayoría de repelentes contra mosquitos de origen natural; geraniol con toques florales, que se emplea generalmente para imitar el aroma de las rosas en algunos aromatizantes y en productos con sabores como melocotón, piña, arándano etc.; nerodiol con su aroma leñoso y toques de corteza fresca; linalool cuyo aroma floral, fresco y con toques cítricos lo ha convertido en uno de los ingredientes claves en perfumes dulces; mentol con toques de menta y refrescante; verbenol y verbenal cuyos aromas se asemejan al alcanfor pero sin el picante particular de este (Bicas 2009 Fenaroli 1971; Bauer 2001); entre otros, que se convierten en ingredientes importantes para la elaboración de distintos productos. Las estructuras de estos compuestos se indican en la **figura 1.6**.

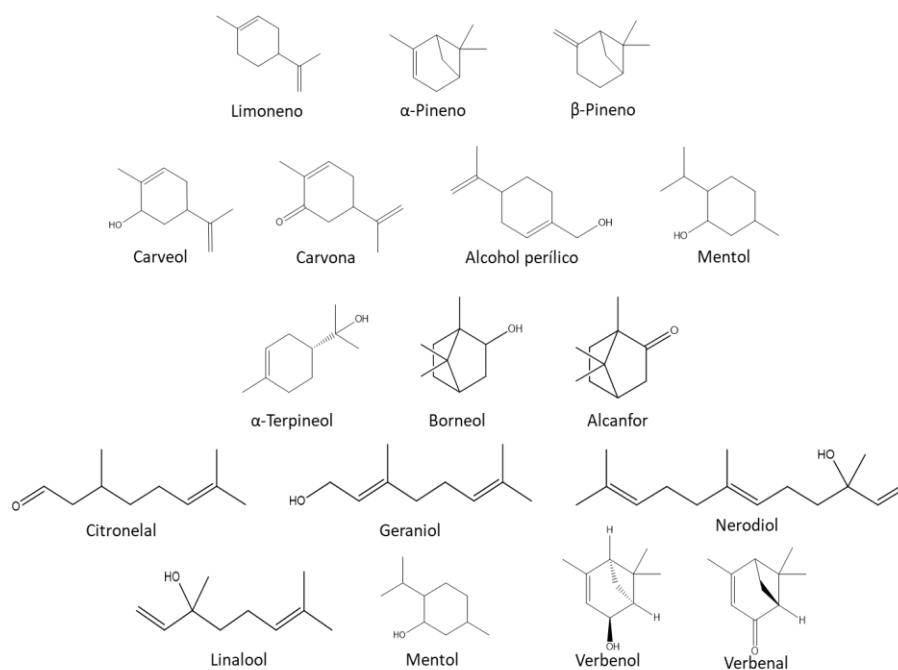


Figura 1.6. Estructuras de los principales terpenos de interés en la industria de aromas y fragancias.

1.2.3. Métodos de extracción y obtención de aromas Compuestos terpénicos y algunos de sus derivados

Los compuestos aromáticos se pueden producir utilizando tres métodos: síntesis química, extracción directa de las fuentes naturales y por medio de síntesis biotecnológica (**figura 1.7**). En el primer caso, los rendimientos son

altos y generalmente el costo de los procesos es bajo. No obstante, los productos generados no son de calidad y como producto final de la síntesis se obtiene una mezcla que incluye, además de las materias primas de reacción, otros compuestos formados durante el proceso con lo que es necesario utilizar procesos de purificación. Adicional a esto, los aromas obtenidos no pueden catalogarse de origen natural (Akacha 2014).

En el segundo y tercer caso, los productos obtenidos sí pueden catalogarse como de origen natural, lo que les da un valor añadido y un atractivo comercial indiscutible. Sin embargo, el método de extracción directa de las fuentes naturales está lleno de desafíos, entre los cuales destacan aspectos como la disponibilidad de la fuente en ciertos períodos del año y el bajo rendimiento, lo que resulta en un alto precio para el producto final (Oliveira 2017).

En cuanto a la producción biotecnológica de compuestos aromáticos se destaca una alta selectividad, que permite diseñar mecanismos en los cuales se evitan las mezclas de materias primas en el producto final y se obtienen aromas de alta pureza óptica, impactando beneficiosamente en las características sensoriales del producto, adicionalmente la producción es continua durante todo el año y sin interferencia estacional, en tercer lugar, las condiciones de proceso son controlables y optimizables. Sin embargo, los rendimientos son bastante bajos y se requieren estudios y avances que permitan mejorarlos integrando diferentes tecnologías que permitan poner este método en las condiciones comerciales similares al primero (Bicas 2016). En la **figura 1.7** se indican las generalidades de cada uno de los métodos.

Síntesis Química	Extracción de fuentes naturales	Síntesis biotecnológica
Rendimientos altos, bajo costo	Baja concentración, influencia de condiciones ambientales, bajo rendimiento	Condiciones sencillas, procesos ininterrumpidos, no hay influencia de condiciones ambientales.
Baja selectividad, mezclas de productos	Buena calidad sensorial, aprovechamiento de residuos agroindustriales	Bajo rendimiento
Sintético, artificial idéntico al natural	Natural	

Figura 1.7. Algunas características relacionadas con cada método de producción de aromas (Bicas 2016).

Teniendo en cuenta esta información se hace evidente que las dos alternativas para la extracción de aromas estarían encauzadas hacia la obtención directa a partir de las fuentes naturales y el uso de la biotecnología o incluso en el desarrollo de procesos que integren las dos vías.

A continuación, se detallarán los métodos de obtención directa de las fuentes naturales y posteriormente las aplicaciones biotecnológicas desarrolladas en la obtención de aromas.

1.2.3.1 Métodos de extracción de fuentes naturales

Dentro de los métodos de extracción de aromas directamente de las fuentes naturales, se incluyen varias técnicas: destilación por arrastre de vapor, la hidrodestilación, las extracciones con diferentes tipos de disolventes (incluidos disolventes orgánicos, fluidos supercríticos, subcríticos y líquidos iónicos), y alternativas que asisten a las otras técnicas, como la extracción con ultrasonidos (EAU) y microondas. Además de técnicas en espacio de cabeza y la extracción en fase sólida (SPME), sin embargo, estas se emplean para detectar aromas y generar un perfil de la fuente natural y no para la extracción en volumen de aceites esenciales o compuestos de interés específicamente, por lo que resultan útiles especialmente la segunda para realizar cribados y conocer los aromas emitidos de una fuente específica (Da Costa 2004). Adicionalmente se han llevado a cabo extracciones mediante prensado manual y mecánico sin embargo los rendimientos de estos métodos son bastante bajos, menos del 1% (Kademi 2017).

Destilación

La destilación por arrastre de vapor y la hidrodestilación son procesos que permiten la separación por AE al calor. Son de los métodos antiguos aprobados oficialmente para la extracción de AE de fuentes vegetales (Li 2014). En los que se genera un extracto acuoso que necesita ser extraído con solvente (Parliment 1997; Blanch 1993). Estas técnicas son empleadas principalmente en la extracción de aromas de fuentes naturales cítricas como: mandarina, limón y naranja (Mercy 2015; Caccioni 1998) y de especias como la canela (Pavia 2005). Los rendimientos de estos procesos oscilan entre 1% - 6% para la destilación por arrastre de vapor y entre 2,5 - 4% para la hidrodestilación, en el mejor de los casos, dependiendo de la matriz, el disolvente de recolección, etc. (Eri 2000). La principal ventaja es que los extractos resultantes no contienen ningún producto no volátil, se puede concentrar la muestra y son procesos económicos, sin embargo no son

buenos para materiales frescos que no fueron previamente procesados térmicamente, como frutas y verduras, ya que el extracto es más parecido a un aroma cocido, en lugar de fresco, además la formación de artefactos es posible debido a la degradación térmica de los componentes de la muestra y la variabilidad en el rendimiento (Da Costa 2004).

Extracción con disolventes

Hasta hace un tiempo, las técnicas como soxhlet y la sonicación de las muestras con disolventes orgánicos, eran bastante empleadas, sin embargo, la principal desventaja que presentaban era a presencia de componentes no volátiles (especialmente grasas) que se encontraban en el extracto final, además del rendimiento de extracción que no superaba el 4% (Da Costa 2004; Ozel 2004). Durante los últimos años se han desarrollado alternativas que permiten disminuir o sustituir parcial o totalmente el uso de disolventes orgánicos en procesos más limpios, en tiempos más cortos, menos tóxicos para el ser humano y con buenos rendimientos (Bicas 2016; Mustafa 2011).

Dos mecanismos que han asistido los métodos de extracción, son el empleo de ultrasonidos o de microondas que ofrecen ventajas en términos de productividad ya que disminuyen los tiempos de extracción. Sin embargo, los rendimientos en el primer caso no superan el 4% (Ullah 2017) y el 0,5% (Cardoso 2013) en el segundo caso, lo que hace que deban ser empleados como complemento adicional en otras técnicas si se desean alcanzar buenos resultados.

Otro de los métodos de extracción para los aceites esenciales de fuentes naturales es mediante líquidos presurizados (PLEs), que consiste en el uso de altas presiones y temperaturas sobre un disolvente con el fin de aumentar su capacidad y eficiencia extractora, lo que resulta en un menor tiempo de extracción y adicionalmente un menor empleo de disolvente. Los rendimientos de este método oscilan entre 1,1 -3,7% (Benthin 1999). Sin embargo, es un método que requiere de extrema precaución, ya que algunos compuestos termolábiles pueden ser degradados. Además, no todos los disolventes pueden ser empleados por razones de seguridad y no es compatible con otras técnicas como ultrasonidos o microondas (Mustafa 2011).

Otro método es la extracción mediante líquidos iónicos (ILs). Constituidos básicamente por iones, se caracterizan por presentar una presión de vapor baja en comparación con los disolventes orgánicos y ser termoquímicamente

estables. El rendimiento de extracción está entre 5,62 -9,61 % (Ullah 2019), sin embargo, se conoce muy poco acerca de la toxicidad de este tipo de disolventes, por lo que no resultan aún tan seguros para ser empleados en procesos cuyos productos sean destinados como saborizantes o perfumes con contacto humano o animal (Francisco 2010).

Finalmente, la una de las técnicas prometedoras, consiste en el uso de fluidos súper críticos (SFE), sobre la que se detallará en el siguiente apartado. Cabe resaltar que todas las técnicas mencionadas pueden incluir adicionalmente pretratamientos de las muestras.

Dentro de los pretratamientos más comunes se encuentra la deshidratación o liofilización y la reducción del tamaño de las partículas cítricas mediante trituración mecánica o manual. Puesto que de acuerdo con los principios generales establecidos por la ley de Fick, la capacidad de extracción de una solvente mejora cuando el tamaño de las partículas se ha reducido, porque el área de contacto aumenta, lo que lleva a una menor resistencia a la difusión (Negro 2016) reflejada en una mayor cantidad de aceite esencial o aroma extraído. Otro de los pretratamientos, empleados es la molienda criogénica. Esta es una técnica que puede emplearse para aumentar el área de superficie, de manera que se evita la pérdida de compuestos volátiles, debido al uso de temperaturas bajas (Negro 2016).

Adicionalmente se ha venido trabajando en una alternativa que puede ser empleada como único pretratamiento o bien complementar a los pretratamientos mencionados anteriormente. Consiste en la hidrólisis parcial o completa de las paredes celulares por medio de enzimas apropiadas como por ejemplo celulasa y pectinasa que favorecen la liberación de aceites esenciales o aromas de matrices complejas como las pieles de cítricos (Hosni 2013; Bhat 2000), ya que éstas están compuestas por celulosa, hemicelulosa y otros polímeros entrelazados entre sí, que son una barrera para la extracción los aceites esenciales o aromas. Así mismo el empleo de estas enzimas en diferentes combinaciones, sobre una misma matriz, crea condiciones favorables para la extracción, aumentando considerablemente las cantidades de aceite esencial o aromas extraídos (Cinar, 2005; Amudan 2011).

Fluidos supercríticos (FSC)

Uno de los métodos más innovadores de extracción con solventes es la extracción mediante FSC, donde los solventes utilizados son fluidos

supercríticos (Anklam 1998; King 2002), como el dióxido de carbono. Se dice que una sustancia está en estado supercrítico, cuando está sometida a condiciones de presión y temperatura superiores a las de su punto crítico, de forma que, no puede licuarse ni vaporizarse por mucho que se aumenten dichas condiciones. En este estado las sustancias no se comportan ni como gases, ni como líquidos (Luque 1993). Estas características, han permitido emplear el CO_2 como un excelente disolvente de extracción.

Una de las ventajas de esta técnica es que puede manipularse el disolvente, en un amplio rango, variando la presión y la temperatura. En otras palabras, es posible realizar diferentes tipos de extracciones variando la densidad del CO_2 , de manera que se pueden obtener diferentes tipos de extractos que contengan perfiles aromáticos distintos, dependiendo de la fuente natural empleada, los compuestos que se deseen obtener, etc. (Waseem 2015; Bicas 2016; Da Costa 2004). Las extracciones por FSC funcionan mejor cuando las muestras son sólidos secos o líquidos viscosos y es particularmente útil para extraer fragancias (King 1993).

El método consiste en empaquetar la muestra en una celda, sobre la cual se hace pasar el fluido supercrítico, el extracto es recogido en viales, en pequeñas cantidades de disolvente (McHugh 1986) en la **figura 1.8** se indica esquemáticamente el proceso general de extracción. En la actualidad existen varios equipos de FSC, algunos de éstos acoplan solvente como metanol, etanol entre otros, con el fin de mejorar las extracciones de compuestos polares (Uquiche 2015).

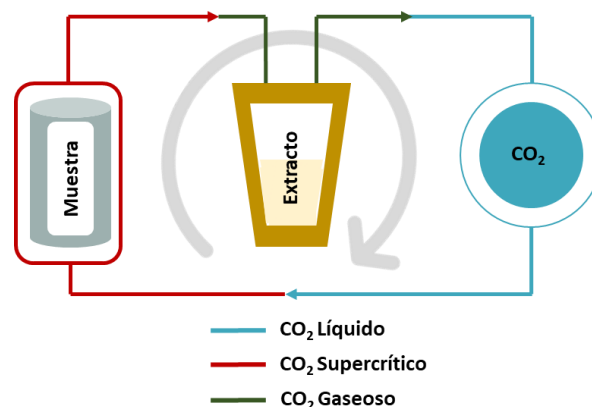


Figura 1.8. Esquema general de extracción mediante fluidos supercríticos.

Dentro de las ventajas de FSC se incluye el uso de solventes que no son tóxicos, la selectividad, tiempos de extracción cortos que se pueden modificar de acuerdo con las características de la muestra y una menor reacción de compuestos térmicamente lábiles y sensibles al oxígeno. Sin embargo, existe una dificultad para equilibrar la temperatura, la presión y la velocidad de flujo para cada tipo de muestra. Esto hace que el desarrollo del método requiera mucho tiempo. Además, la capacidad de muestra es relativamente limitada (Da Costa 2004).

Para llevar a cabo la optimización de la extracción de aromas de alguna fuente natural por este método, es necesario realizar un análisis de superficie de respuesta, cuyo propósito principal es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de las variables respuesta, en este caso temperatura, presión y tiempo de extracción, para determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta, al determinar las condiciones óptimas de extracción (Cornell 1984; Zaghdoudi 2016).

El proceso se lleva a cabo en tres etapas, la primera de ellas consiste en la selección de un diseño experimental, la segunda en la obtención de los modelos con las condiciones optimizadas y finalmente la aplicación de estos modelos.

Dentro de los diseños experimentales de superficie de respuesta, uno de los más empleados es el diseño experimental de Box-Behnken, que permite tener 3 niveles por factor, esto es, tres valores de cada variable (temperatura, presión y tiempo), en donde se selecciona para cada uno de estos un valor máximo, mínimo e intermedio. De esta manera, los experimentos sugeridos por este diseño permiten evaluar la respuesta de extracción en los diferentes niveles de cada factor y al final se obtienen los modelos mediante un software estadístico que permite determinar las condiciones óptimas de extracción de acuerdo a los resultados de los experimentos propuestos por el modelo (Khajeh 2012).

Dentro de la información obtenida tras el análisis estadístico, se obtiene por un lado el factor de inflación de la varianza y el diagrama de parteo, que permite determinar la correlación entre los factores de temperatura, presión y tiempo de extracción. De esta forma, es posible evidenciar si en cada caso específico hay un factor que afecte en mayor medida la extracción, o la relación entre dos o en algún caso puntual dependa de los tres factores.

Adicionalmente se obtiene el análisis de la varianza, la ecuación del modelo y finalmente las condiciones óptimas de extracción, que son posteriormente validadas mediante nuevas extracciones que confirman los modelos.

1.2.3.2 Métodos de obtención biotecnológica

La producción biotecnológica de aromas podría describirse mediante dos caminos básicos: a través de síntesis *de novo* o por medio de la biotransformación, empleando microorganismos (Bicas 2016) como se indica en la **figura 1.9**.

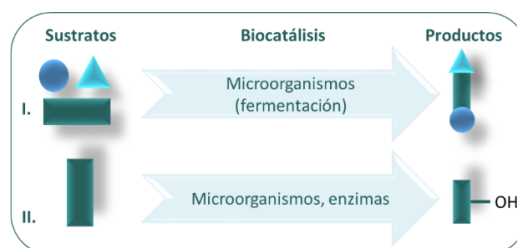


Figura 1.9. Representación esquemática de la producción biotecnológica de aromas mediante I. síntesis *de novo* y II. Biotransformación (Bicas 2016).

La síntesis *de novo* se refiere a la producción a partir de lo “nuevo”, es decir, la síntesis de sustancias partiendo de moléculas simples como azúcares, aminoácidos, sales de nitrógeno, minerales etc., que se van organizando en bloques hasta formar moléculas más complejas, todo esto mediante el metabolismo propio de algunos microorganismos que son capaces de producir aromas (Braga 2018). Sin embargo, además de los aromas producidos, en los productos finales se obtienen otros compuestos que no son de interés y que resultan en una mezcla de productos, en la cual, la concentración de los aromas se sitúa por debajo de los 0,5 g/L. Tan solo en casos muy puntuales y muy escasos, este valor puede superarse, de forma que, económicamente no resulta un proceso viable para la industria (Belin 1992; Bicas 2016; Braga 2018). En la **tabla 1.6**, se indican algunos de los principales aromas obtenidos mediante este proceso.

Tabla 1.6. Ejemplos de aromas obtenidos de *novo* síntesis microbiana.

Producto	Aroma	Microorganismo	Concentración g/L	Referencia
Bencilcarbinol	Floral	<i>Y. lipolytica</i>	0.20	Celinska 2013
		<i>K. marxianus</i>	1.30	Kim 2014
		<i>E. coli</i>	0.26	Kang 2014
		<i>E. sp. CGMCC 5087</i>	0.33	Zhang 2014
		<i>K. lactis</i>	0.72	Jiang 1993
Diacetilo	Mantequilla	<i>L. casei</i>	1.40	Nadal 2009
		<i>L. lactis</i>	0.36	Guo 2012
		<i>E. aerogenes</i>	1.35	Zhao 2009
		<i>C. glabrata</i> DA-3	4.70	Gao 2014
Limoneno	Citrico (naranja- mandarina)	<i>E. coli</i>	5.00E ⁻³	Alonso 2013; Willrodt 2014
			0.43	Alonso 2013
			2.70	Willrodt 2014
			4.00E ⁻³	Davies 2014
			1.48E ⁻³	Behrendorff 2013
Vainillina	Vainilla	<i>E. coli</i>	0.20	Kunjapur 2014
			9.75E ⁻³	Ni 2015
			1.33E ⁻³	
		<i>S. cerevisiae</i>	0.50	Brochado 2010

La biotransformación es un proceso que consiste en llevar a cabo reacciones catalizadas enzimáticamente, en las cuales un sustrato es metabolizado por los microorganismos por medio de procesos de oxidación/reducción para producir estructuras similares al mismo con toques de aromas distintos (Leuenberger 1990). Un punto importante a resaltar es que, en la biotransformación, a diferencia de la síntesis *de novo*, los rendimientos son más altos ya que los valores mínimos reportados se sitúan por encima de 1 g/L (Bicas, 2016), adicionalmente en las biotransformaciones no se generan desechos tóxicos, y los productos obtenidos pueden ser etiquetados como "naturales" (Janssens 1992; Giri 2001; Serra 2005; Leuenberger 1990).

Incluso se estima que, de los 6500 sabores y aromas conocidos, tan solo 300 son usados en la actualidad y de estos entre unos 50 y 100 son producidos mediante biotransformación, empleando microorganismos por medio de procesos de fermentación especialmente (Sacragg 2007).

Uno de los principales ejemplos es el caso la vainillina. Este compuesto se encuentra en una orquídea tropical denominada *Vainilla planifolia*, la extracción directa de la fuente natural no supera el 2% de rendimiento, razón por la cual, este compuesto de origen natural es muy caro (entre US\$ 1200 – 4000 /kg), lo que ha obligado a la industria a crear mecanismos de síntesis química para obtenerlo en grandes cantidades logrando tener un precio de US\$15/kg. No obstante, resulta ser un aroma sintético, sin el sello de origen natural que tanto exigen los consumidores, disminuyendo así la calidad de los productos (Serra 2005).

Como alternativa, se han empleado microorganismos como *E. coli* y *S. cerevisiae* en la obtención de vainillina a partir de sustratos como ácido acético, veratraldehído y principalmente ácido ferúlico que han logrado disminuir los costos de este compuesto hasta en un 50% (Converti 2010).

Otro de los casos está relacionado con el uso de terpenos como limoneno, β -pineno entre otros, que actúan como sustratos y que son biotransformados por células enteras de hongos y bacterias, que han demostrado potencial para transformar estos compuestos en metabolitos aplicables a la industria de aromas y fragancias (Vandamme 2003).

Cabe destacar que existen diferentes procesos para llevar a cabo las biotransformaciones. Generalmente se realizan con cultivos en crecimiento de células, que pueden estar previamente cultivadas, o inmovilizadas, o por medio de enzimas purificadas o sistemas multifásicos (Leuenerger 1990). Sin embargo, el mecanismo mayormente empleado es el uso de células enteras, previamente cultivadas. Esto quiere decir que se opta por el empleo de microorganismos que actúen directamente sobre los sustratos. Una de las principales ventajas de este tipo de biotransformación es que aparte de ser simple y económica, el uso de células enteras protege a la enzima de las fuerzas de cizallamiento y extiende vida media de la actividad enzimática y, por otro lado, se evita el uso de cofactores (Chatterjee 2004).

Biotransformación de limoneno y β -pineno

Como se mencionó en apartados anteriores, los terpenos son metabolitos secundarios que producen las plantas. Estos actúan como defensa ante algunos microorganismos o insectos o como sustancias que permiten atraer a los polinizadores (Gershenzon 2007). Dentro de los terpenos más abundantes en la naturaleza, se encuentra el limoneno y el β -pineno. Debido a su abundancia y costo relativamente bajo, estos dos monoterpenos se han

utilizado como los precursores principales para la síntesis de sus derivados oxigenados por medio del empleo de microorganismos, especialmente hongos, que han dado lugar a la obtención de compuestos con potencial uso en aromas y fragancias (Bicas 2008).

Limoneno y sus productos de biotransformación:

El limoneno tanto de origen vegetal como sintético, es uno de los sustratos más estudiados en los procesos de biotransformación con diferentes cepas de hongos, ya que dadas sus características moleculares y mediante procesos de oxidación/reducción, da lugar a la formación de compuestos altamente valorados en la industria de aromas y fragancias como por ejemplo α -terpineol, limonen-1,2-diol, alcohol perílico, carvona, linalool, entre otros. (Molina 2019). Estos compuestos generalmente son de origen sintético, por lo que su obtención, por medio de la biotransformación, permite denominarlos de origen natural.

Una cepa de *Fusarium oxysporum* ha demostrado una gran capacidad de biotransformar el limoneno en α -terpineol y limoneno-1,2-diol (Molina 2015). El hongo endofítico *Phomopsis* sp. ha sido capaz de producir limoneno-1,2-diol (Jucoski 2017). Así mismo se ha demostrado un fuerte potencial de biotransformación de la cepa *Penicillium digitatum*, que ha convertido el limoneno en α -terpineol (Tai 2015). Por otro lado, la cepa *Yarrowia lipolytica* ATCC 18942 reportó una alta concentración de alcohol perílico, tras el proceso de biotransformación del limoneno, alrededor de 560 g/L, una cantidad interesante desde el punto de vista de las aplicaciones de este compuesto (Ferrara 2013). En *Aspergillus niger* los principales metabolitos producidos tras la biotransformación del limoneno son el alcohol perílico, carveol, *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol, carvona, α -terpineol y, algunos óxidos de limoneno, entre otros (Parshikov 2014).

Como se observa, la producción de aromas por medio de la biotransformación del limoneno, empleando hongos, resulta ser una alternativa interesante. En la **figura 1.10**, se indican las estructuras de los principales metabolitos que pueden ser obtenidos, mediante la biotransformación del limoneno.

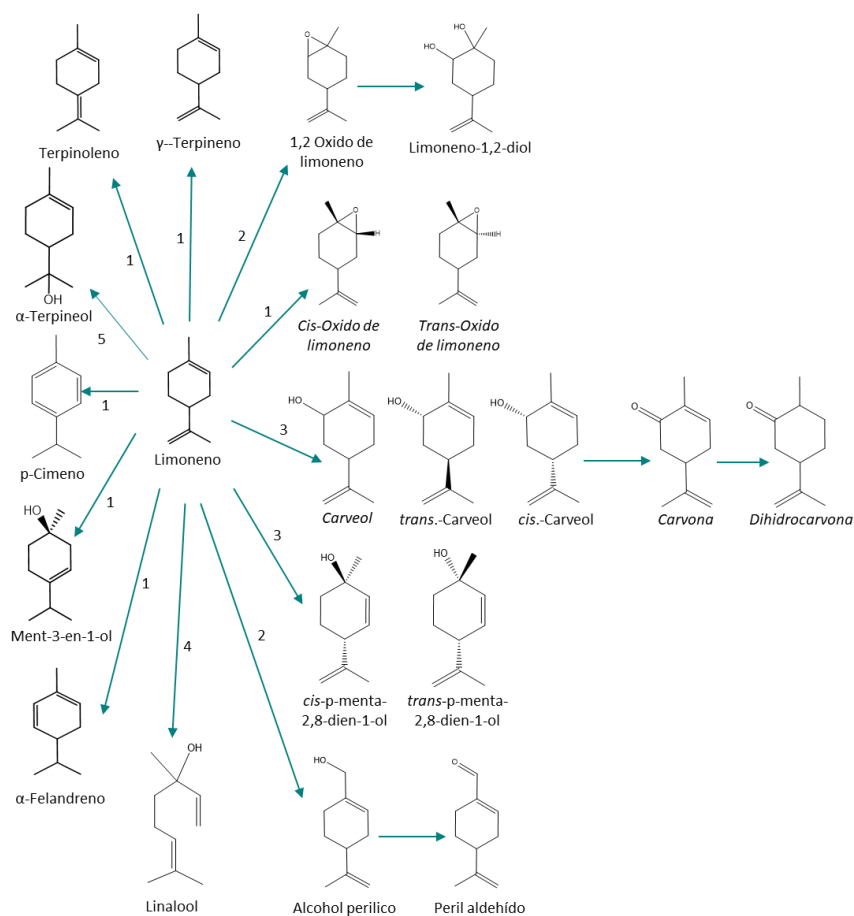


Figura 1.10. Representación esquemática de las principales vías metabólicas del limoneno obtenidas mediante su biotransformación. ¹Kang 2014; ²Van Der Werf 1990; Maróstica 2007a; ³Adams 2003; ⁴Prieto 2014; ⁵Vespermann 2017.

β -Pino y sus productos de biotransformación:

Los monoterpenos bicíclicos más abundantes en la naturaleza son pinoes, en sus formas α y β . Estos compuestos, se han utilizado como sustrato en procesos de biotransformación para la producción de compuestos aromáticos importantes, que incluyen verbenol, verbenona, mirtenol, α -terpineol entre otros (Vespermann 2017).

Por ejemplo, el hongo *Polyporus brumalis* ha demostrado su capacidad para producir principalmente α -terpineol con un rendimiento del 50%, como

metabolito mayoritario de la biotransformación tanto de α como de β -pineno (Lee 2015a), por otro lado, *Ceripora* sp además de producir α -terpineol (30,38%), ha producido compuestos como fenchol, borneol, limoneno, verbenona entre otros (Sales 2018). Otros como *Stereumhirsutum*, después de cuatro días de biotransformación han dado lugar a la producción de verbenona, mirtenol, alcanfor e isopinocarveol (Lee 2015b).

Adicionalmente algunas cepas de *Chrysosporium pannorum* y *Aspergillus niger* demostraron potencial para producir verbenol y verbenona (Trytek 2014; Parshikov 2014), productos apreciados por su característico aroma herbal.

En la **figura 1.11**, se indican las estructuras de los principales metabolitos que pueden ser obtenidos, mediante la biotransformación del pineno, en su forma α y β .

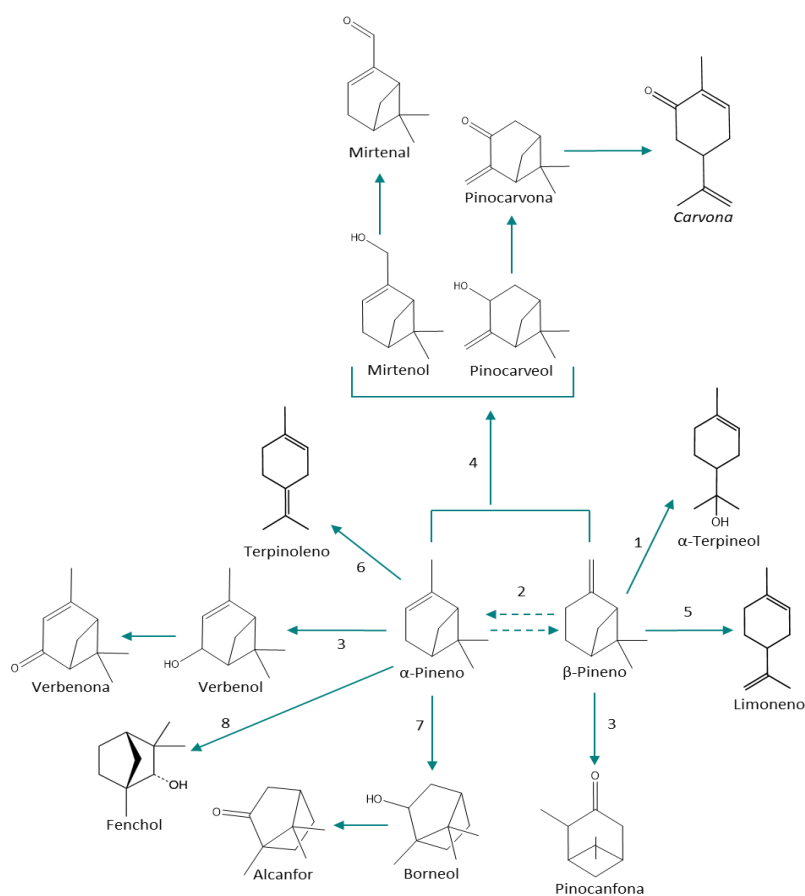


Figura 1.11. Representación esquemática de las principales vías metabólicas del α y β -pineno, obtenidas mediante su biotransformación. ¹Rozenbaum 2006; Toniazzo 2005; ²Bicas 2008; ³Van Dyk 1998; ⁴Savithiry 1998; ⁵Yoo 2002; ⁶Narushima 1982; ⁷Schrader 2007; ⁸Lee 2015b.

Con esta información se hace relevante enfatizar en la importancia del uso de nuevos microorganismos que representen capacidades para biotransformar este tipo de sustratos, pues hay una variedad enorme de especies, que podrían evaluarse y de las que aún se desconoce su actividad a pesar de que están presentes en el ambiente, incluso en los residuos agroindustriales de los que podrían ser aisladas.

1.2.3.3 Métodos combinados de extracción directa y obtención biotecnológica

Ahora bien, tras mostrar los caminos por los que se pueden obtener aromas, tanto por extracción directa o por vías biotecnológicas, ha surgido una nueva propuesta que integra estas dos vías, de forma que se han empleado fuentes naturales como sustratos, o medios de cultivo para el crecimiento y/o procesos de biotransformación o síntesis *de novo* (Bicas 2016).

Una de las estrategias más empleadas, consiste en el uso de diferentes alternativas de sustratos, particularmente aquellos que provienen de la biomasa con el fin de sustituir los medios de cultivo convencionales (Bicas 2010; Pandey 2000; Laufenberg 2003).

Cabe mencionar que un medio de cultivo ideal debe satisfacer las necesidades microbianas y garantizar las mejores condiciones para la formación de productos, además de permitir un proceso de purificación simple (Bicas 2010), por lo que, dependiendo del proceso, el valor de un medio de cultivo puede representar del 38 al 73% de los costos totales de producción (Stanburry 1995). En consecuencia, el uso de materiales que provienen de diferentes procesamientos agroindustriales resulta ser una excelente opción, ya que además de brindar soporte a los microorganismos, les brindan nutrientes (carbohidratos, nitrógeno, minerales, etc.) para su crecimiento y desarrollo e incluso se favorecen en algunos casos procesos de biotransformación de algunos compuestos presentes en los residuos o la extracción de algunos de éstos que puedan tener distintas aplicaciones. Así mismo se reducen los costos de producción, el volumen de residuos que termina en los vertederos y se le agrega un valor los subproductos (Bicas 2016; Makkar 2002; Bicas 2010; Longo 2006).

En la **tabla 1.7**, se pueden observar algunos ejemplos, del uso de residuos como medio de cultivo para el crecimiento de algunos microorganismos, que han producido mediante síntesis *de novo* aromas de interés en la industria.

Tabla 1.7. Producción de aromas por medio de la *novo* síntesis, empleando residuos agroindustriales como medio de cultivo (Bicas 2010; Longo 2016).

Residuo/Sustrato	Microorganismo	Aroma	Tipo de cultivo	Referencia
Pulpa de cítricos	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Frutal	SFF	Rossi 2009
Pulpa de café y cascaras	<i>Pachysolen. tannophilus</i>	Frutal, piña, banana	SSF	Soares 2000
Bagazo de caña de azúcar	<i>Ceratocystis. fimbriata</i>	Frutal	SSF, suplementado con un medio sintético de glucosa, leucina o valina	Christen 1997
Bagazo de yuca, orujo de manzana, amaranto y soja	<i>Ceratocystis. fimbriata</i>	Frutal	SSF	Bramorski 1998
Bagazo de yuca, orujo de manzana, amaranto y soja	<i>Rhizopus oryzae</i>	Frutal	SSF	Christen 2000
Bagazo de yuca, semillas de girasol, ramas de palma	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Frutal	SSF 10% glucosa adicional	Medeiros 2000
Aguas residuales de yuca	<i>Geotrichum fragans</i>	Frutal	SmF	Damasceno 2003

SFF: Fermentación en estado sólido
SmF: Fermentación sumergida

Adicionalmente también se ha evaluado el empleo de residuos como sustratos en la producción de aromas, por medio de procesos de biotransformación, demostrando rendimientos similares o mayores que los obtenidos en los procesos convencionales de biotransformación (Bicas 2010). En la **tabla 1.8**, se resumen algunos de estos estudios.

Tabla 1.8. Producción de aromas por medio de la biotransformación, empleando residuos agroindustriales como medio de cultivo (Bicas 2010).

Residuo/Sustrato	Microorganismo	Precursor	Producto aromático	Referencia
Salvado de cereales o pulpa de remolacha azucarera	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Thibaut 1198
Salvado de arroz	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Zheng 2006
Salvado de maíz	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Lesage 2002
Salvado de trigo	<i>Escherichia coli</i> *	Ácido ferúlico	Vainillina	Di Gioia 2007
Agua residual de yuca	<i>Penicillium</i> sp.	Citronelal	Oxidos <i>cis</i> y <i>trans</i> de rosas	Maróstica 2006
Agua residual de yuca	<i>Fusarium oxysporum</i>	Limoneno de pieles de naranja	α -Terpineol	Maróstica 2007b

* Cepa modificada genéticamente con genes feruloyl-SCoA sintetasa y feruloyl-SCoA hidratasa/aldolasa de *Pseudomonas fluorescens*

Como se observa, el empleo de residuos agroalimentarios, en procesos biotecnológicos, que integran la obtención y extracción de aromas, se convierte en una alternativa con potencial para revalorizar los subproductos, disminuyendo considerablemente la cantidad de éstos que termina en los vertederos y permitiendo a su vez llevar a cabo procesos sostenibles mediante técnicas que respetan el medio ambiente.

Como resultado, surge la necesidad de evaluar el potencial que tienen los diferentes tipos de residuos agroindustriales, así como la necesidad de conocer la variedad microbiológica y los posibles microorganismos presentes en éstos y su capacidad para producir o biotransformar sustratos extraídos o presentes en los residuos e incluso evaluar la capacidad que estos puedan presentar para liberar compuestos presentes.

1.2.4. Métodos de análisis e identificación de aromas

1.2.4.1 Análisis mediante la extracción en fase sólida

Una de las técnicas principales empleadas en el análisis de aromas, consiste en la absorción rápida y sin disolventes que se basan en la división de los compuestos orgánicos entre la fase acuosa o de vapor y fibras o películas

poliméricas delgadas, que pueden ser polares al estar recubiertas de poliacrilato polar (PA), no polares de polidimetilsiloxano (PDMS) o mixtas de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB). Estas fibras son expuestas a las muestras durante un corto periodo de tiempo y posteriormente son analizadas, de forma que, se obtiene el perfil aromático de la muestra. Dentro de estas técnicas se incluyen las extracciones sorptivas del espacio de cabeza (HSSE), extracciones sorptivas con barra de agitación (SBSE) y microextracción en fase sólida (SPME) (Da Costa 2004). Especialmente esta última es una de las más empleadas en la identificación de aromas.

En la extracción por SPME, la fibra empleada está elaborada con sílice fundida, es de 1 o 2 cm de longitud y está recubierta generalmente de PDMS. La fibra está contenida dentro de una aguja, que se coloca en un soporte SPME para fines de muestreo y desorción. La muestra se coloca en un vial de SPME y se sella. La fibra se introduce (a través de la aguja) en el espacio superior de la muestra o puede sumergirse en muestras líquidas. Después de un tiempo de muestreo fijo, en el que los volátiles se absorben en el revestimiento de la fibra, esta se retira y se desorbe directamente en un GC o CG-MS, en la **figura 1.12** se observa el proceso de extracción. La fibra SPME se reacondiciona calentando en un puerto de inyección GC durante 5–15 min. Las condiciones óptimas de extracción como el tiempo de exposición, la temperatura etc., varían de acuerdo con las muestras analizadas, no obstante, una vez controlados estos parámetros los resultados obtenidos son reproducibles. (Yang 2013, Da Costa 2004).

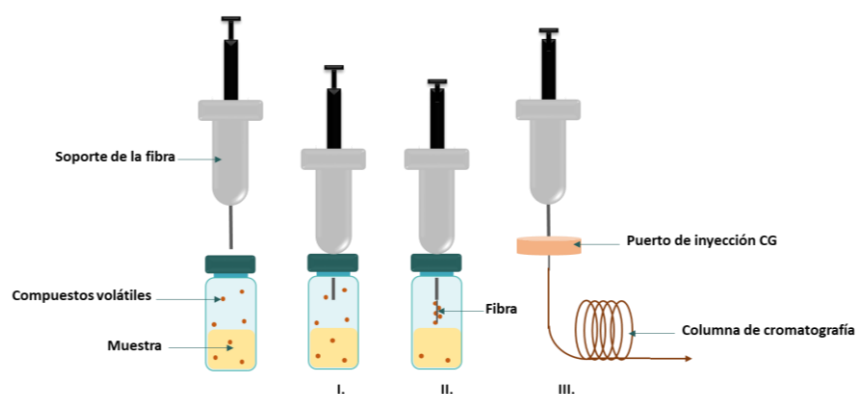


Figura 1.12. Esquema general de extracción mediante SPME. I. Inserción del soporte de la fibra en el vial. II. Muestreo y absorción de compuestos volátiles. III. Desorción directa de los compuestos volátiles de la fibra por CG.

Dentro de las principales ventajas que tiene este método se encuentra la rapidez y la facilidad en el análisis y la ausencia de disolventes durante el proceso. No obstante, es un método que permite obtener información del tipo cualitativo, ya que la cuantificación se hace más engorrosa (Demyttenaere 2004), lo que la convierte en una técnica de cribado bastante eficiente.

1.2.4.2 Técnicas de identificación

La técnica de instrumentación más utilizada para la caracterización de compuestos de interés en la industria de aromas y fragancias, es la cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) (Shibamoto 1984; Mussinan 1993; Takeoka 1985; Busch 1985; Gilbert 1987), ya que gracias a la combinación de estas dos técnicas, se hace posible, por un lado separar las mezclas complejas de los compuestos de interés, además de su cuantificación y por otro lado permite la identificación de los mismos, mediante el cálculo de índices de retención (Da Costa 2004).

Se entiende por índice de retención a el valor obtenido por una interpolación (en general, logarítmica), que relaciona el tiempo de retención ajustado o el factor de retención de un compuesto, con los tiempos ajustados de retención de dos patrones que se eluyen antes y después del pico del compuesto. Existen principalmente dos tipos de índices, el índice de retención de Kováts, desarrollado para régimen isotérmico únicamente y el índice de Van der Dool y Kratz desarrollado para condiciones de programación lineal (Acevedo 2010; SECYTA 2020). Estos índices están disponibles para columnas polares y no polares, y pueden ser consultados en distintas librerías, como por ejemplo NIST: National Institute of Standards and Technology (Mussinan 1993).

Otra de las técnicas disponibles, es la cromatografía de gases acoplada a un detector de ionizador de llama (CG-FID), que presenta un amplio rango de respuesta de cuantificación frente a la CG-MS para analizar compuestos que dan una baja fragmentación, como por ejemplo los anillos aromáticos entre otros. Es por tanto una técnica que a menudo es empleada de forma simultánea con la CG-MS, permitiendo obtener una mayor información, cuantificación y caracterización de los compuestos presentes en una matriz (Da Costa 2004).

Finalmente, se emplean técnicas como, espectroscopía infrarroja (IR) para obtener información sobre grupos funcionales, isómeros etc. que puedan estar presente en algunos compuestos y la resonancia magnética nuclear de

carbono e hidrogeno (^{13}C RMN y ^1H RMN respectivamente), para conocer el número y las posiciones de los átomos de carbono e hidrógeno en las moléculas analizadas (Kubeczka 1984; Herres 1984; Idstein 1985; Schomburg 1984).

2. Objetivos

El objetivo principal de la presente tesis fue el empleo de residuos agroalimentarios como fuente para la extracción y biotransformación de terpenos para la obtención de compuestos con aplicaciones en aromas y fragancias.

Los objetivos específicos fueron:

1. Selección de fuentes alternativas de aromas mediante la extracción de compuestos terpénicos de residuos agroalimentarios.
2. Aislamiento de microorganismos de los residuos agroalimentarios y selección de aquellos con potencial para producir aromas.
3. Preparación de medios de cultivo a partir de residuos agroalimentarios.
4. Aplicación de los conocimientos adquiridos en los objetivos anteriores en la biotransformación de sustratos para la obtención de aromas.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Residuos

Los residuos agroalimentarios fueron enviados por empresas de la zona (Lleida, España). La recepción de estos, se vio condicionada por las fechas de temporada de las frutas y verduras de los que provenían, por lo que se fueron recibiendo en diferentes épocas del año. Los residuos húmedos fueron recibidos durante el primer semestre del 2016 y los residuos secos entre abril y junio del 2017.

Por un lado, se recibieron residuos húmedos de fibras de fresa, puré de pepino, tomate entero y en puré, corazones y hojas de alcachofa, cortes de champiñón, limón entero y mandarina. Por otro lado, residuos secos de alcachofa y residuos secos de mandarina.

Cabe mencionar que durante tres periodos consecutivos se recibieron tres grupos distintos de residuos de mandarina. El primer lote de residuos fue recibido en el 2016 y correspondió a una muestra húmeda y homogénea que se asemejaba a un puré (M-2016). El segundo lote se recibió en el 2017 y se trató de un polvo seco, fino y homogéneo (M-2017). Finalmente, en el 2018 se recibió una mezcla de pieles casi enteras, semillas y parte de endocarpio (M-2018).

Todos los residuos húmedos se mantuvieron almacenados a 4°C y los residuos secos se mantuvieron a temperatura ambiente.

3.1.1. Patrones y reactivos

Terpenos: limoneno (96%), α -terpineol (90%), α -pineno (96%), carvona (98%), terpinen-4-ol (95%) y β -pineno (97%) fueron adquiridos en Sigma Aldrich (Buchs, Suiza). Geraniol (59-61%), *cis*- β -ocimeno (69%), *cis*-nerodiol (54-64%), *trans*-nerodiol (44%), canfeno (95%), (felandreno (85%), mirceno (85%), *p*-cimeno (98%) y linalool (96%) fueron amablemente suministrados por el GRUPO CARINSA (Sant Quirzè del Vallès, España).

Disolventes: todos los disolventes empleados fueron de grado analítico. n-Hexano, dietil éter y acetona fueron adquiridos en Fisher Chemicals (Madrid, España). Etanol adquirido en Merck (Darmstadt, Alemania), cloroformo deuterado CDCl₃ de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), ciclopentil metil

éter proveído amablemente por Zeon (Tokio, Japón), tridecano (99+%) de Acros Organics (Pittsburgh, PA, USA).

CO₂ obtenido de Messer Iberica de Gases S.A (Tarragona, Spain).

Sales: sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) adquirido en Acros Organics (Pittsburgh, PA, USA) y bicarbonato de sodio (NaHCO₃) de Panreac (Barcelona, Spain).

Ácidos y bases: ácido clorhídrico 1M adquirido en Merck (Darmstadt, Alemania), ácido cítrico (99%) e hidróxido de sodio (NaOH) de Acros Organics (Pittsburgh, PA, USA).

Enzimas: Celulasa de *Trichoderma sp.* (Cel-SA) adquirida en Biocon (Les Franqueses del Vallès, Barcelona), pectinasa de *Aspergillus niger* (Pec-SA) adquirida en Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), Celulasa de *Trichoderma sp.* y pectinasa de Endogalacturonasa (CelPec-ID) amablemente suministradas por INDULLEIDA.

Medios de cultivo, conteo de esporas y aislamiento de microorganismos: extracto de malta no animal y peptona bacteriológica BLOKAR adquiridas en Biosel (Barcelona, España), agar técnico para microbiología y Tween 80[®] adquiridos en Panreac (Barcelona, Spain), glucosa de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). El agua fue purificada en un sistema Milli-Q adquirido en Millipore (Bedford, MA, USA).

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterización de los residuos

3.2.1.1 Porcentaje de humedad

Se llevó a cabo por medio del método convencional de desecación por estufa descrito según Nollet, 1996 en las instalaciones del grupo de investigación DBA.

3.2.1.2 Propiedades fisicoquímicas

Se determinó el porcentaje de materia orgánica, proteína bruta (Kjedahl), contenido graso (Soxhlet), caracterización mineral (ICP-OES), hidratos de carbono (HPLC) y análisis del perfil de aminoácidos (HPLC), para los residuos de mandarina secos (M-2017) y de los residuos de alcachofa secos. Estos

datos fueron suministrados por INDULLEIDA y Conservas Azagresa, quienes dentro del proyecto se encargaron de realizar los protocolos necesarios.

3.2.2. Extracción de aromas a partir de los residuos agroalimentarios

Teniendo en cuenta la naturaleza, tipo y origen de cada residuo se realizó la extracción de terpenos de cada uno de estos mediante distintas técnicas. Por un lado, se realizaron los procesos a escala laboratorio y posteriormente algunos de ellos fueron escalados.

En el esquema de la **figura 3.1**, se indican los procesos llevados a cabo para cada tipo de residuo a escala laboratorio.

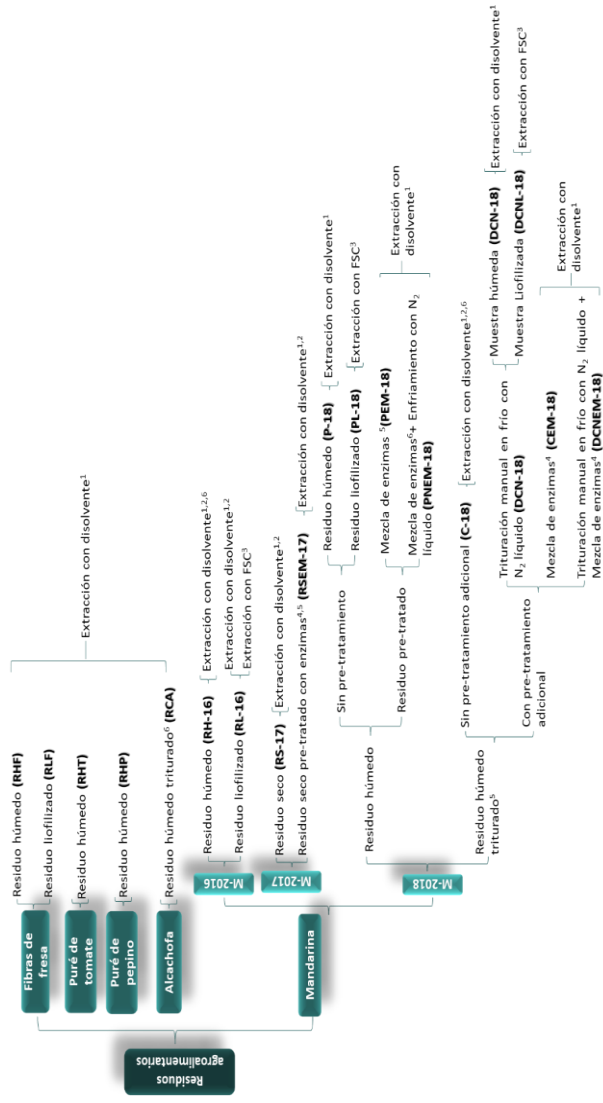


Figura 3.1. Esquema general de los diferentes procesos aplicados sobre los tipos de residuo de mandarina empleados, para la extracción de aromas a escala laboratorio. ¹ Mezcla hexano/dietil éter 9:1 con 10,20 ppm de tridecano hex/dec 9:1); ² Ciclopentil metiléter (CPME); ³ Fluidos supercríticos; ⁴ Mezcla de enzimas celulasa ID y pectinasa ID (CelPeCID); ⁵Trituración mecánica; ⁶ Hex/dec 9:1 en escala pre-piloto, empleando un reactor de 2L de capacidad.

3.2.2.1. Estimación inicial del contenido de terpenos presentes en de los residuos agroalimentarios

3.2.2.1.1 Muestras húmedas

Se empleó una mezcla de hexano/dietil éter 9:1, seleccionada de acuerdo con la selección. Para esto, se emplearon aproximadamente 10 g de cada residuo y 7 mL de la mezcla de disolvente con una concentración de patrón interno de 10.20 ppm de tridecano. Las muestras se agitaron en vortex durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron a una temperatura de 4°C, durante 10 min a 3000 rpm. Seguidamente se separó la fracción orgánica, a la cual se le agregaron aproximadamente 0,5 g de Na₂SO₄ anhidro.

3.2.2.1.2 Muestras Liofilizadas

Empleando un equipo Telstar LyoQuest se liofilizaron durante 72 horas, entre 40 y 80 g de cada residuo agroalimentario. Las muestras liofilizadas se homogenizaron con un mortero de forma manual.

Para la extracción de los terpenos se tomaron 2g aproximadamente de cada residuo liofilizado y homogenizado, y se agitaron durante 1 h con 25 mL de una mezcla de hexano/dietil éter 9:1 con una concentración de 10.20 ppm de tridecano. Pasado el periodo de agitación, cada muestra se centrifugo a una temperatura de 4°C, a 3000 rpm durante 20 min. La fracción orgánica fue separada y sobre esta se adicionaron 0,5 g de Na₂SO₄ anhidro. Cabe mencionar que este procedimiento se repitió para cada muestra de forma consecutiva y que cada fracción orgánica resultante se analizó por separado por técnicas cromatográficas, empleando el método de patrón interno. cada ensayo se realizó por triplicado.

3.2.2.2 Extracción de terpenos de residuos de mandarina

Teniendo en cuenta los tres tipos diferentes de residuos de mandarina recibidos durante el proyecto, se realizaron diferentes procesos de extracción, que incluyeron en algunos casos pre-tratamientos físicos, enzimáticos o una combinación de los dos tal y como se indica en el esquema de la figura 3.1.

3.2.2.2.1 Muestra húmeda:

Se emplearon entre 4.5-5 g de residuo húmedo de mandarina y se comparó la capacidad de extracción de dos disolventes distintos. Por un lado, una mezcla de hexano/dietil éter (HEX/DEE) 9:1 y, por otro lado, ciclopentil metil éter (CPME), en ambos casos con una concentración de patrón interno de 10.20 ppm de tridecano. El volumen de disolvente empleado estuvo entre

10-15 mL, la agitación de la muestra con el disolvente se llevó a cabo mediante vórtex por un periodo de tiempo de dos horas. Para cada muestra se realizaron dos extracciones consecutivas. Pasado el tiempo de cada extracción, la separación de cada una de las fracciones orgánicas se llevó a cabo por centrifugación a una temperatura de 4°C, a 3000 rpm durante 20 min. Las fracciones orgánicas resultantes de las extracciones consecutivas para cada muestra, se unieron y se analizaron conjuntamente, adicionalmente se les agregó una pequeña cantidad de Na₂SO₄ anhidro. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

3.2.2.2 Muestra seca:

Se emplearon aproximadamente 1.5 g de muestra de residuo seco de mandarina y se realizó la extracción de la misma forma en la que se llevó a cabo para los residuos húmedos de mandarina. Los ensayos se hicieron por duplicado.

3.2.2.3 Muestra liofilizada:

3.2.2.3.1 Extracción con disolventes

Se utilizaron 2 g de los residuos de mandarina M-2016, previamente liofilizados y homogenizados, mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1.2.2. Durante la extracción se evaluó la capacidad de extracción de dos disolventes, hexano/dietil éter 9:1 y ciclopentil metil éter, en ambos casos con una concentración de patrón interno de 10.20 ppm de tridecano. Se realizaron dos extracciones consecutivas para cada muestra, en cada una se emplearon 10 mL de disolvente. La agitación se llevó a cabo en vórtex y el tiempo empleado fue de 2 h para cada extracción. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 1800 rpm y 4°C durante 10 min. Las fracciones orgánicas resultantes de las extracciones consecutivas para cada muestra, se unieron y se analizaron conjuntamente, adicionalmente se les agregó una pequeña cantidad de Na₂SO₄ anhidro. Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.2.2.3.2 Extracción por fluidos supercríticos

La metodología empleada para la extracción de los terpenos en las muestras liofilizadas de mandarina se llevó a cabo en tres etapas.

La primera de ellas consistió en la selección y aplicación del diseño experimental. En este caso se escogió el diseño de Box-Behnken teniendo en cuenta los rangos de factores o variables independientes y sus respectivos niveles experimentales para temperatura, presión y tiempo de extracción.

Cabe resaltar que este método fue seleccionado de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, siendo el que más se ajustaba al caso (Khajeh 2012).

En la **tabla 3.1** se indican los intervalos de los factores con sus respectivos códigos dentro del diseño experimental.

Tabla 3.1. Intervalo de factores con sus respectivos valores y códigos para el diseño experimental de Box - Behnken

Símbolo	Factor	Código		
		-1	0	+1
X ₁	T Temperatura (°C)	40	45	55
X ₂	P Presión (bar)	250	300	350
X ₃	t Tiempo (min)	15	20	30

La segunda fase consistió en el análisis de superficie de respuesta por medio del software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVIII, a partir de los resultados conseguidos en cada una de las extracciones correspondientes a los 15 ensayos realizados de acuerdo al diseño experimental seleccionado. De esta etapa se obtuvieron en total tres modelos con las condiciones óptimas de extracción de limoneno, α -terpineol y rendimiento de aceite esencial. En la **tabla 3.2** se indican las variables independientes y sus respectivos valores para cada experimento.

Tabla 3.2. Variables independientes de cada corrida del diseño Box-Behnken para cada uno de los factores.

Ensayo	Temperatura		Presión		Tiempo	
	X ₁	°C	X ₂	bar	X ₃	min
1	-1	40	-1	250	0	20
2	1	55	-1	250	0	20
3	-1	40	1	350	0	20
4	1	55	1	350	0	20
5	-1	40	0	300	-1	15
6	1	55	0	300	-1	15
7	-1	40	0	300	1	30
8	1	55	0	300	1	30
9	0	45	-1	250	-1	15
10	0	45	1	350	-1	15
11	0	45	-1	250	1	30
12	0	45	1	350	1	30
13	0	45	0	300	0	20
14	0	45	0	300	0	20
15	0	45	0	300	0	20

La tercera y última fase consistió en la aplicación de las condiciones optimizadas en otros ensayos de extracción, usando los modelos de superficie de respuesta obtenidos. En total se realizaron cinco, cada uno por duplicado.

Para los ensayos 1, 2 y 3, se emplearon residuos de mandarina liofilizados y homogenizados (RH-16) según el protocolo descrito en el apartado 3.2.1.2.2. Los modelos aplicados correspondieron a las condiciones óptimas obtenidas para la extracción de α -terpineol, limoneno y rendimiento de aceite esencial, respectivamente.

Para los ensayos 4 y 5, se emplearon residuos de mandarina del lote M-2018. Los modelos aplicados en ambos casos correspondieron a la extracción de limoneno. En la muestra del ensayo 4, los residuos fueron sometidos a trituración mecánica, empleando una licuadora de mano y posteriormente se realizó una segunda trituración manual en frío, empleando nitrógeno líquido (DCNL18), tras estos procedimientos se realizó la liofilización. En la muestra del ensayo 5, los residuos del lote M-2018 fueron liofilizados y posteriormente homogenizados (PL-18) empleando un molino.

Todos los ensayos, tanto del diseño experimental, como de optimización, se llevaron a cabo en un equipo AP-7071 Spe-ed FSC-2 240 Vac de Teknokroma.

Las cantidades de residuo empleadas, estuvieron condicionadas por el tamaño de celda y estuvieron ente 1,5-2,5 g.

El procedimiento general de extracción mediante esta técnica, consistió en introducir en una celda de extracción los residuos liofilizados junto con una mezcla de arena para permitir el paso del fluido, como se demuestra en la **figura 3.2**. Posteriormente la celda fue puesta dentro del equipo y tras una estabilización manual de la presión, la temperatura de extracción y la temperatura de refrigeración de aire, se hizo pasar el CO₂ supercrítico por la muestra, durante 5 minutos. Posteriormente se realizó la apertura de la válvula de salida y se mantuvo el flujo de extracción constante. El tiempo de flujo se midió de forma manual. Los extractos fueron recogidos en viales de vidrio previamente tarados. Seguidamente se pesaron con las muestras extraídas y con la diferencia de masa, se estimó el rendimiento de la extracción. Finalmente se adicionó a cada vial 5 mL de una mezcla de hexano/dietil éter 9:1 con una concentración de patrón interno de 10.20 ppm de tridecano para su posterior análisis mediante técnicas cromatográficas (CG-MS y CG-FID).

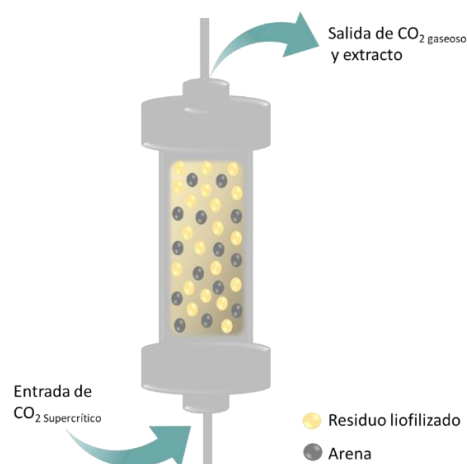


Figura 3.2. Distribución de la mezcla de residuo liofilizado y arena dentro de la celda de extracción de fluidos supercríticos.

3.2.2.2.4 Muestra pre-tratada

3.2.2.2.4.1 Sobre muestra seca

Pre-tratamiento enzimático: Se empleó 1.5 g de residuo seco de mandarina y se evaluó un grupo de dos tipos de enzimas celulasa ID y pectinasa ID (CelPec-ID) a dos concentraciones 5 y 10% respecto a la masa de residuo empleada, de forma que, la cantidad de masa de enzima total adicionada mantuviese el porcentaje deseado, con respecto a la masa del residuo. Los dos enzimas se emplearon conjuntamente sobre la misma muestra, dado que el rango de pH óptimo para cada uno de estos coincidía (pH 5). Para esto se empleó un volumen de 60 mL de una disolución tamponada de pH 5 sobre cada muestra, la cual fue preparada a partir de ácido cítrico 0,1 M y NaOH 1M. En cuanto al tiempo de hidrólisis, se valoraron dos tiempos, 3 y 5 horas. Pasado el proceso de hidrólisis, se llevó a cabo la extracción, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el ensayo anterior. Cabe mencionar que al igual que en caso anterior, todos los ensayos se realizaron por duplicado y que los extractos fueron analizados mediante técnicas cromatográficas. Adicionalmente las fracciones orgánicas obtenidas de los dos procesos consecutivos de extracción, tanto en el primer ensayo, como en el segundo, se analizaron conjuntamente para cada muestra.

3.2.2.2.4.2 Sobre muestra húmeda

Se realizaron tratamientos enzimáticos y físicos y una combinación entre estos sobre la muestra húmeda de mandarina y se evaluó adicionalmente el tiempo de extracción tal y como se indica en la figura 3.1.

Pre-tratamientos físicos: Dentro de los pre-tratamientos físicos se evaluó por un lado el efecto del enfriamiento de los residuos previamente al proceso de extracción., y por otro lado el efecto de la homogenización de los residuos mediante trituración mecánica y un proceso doble de trituración, empleando tanto trituración mecánica, como trituración manual en frío.

Para el enfriamiento de los residuos se empleó nitrógeno líquido, el cual se dejó caer lentamente sobre estos hasta cubrirlos totalmente y una vez evaporado el nitrógeno, se procedió con la extracción.

En el caso de la homogenización, se realizó por un lado una trituración mecánica del residuo, empleando una licuadora de mano hasta que se obtuvo una pasta homogénea. En cuanto al proceso doble de trituración, este se llevó a cabo sobre muestra homogenizada mediante trituración mecánica, la cual fue introducida en un mortero de cerámica, sobre el cual

de forma simultanea se iba dejando caer lentamente nitrógeno líquido y se iba realizando una trituration manual, hasta la obtención de un polvo fino.

Pre-tratamiento enzimático: Se emplearon entre 2.5 y 4 g de residuo húmedo de mandarina. Sobre estos se adicionó una mezcla de dos enzimas: celulasa y pectinasa ID, manteniendo la relación con la masa del residuo en un 10%, es decir, la cantidad de enzima correspondiente a un 5% de la masa de residuo para cada una. El proceso de hidrolisis con enzimas se llevó a cabo por un periodo de 3 h, a 55°C y se empleó una disolución tamponada preparada a partir de ácido cítrico 0,1 M y NaOH 1M de pH a 5,0.

En cada uno de los casos se realizaron dos extracciones consecutivas de cada muestra, empleando 25 mL y 30 mL respectivamente, de una mezcla de hexano/dietil éter 9:1 con 10,20 ppm de tridecano como patrón interno. En las muestras con previa trituration mecánica se evaluó el impacto del tiempo de agitación, en estos casos las primeras extracciones se hicieron por un tiempo de 4 h y 2 h y las segundas extracciones por un tiempo de 2 h y 1 h respectivamente. En el caso de las muestras sin ningún tipo de pre-tratamiento las extracciones se realizaron empleando 2 h en la primera fase y 1h en la última. En todos los casos se agitaron las muestras a 300 rpm a temperatura ambiente y la separación de las fases orgánicas respectivas se realizó mediante centrifugado a 6000 rpm, durante 5 min a 10 °C. Los extractos de cada extracción se analizaron por separado. Los ensayos se hicieron por duplicado.

Cabe resaltar que los pre-tratamientos enzimáticos se llevaron a cabo en sistemas cerrados, previniendo la pérdida de volátiles.

3.2.2.3. Escalado pre-piloto de extracción de terpenos

3.2.2.3.1 Muestra húmeda

Durante el escalado pre-piloto se empleó un reactor de vidrio con una capacidad de 2L. El sistema de agitación se realizó usando una varilla que permitió simular el efecto vórtex, los dos de la casa comercial Grupo Selecta. La cantidad de residuo de mandarina húmedo empleado fue de aproximadamente 350 g, el cual se dejó en agitación dentro del reactor con un volumen de aproximadamente 800 mL de una mezcla de disolvente hexano/dietil éter 9:1 con 10.20 ppm de tridecano. Se realizaron tres extracciones consecutivas cada 24 horas, cambiando el disolvente manteniendo un volumen constante. Cada extracto se almacenó a -80 °C para su posterior análisis.

3.2.2.3.2 Muestra húmeda pre-tratada

En este ensayo se empleó el mismo equipo, el mismo procedimiento y las mismas condiciones de extracción y almacenamiento de los extractos, descritos en el apartado anterior. Sin embargo, en este caso los 350 g de residuo húmedo de mandarina fueron triturados empleando una licuadora de mano de la forma que se describió en el apartado 3.2.1.2.4.1 previamente al proceso de extracción. En el esquema de la **figura 3.3** se observa el procedimiento.

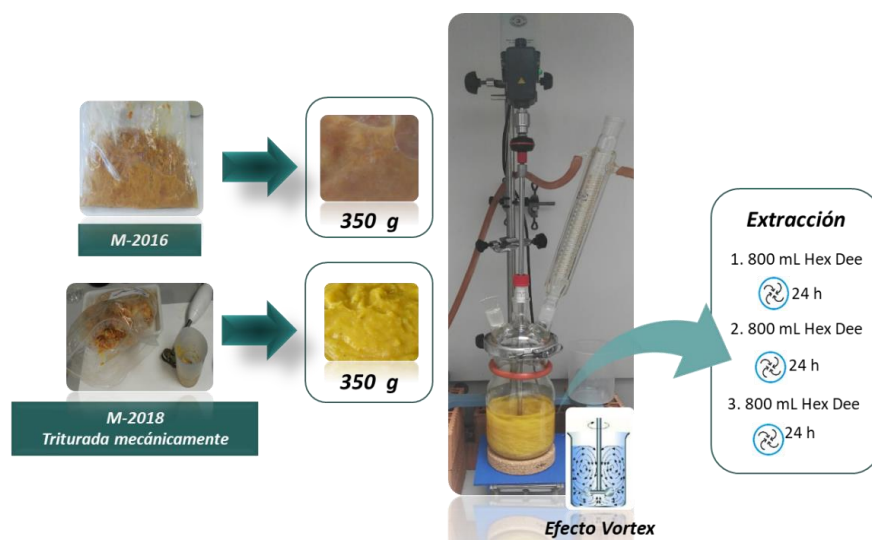


Figura 3.3. Sistema de extracción de compuestos volátiles de los residuos de mandarina M-2016 y M2018 triturados mecánicamente. Empleando un reactor de 2L de capacidad y sistema de agitación.

3.2.2.3.3 Concentración de los extractos y obtención de aceite esencial

3.2.2.3.3.1 Destilación del disolvente

Tras el proceso de extracción pre-piloto, se seleccionaron los extractos que contenían una mayor cantidad de limoneno de las dos primeras extracciones realizadas con los residuos de mandarina M-2016 y M-2018 triturados mecánicamente). En total se partió de un volumen de aproximadamente 3 L de disolvente. Con ese volumen se realizó una primera concentración del extracto, empleando un destilador de gran capacidad, como se indica en la **figura 3.4**. Sobre el balón de 2 L de capacidad, se fueron adicionando poco a poco los extractos durante 6 h y como resultado final se obtuvieron

aproximadamente 150 mL de fracción concentrada. La temperatura de destilación se mantuvo alrededor de 60 °C. El disolvente destilado se recuperó y se almaceno para su reutilización.

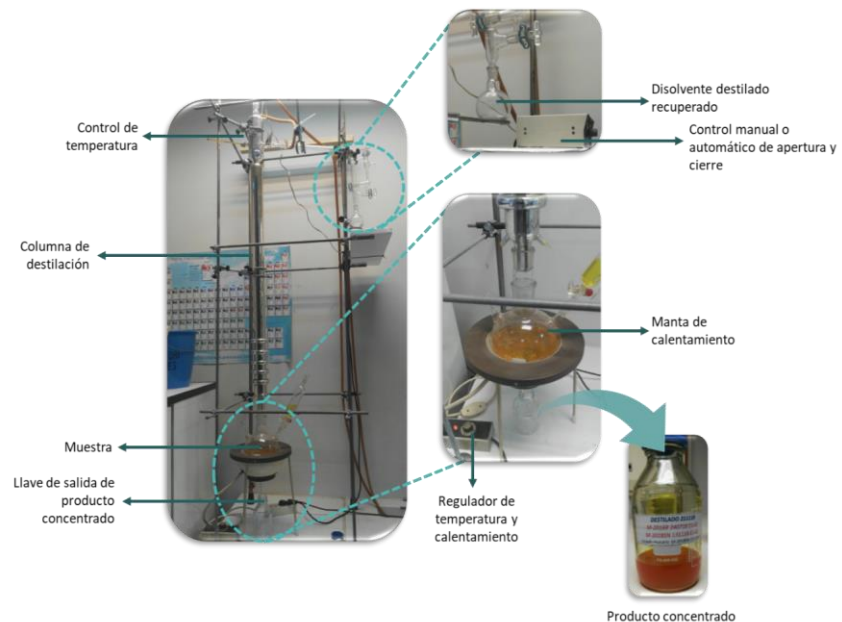


Figura 3.4. Sistema de concentración de los compuestos extraídos, tras los procesos de escalado de los residuos húmedos de mandarina en la primera fase de obtención del concentrado.

La segunda concentración de los 150 mL del extracto obtenido y la obtención del aceite esencial, se realizó en dos fases. Durante la primera se empleó una columna de aproximadamente unos 50 cm de longitud, en un montaje clásico de destilación sin sistema de vacío. El concentrado se introdujo en un matraz de fondo redondo. La temperatura de la plancha de calentamiento se mantuvo a 120 °C. La temperatura alcanzada por la columna se registró en 70 °C. Esta primera fase tardó alrededor de 30 minutos. En la segunda fase se empleó una columna con una longitud menor de aproximadamente 20 cm. Se mantuvo el mismo sistema de la fase 1, el calentamiento de la plancha se mantuvo a 120 °C y la temperatura alcanzada por la columna, al igual que la primera fase, fue de 70 °C. El disolvente restante se separó del extracto en su totalidad a los 5 minutos. El sistema empleado, así como el aceite obtenido se indican en la **figura 3.5.**

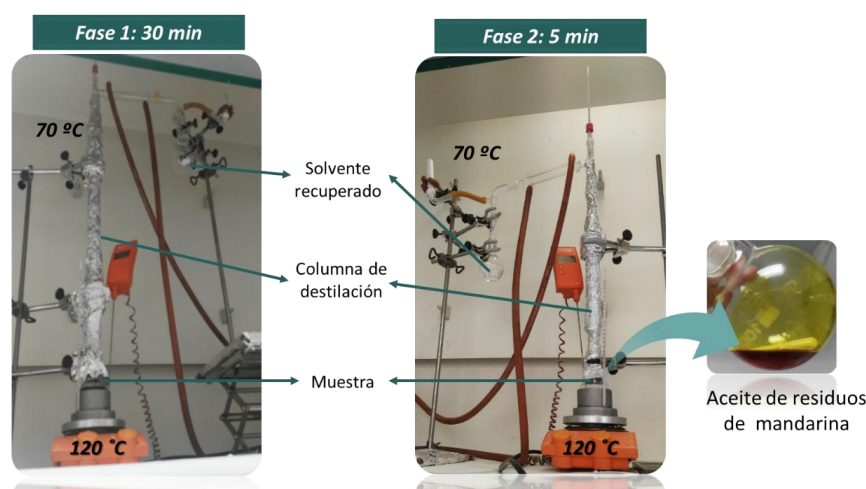


Figura 3.5. Sistema de concentración para la obtención del aceite esencial extraído de los residuos de mandarina en el proceso de escalado pre-piloto, tras la primera concentración del extracto.

3.2.2.3.3.2 Caracterización del aceite esencial obtenido

Se realizó un análisis empleando espectroscopia de resonancia magnética (RMN) con experimentos de análisis de protón y carbono, experimentos de correlación homonuclear (COSY) y de correlación heteronuclear cuántica simple (HSQC), y así mismo, experimentos de espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para la caracterización del aceite esencial obtenido tras los dos procesos de destilación a partir de los residuos de mandarina (DBA-M). De forma simultánea se analizaron, bajo las mismas condiciones, muestras de un aceite esencial de mandarina comercial (CAR-M) y de un patrón de limoneno al 96%.

Espectroscopia de resonancia magnética: En este caso se empleó un equipo MERCURY plus NMR de Spectrometer Systems con un campo magnético residual de 5 Gauss a 0.9 m axiales del centro del imán. El software empleado fue vnmrJ-4.2 y el tratamiento de los datos se realizó con MNova 11.0 por procesamiento y predicción de espectros de RMN de diferentes núcleos.

Para estos análisis se tomaron alrededor de 60 mg de muestra del aceite esencial obtenido en el apartado anterior y se adicionaron 0.7 mL de cloroformo deuterado CDCl_3 .

Análisis de espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier FTIR: Para este análisis se empleó un equipo FT-IR 6300 series de Jasco OP_FETIR FT-IR 6300 series de Jasco y detector MCT. Las muestras se analizaron por reflectancia total atenuada (ATR).

Inicialmente se analizaron pequeñas fracciones de limoneno al 96%, aceite esencial comercial y aceite obtenido tras el proceso de extracción en escalado. Adicionalmente se tomaron 50 µL del aceite esencial extraído a partir de los residuos y se adicionaron 1000 µL de hexano. Posteriormente se inició el lavado con una solución saturada de bicarbonato sódico NaHCO₃ en la misma proporción de disolvente añadido. Se dejó en agitación durante 24 horas y finalmente la parte del hexano fue evaluada por FTIR.

3.2.3. Aislamiento e identificación de los microorganismos de los residuos agroalimentarios

3.2.3.1 Selección de microorganismos

3.2.3.1.1. Aislamiento de los microorganismos

Para el aislamiento de los microorganismos, se emplearon 10 g de cada una de las muestras de residuos. Para las muestras de alcachofa fresca, tomate entero y champiñones, fue necesario emplear una licuadora de mano, previamente tratada con alcohol etílico, hasta la homogenización de los residuos.

En un primer paso, se disolvió una gota de Tween 80 en 1 L de agua destilada. Posteriormente se adicionaron 90 mL de esta disolución en envases de vidrio de 100 mL de capacidad, que posteriormente fueron esterilizados en autoclave. Una vez esterilizadas y enfriadas las disoluciones de Tween, se agregaron a los residuos pesados previamente dentro de bolsas con filtro BagFilter®. Estas bolsas se agitaron durante un minuto en JumboMix® 3500 y el líquido resultante se sembró sobre placas para cultivo en volúmenes de 10 mL como se observa en la **figura 3.6**, empleando un asa de vidrio Digralsky para la distribución uniforme del extracto. Como medio de cultivo se empleó extracto de malta y agar (extracto de malta 2%, peptona 0,1%, agar 1,5% y glucosa 2% y agua destilada 94,4%). En total se sembraron 10 placas de cada uno de los residuos. El aislamiento se realizó empleando un asa de Kolle y sembrando tres puntos equidistantes en placas nuevas de agar extracto de malta hasta comprobar la pureza de las cepas.

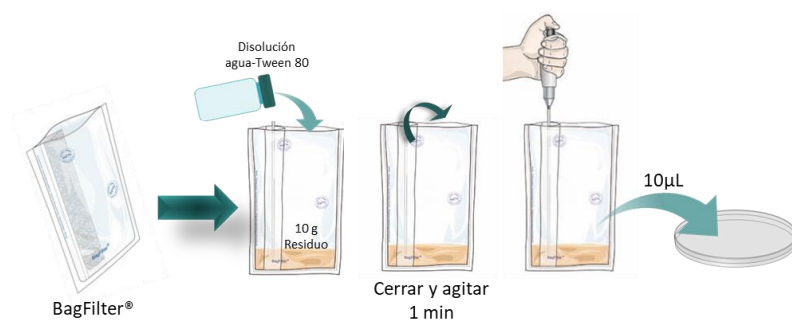


Figura 3.6. Esquema para la homogenización de las muestras, en el proceso de aislamiento de microorganismos, con BagFilter®.

Finalmente, los hongos aislados se sembraron en zig-zag, con un asa de metal de siembra, en tubos de vidrio de 15 mL para su almacenamiento. Se empleó el mismo medio de cultivo que en las placas. En cada tubo se pusieron aproximadamente 8 mL de medio, el cual se dejó solidificar previo a la siembra posterior. Los tubos se incubaron a 28 °C entre 4 y 7 días y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C. Las distintas cepas se resembraron periódicamente.

3.2.3.1.2 Evaluación de la actividad metabólica de los microorganismos aislados

Se sembraron los microorganismos por duplicado en tubos de SPME (solid phase microextraction, **figura 3.7a**) con medio de cultivo agar extracto de malta, para su posterior análisis por CG-MS al cabo de tres y seis días. La extracción de los compuestos volátiles producto del metabolismo de los hongos, se realizó por el método de espacio de cabeza, empleando una fibra PDMS (100 µm, polidimetilsiloxano, baja polaridad, partición).

Inicialmente se pusieron 10 µL de tridecano de 100 ppm empleado como patrón interno, dentro de tubos de SPME vacíos y tapados. La fibra se expuso durante 15 minutos dentro éstos. Tras este tiempo, se expuso la fibra en el espacio de cabeza de los tubos de SPME con los microorganismos cultivados durante tres o seis días, como se muestra en la **figura 3.7 b y c**.

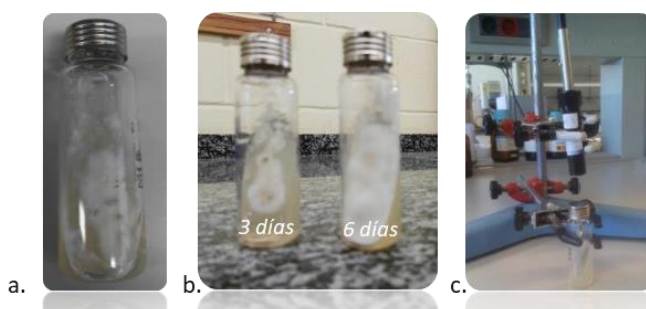


Figura 3.7. a. Tubos de SPME empleados para el estudio de la actividad metabólica de los microorganismos aislados, b. Tubos de SPME a los 3 y 6 días de siembra respectivamente y c. Exposición de la fibra a los compuestos volátiles producto del metabolismo de los microorganismos.

3.2.3.1.3 Identificación de los microorganismos

La identificación de los microorganismos se realizó en la Universidad de León en el Laboratorio de Técnicas instrumentales. Inicialmente se sembraron los microorganismos en placas de agar extracto de malta en tres puntos equidistantes y al cabo de tres días se enviaron a la universidad de León, allí se aisló el ADN de cada hongo y seguidamente se procedió a amplificar la región de interés ITS (Internal Target Spacer o espacios intergénicos) o D1/D2 del gen del ARN 28S. Posteriormente se purificó el amplicón y finalmente se procedió a su secuenciación.

Para la identificación, se introdujeron las secuencias en bases de datos como la del Gen Bank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.2.3.1.4 Evaluación de toxinas producidas por los microorganismos identificados

Se evaluó la presencia de aflatoxinas y fumonisinas para las especies *Aspergillus*, fumonisinas y ocratoxinas para la cepa *A. niger* y un screening de aflatoxinas, fumonisinas y ocratoxinas para las cepas de *A. nidulans* y *G. citri-aurantii*. Para esto se activaron los microorganismos en placas elaboradas con agar y extracto de malta durante siete días. Posteriormente se cortaron cinco discos de 8mm de diámetro, empleado un sacabocados previamente esterilizado y se pasaron a viales de 6 mL de capacidad que contenían 1 mL de metanol. Los viales se llevaron a agitación en vórtex durante 5 minutos y se dejaron en reposo durante 1h. Pasado este tiempo las muestras se

pasaron por un filtro de membrana de politetrafluoroetileno 0.22 μ L, 13 mm (PTFE). Los extractos obtenidos se analizaron por HPLC de acuerdo con los parámetros establecidos por Jerome 2018 y Berestetskiy 2019.

3.2.4. Preparación de medios de cultivo a partir de residuos

Utilizando como referencia el medio de cultivo convencional, preparado con extracto de malta y agar, se prepararon medios sustituyendo total o parcialmente el extracto de malta por residuos secos de alcachofa o mandarina y residuos secos de mandarina pre-tratados enzimáticamente. En todos los casos, se ajustó el pH final a 5,5. Para la evaluación del crecimiento de los microorganismos en los diferentes medios de cultivo elaborados, se emplearon cinco cepas previamente almacenadas en refrigeración: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* y *Geotrichum citri-aurantii*. En todos los casos, la siembra de los microorganismos se realizó en tres puntos equidistantes. Las muestras se incubaron a 28 °C y se realizó un seguimiento del crecimiento a los 3, 5 y 7 días. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado.

3.2.4.1 Extracto de malta

Este medio de cultivo se preparó con extracto de malta 2%, peptona 0,1%, agar 1,5% y glucosa 2% y agua 94,4%. Los microorganismos se sembraron en tres puntos equidistantes y se evaluó su crecimiento a los tres, cinco y siete días. Estas muestras se tomaron como muestras control en cada uno de los ensayos al emplear los residuos agroalimentarios.

3.2.4.2 Residuos secos de mandarina y alcachofa

Para cada uno de estos residuos se ensayaron 4 alternativas diferentes, variando la composición del medio, es decir variando las cantidades de cada uno de los componentes como se muestra en la **tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Porcentajes de cada uno de los componentes empleados para cada alternativa de medio preparado a partir de residuos secos de mandarina y alcachofa.

	Alternativa	Residuo	Glucosa	EMA	Peptona	Agar	Agua
Residuo seco	1	2	2	*	0.1	1.5	94.4
	2	1	2	1	0.1	1.5	94.4
	3	0.5	2	1.5	0.1	1.5	94.4
	4	2	*	*	0.1	1.5	96.4
Muestras control¹	5	*	2	2	0.1	1.5	94.4

¹Medio preparado con extracto de malta.

Una vez obtenidas las muestras de cada alternativa, se pasaron a placas para su posterior empleo en la siembra de los microorganismos.

3.2.4.3 Residuo seco de mandarina pre-tratado

Dada la presencia de pectina en los residuos secos de mandarina, se realizó un pretratamiento enzimático, sobre 1,5 g de residuo. Se evaluaron dos grupos de enzimas. Un primer grupo conformado por celulasa SA y pectinasa SA (Cel-SA y Pec-SA) y un segundo grupo de celulasa y pectinasa ID (CelPec-ID).

Para cada grupo de enzimas, se evaluaron dos concentraciones 5 y 10% respecto a la cantidad de residuo. Cabe resaltar que debido a la diferencia de pH óptimo para el grupo de enzimas Cel-SA y Pec-SA (4,7 y 4 respectivamente), el proceso de hidrólisis se tuvo que realizar de forma individual para cada alternativa de medio planteada, a diferencia del grupo de enzimas CelPec-ID, cuyo pH óptimo fue de 5, lo que permitió emplear conjuntamente las dos enzimas sobre la misma alternativa de medio de forma que, la cantidad total de enzima correspondiese a los porcentajes evaluados. El pH en cada caso se controló con disoluciones tamponadas preparadas a partir de ácido cítrico 0,1 M y NaOH 1M., para cada muestra se emplearon alrededor de 60 mL. La temperatura de reacción fue de 55°C. Las condiciones para cada alternativa de medio se indican en la **tabla 3.4.**

Tabla 3.4. Condiciones del tratamiento enzimático aplicado a las muestras de residuos de mandarina en cada una de las alternativas evaluadas.

Enzimas	Alternativa	% Enzima	Tiempo reacción (h)
Cel-SA y Pec-SA	1	5	3
	2	5	5
	3	10	3
	4	10	5
	5	5	24
	6	10	24
CelPec-ID	1	5	3
	2	5	5
	3	10	3
	4	10	5
	5	5	24
	6	10	24

Cel-SA y Pec-SA: Celulasa SA y pectinasa SA; CelPec-ID: Celulasa y pectinasa ID.

Una vez finalizado el tiempo de hidrolisis, las muestras se enfriaron en un baño de hielo y seguidamente se procedió a preparar los medios de cultivo. Para esto se adicionó a cada muestra 2% glucosa, 1,5% de agar y 0,1% de peptona, la proporción acuosa correspondió al volumen de disolución tamponada empleada en el proceso de hidrolisis. posteriormente se ajustó el pH a 5,5 y se llevaron las muestras a autoclavado durante 1h a 120 °C. Finalmente, las muestras se pasaron a placas que posteriormente fueron empleadas para la siembra de los microorganismos.

3.2.5. Obtención de aromas a partir de procesos de biotransformación

3.2.5.1 Optimización del protocolo de biotransformación de sustratos

Todos los procesos de biotransformación de sustratos constaron básicamente de cuatro fases, dentro de las cuales fue necesario optimizar algunos aspectos. A continuación, se describirá de forma generalizada el protocolo de biotransformación y los aspectos optimizados para cada una de las fases.

La primera fase consistió en la activación de los microorganismos en placa, para esto, las cepas de microorganismos aisladas de los residuos se sembraron en placas con medio de cultivo sólido y se incubaron a 28 °C durante 7 días. Pasado este tiempo se continuó con la segunda fase, que consistió en la inoculación de los microorganismos crecidos en placas, al medio de cultivo líquido. En esta parte se optimizó el tipo de inoculación, para ello se evaluaron dos mecanismos: por corte de discos de micelio y por conteo y siembra de esporas en suspensión. Desde esta fase hasta el proceso de extracción, las muestras se dejaron en agitación constante a 180 rpm y 28 °C.

Pasados tres días tras la inoculación, se dio inicio a la tercera fase, que consistió en la adición de sustrato cada 24 horas. En total se realizaron tres adiciones. Para esta etapa fue necesario optimizar dos aspectos. Por un lado, el tipo de sistema/reactor empleado y por otro lado el mecanismo de adición del sustrato. 24 horas después de la tercera adición de sustrato, se finalizó el proceso, dando lugar a la cuarta fase correspondiente a la extracción de los metabolitos. En la **figura 3.8** se presenta el esquema general del proceso.

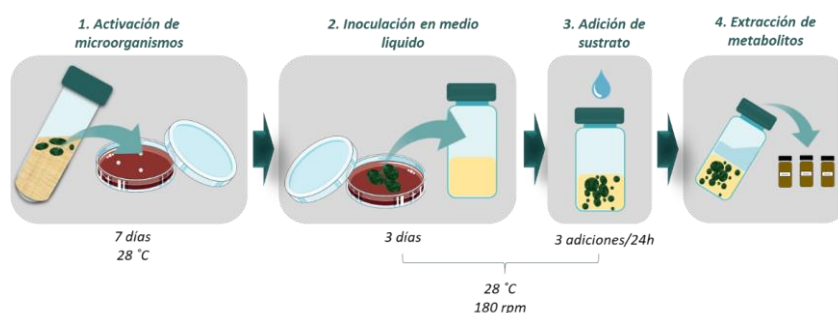


Figura 3.8. Esquema general de las fases del proceso de biotransformación.

3.2.5.1.1. Optimización del tipo de inoculación en medio líquido

3.2.5.1.1.1 Siembra por discos

Todos los microorganismos aislados fueron activados en placas con medios de cultivo elaborado con extracto de malta y agar (ídem 3.2.2.2.1) durante siete días. Posteriormente se cortaron discos de 8mm de diámetro empleando un sacabocados previamente esterilizado, los discos se cortaron sobre las zonas cercanas a los puntos equidistantes sembrados. Finalmente se pasaron al medio líquido con un asa metálica previamente esterilizada. Se sembraron 2 discos por cada 10 mL de medio líquido empleado.

3.2.5.1.1.2 Siembra por esporas

El recuento de esporas, se realizó empleando una cámara de Thoma. Inicialmente se preparó una solución de agua con Tween (Tween 80 al 0,01%). Seguidamente se realizó una suspensión de esporas con ayuda de un asa de siembra de cada microorganismo. Finalmente se realizó el recuento de las esporas con un microscopio. Se sembraron aproximadamente 1×10^6 esporas por cada mililitro de medio líquido empleado.

3.2.5.1.2 Optimización del sistema/ reactor, mecanismo de adición de sustrato, y extracción de los metabolitos

3.2.5.1.2.1 Sistema convencional

En este sistema se realizaron dos ensayos: en el primero de ellos las cepas aisladas y crecidas durante 7 días en placas con medio de extracto de malta sólido, se inocularon tres discos de micelio, en 15 mL de medio de extracto de malta líquido (2% extracto de malta, 2% glucosa, 0.1% peptona y 95.9% agua). Como reactores se emplearon matraces de 50 mL de capacidad, los cuales fueron cerrados con algodón y papel aluminio. Posteriormente se mantuvieron a 28°C y 180 rpm. Tras 72 h de crecimiento del microorganismo en los matraces, se añadieron de forma directa los sustratos (limoneno o β -pineno) de forma que su concentración en el medio fuese del 0,1%. Se realizaron tres adiciones consecutivas cada 24 horas.

En el segundo ensayo se siguió el mismo procedimiento para la activación, siembra e incubación de los microorganismos descritos en el primer ensayo, pero en este caso se prepararon disoluciones al 20% en etanol de cada sustrato. La cantidad de sustrato en etanol adicionada a cada matraz se realizó de tal manera que se mantuviese la concentración de este en 0.1% en el medio de cultivo.

Para la extracción de los metabolitos, se adicionó 7 mL de una mezcla de disolvente hexano/dietil éter 9:1 con 10.20 ppm de tridecano como patrón interno en cada matraz de biotransformación y se agitaron las muestras en vórtex durante 60 minutos. Finalmente se separaron las fases orgánicas por centrifugación por un periodo de 10 min, a una temperatura de 4 °C y 3000 rpm. Sobre cada fracción se adiciono una pequeña cantidad de Na_2SO_4 .

Se incluyó un blanco que contenía el medio de cultivo y el sustrato en ausencia de microorganismo y una muestra control que solo contenía el medio de cultivo en ausencia de microorganismo y sustrato.

3.2.5.1.2.2. Sistema cerrado

La activación de los microorganismos se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado correspondiente al sistema abierto. La inoculación en los medios líquido elaborado con extracto de malta o residuos de alcachofa, se llevó a cabo mediante el conteo de esporas (3.2.5.1.1.2.). En este caso se emplearon reactores de 50 mL de capacidad con tapones de rosca y septum de silicona, protegidos con politetrafluoroetileno (PTFE). Para la adición del sustrato se empleó una jeringuilla de vidrio, de forma que el sistema permaneció cerrado durante los siete días que tardó el proceso. La cantidad de sustrato se añadió de tal manera que se tuviese en cada adición una concentración de 0.34 mg de sustrato por cada mililitro de medio empleado. Pasadas 24 desde la última adición de sustrato, se procedió a realizar la extracción de los metabolitos. Cabe resaltar que se llevaron a cabo dos extracciones consecutivas empleando en cada una, 10 mL de una mezcla de hexano/dietil éter 9:1 con 10.20 ppm de tridecano. Durante la primera extracción, el disolvente fue adicionado con una jeringuilla de vidrio, manteniendo el sistema cerrado y se llevó a agitación durante 2 h a 10 °C y 180 rpm. Finalizando este tiempo, se realizó la separación de la fracción orgánica por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Para la segunda extracción se mantuvieron las condiciones de agitación y centrifugación de la primera. Las dos fracciones obtenidas se analizaron como un solo extracto, sobre el cual se adiciono una pequeña cantidad de Na₂SO₄ y se procedió al análisis cromatográfico.

Al igual que en ensayo del sistema abierto, se incluyó un blanco que contenía el medio de cultivo y el sustrato en ausencia de microorganismo y una muestra control que solo contenía el medio de cultivo en ausencia de microorganismo y sustrato.

3.2.5.2 Evaluación del potencial de biotransformación de los sustratos limoneno y β-pineno por los microorganismos

Tras la optimización de las diferentes condiciones del proceso de biotransformación, se realizó la evaluación del potencial de los microorganismos, para biotransformar los sustratos limoneno y β-pineno. Algunos de estos procesos se llevaron a cabo a escala laboratorio y otros en escala pre-piloto, tal y como se indica en el esquema de la **figura 3.9**.

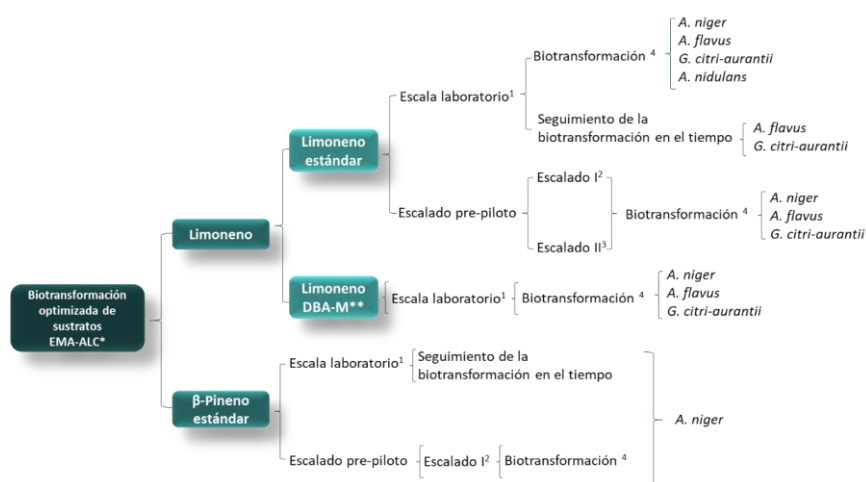


Figura 3.9. Esquema general de los diferentes procesos de biotransformación realizados para evaluar el potencial de los microorganismos para biotransformar los sustratos limoneno y β-pineno. * Ensayos realizados en dos tipos de medio de cultivo. EMA: Extracto de malta y ALC: Residuos de alcachofa. ** Limoneno contenido en el aceite esencial obtenido mediante la extracción en escala pre-piloto de los residuos de mandarina. ¹Reactores de 50 y 100 mL de capacidad; ²Reactores de 250 mL de capacidad; ³Reactores de 1L de capacidad; ⁴Protocolo optimizado.

3.2.5.2.1 Limoneno

3.2.5.2.1.1 Limoneno estándar

3.2.5.2.1.1.1 Biotransformación optimizada

El proceso inició con la activación de los microorganismos *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *G. citri-aurantii* en placas con extracto de malta, de forma simultánea se activaron también, en placas con un medio de cultivo sólido elaborado con residuos secos de alcachofa (residuo seco de alcachofa 2%, peptona 0,1%, agar 1,5%, glucosa 2% y agua 94,4%). Transcurrido este tiempo se inocularon las cepas en los medios líquidos de cultivo respectivos, es decir, elaborados tanto con extracto de malta, como con los residuos (extracto de malta o residuo de alcachofa 2%, peptona 0,1%, agar 1,5% y glucosa 2% y agua 94,4%). En este caso se emplearon reactores con tapones de rosca y septum de silicona protegidos con politetrafluoroetileno (PTFE) de 50 y 100 mL de capacidad total, por lo que la cantidad de medio empleada en cada reactor fue del 30% en relación a su capacidad total. Se empleó el método de discos para el microorganismo *G. citri-aurantii* y el método de

recuento de esporas para los demás microorganismos. Los medios de cultivo líquido se prepararon con extracto de malta o y residuos secos de alcachofa. En cuanto a la adición del sustrato se empleó limoneno estándar al 20% en etanol, de manera que se tuviese en cada una de las tres adiciones una concentración de 0,34 mg/mL de medio. La extracción de los metabolitos, se llevó a cabo de la misma forma que se describió en el apartado anterior correspondiente al sistema cerrado. Simultáneamente se realizaron blancos que contenían el medio de cultivo y el sustrato en ausencia de microorganismo y muestras control que solo contenían el medio de cultivo en ausencia de microorganismo y sustrato. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

3.2.5.2.1.1.2 Seguimiento del proceso de biotransformación del sustrato limoneno en el tiempo

Se emplearon los microorganismos *A. flavus* y *G. citri-aurantii*. Las fases de activación e inoculación en el medio líquido se llevaron a cabo de la misma forma en la que se ha explicado en apartados anteriores. Pasados tres días desde la inoculación, se realizó una única adición del sustrato limoneno al 20% en etanol de tal manera que en cada muestra se mantuviese una concentración de 0,05 mg de limoneno por cada mL de medio empleado (se empleó en este caso limoneno estándar). Cada 90 minutos durante 8 horas se realizó la extracción de los metabolitos y la separación de las respectivas fases orgánicas de la misma forma que se describió en el apartado correspondiente al sistema cerrado. Durante todo el proceso se realizaron blancos que contenían el medio de cultivo y el sustrato en ausencia de microorganismo y una muestra control que solo contenía el medio de cultivo en ausencia de microorganismo y sustrato. Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.2.5.2.1.2 Biotransformación de limoneno obtenido del aceite esencial de mandarina obtenido de los residuos

En este proceso se emplearon los microorganismos *A. flavus*, *A. niger* y *G. citri-aurantii*. Todo el proceso se realizó en reactores de 50 mL de capacidad, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, para la biotransformación de limoneno estándar. Como sustrato, se empleó el limoneno contenido en el aceite esencial obtenido en la extracción de los residuos de mandarina descrito en el apartado 3.2.2.3.3. La preparación del sustrato se llevó a cabo preparando una disolución del aceite al 20% en acetona. La cantidad de sustrato agregada a cada muestra se hizo de tal manera que se tuviese en cada una de las tres adiciones una concentración

de 0,34 mg/mL. La extracción de los metabolitos, se llevó a cabo de la misma forma que se describió en el apartado correspondiente al sistema cerrado. Se incluyó un blanco que contenía el medio de cultivo y el sustrato en ausencia de microorganismo y una muestra control que solo contenía el medio de cultivo en ausencia de microorganismo y sustrato. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

3.2.5.2.2. β -pineno

3.2.5.2.2.1 Seguimiento del proceso de biotransformación del sustrato β -pineno en el tiempo

En este caso se empleó la cepa del microorganismo *A. niger*. La activación de los microorganismos y la inoculación en medio líquido, se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado correspondiente al sistema cerrado 3.2.5.1.2.2. Pasados tres días desde la inoculación, se realizó una única adición de β -pineno estándar al 20% en etanol, el seguimiento del proceso de biotransformación, la extracción y posterior separación de las fracciones orgánicas con los metabolitos resultantes se hizo de acuerdo con lo descrito en el apartado anterior, correspondiente al seguimiento de la biotransformación en el tiempo, para el limoneno estándar. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

3.2.5.3 Escalado pre-piloto del proceso de biotransformación de los sustratos limoneno y β -pineno

3.2.5.3.1 Limoneno

3.2.5.3.1.1 Reactores de 250 mL

En el proceso de escalado se emplearon reactores de 250 mL de capacidad y se siguió el protocolo optimizado para la biotransformación de limoneno estándar utilizando las cepas de *A. flavus*, *A. niger* y *G. citri-aurantii*. Las tres primeras etapas del proceso de biotransformación se llevaron a cabo según las condiciones indicadas en el apartado correspondiente al proceso de biotransformación del limoneno estándar, teniendo en cuenta la variación en las proporciones tanto de cantidad de microorganismo inoculada, así como la cantidad de medio de cultivo líquido empleado en cada reactor y la cantidad de sustrato adicionada. En la etapa correspondiente a la extracción de los metabolitos, se realizaron dos extracciones consecutivas que posteriormente se analizaron como un solo extracto, empleando en cada una

de éstas un volumen de 15 mL de una mezcla de hexano/ dietil éter 9:1 con 10,20 ppm de tridecano. Las muestras se llevaron a un orbital, donde se agitaron por 2 h a 300 rpm. La separación de las respectivas fases orgánicas se llevó a cabo por centrifugación a 10000 rpm durante 5 min a 10 °C y sobre estas se adicioneo una pequeña cantidad de Na₂SO₄. Todas las muestras se hicieron por duplicado.

3.2.5.3.1.2 Reactores de 1L

En este ensayo se emplearon reactores con un volumen de capacidad de 1 L. las cepas empleadas fueron *A. flavus*, *A. niger* y *G. citri-aurantii*. Todo el proceso desde la activación de los microorganismos en placa hasta la adición del sustrato (limoneno estándar), se realizó siguiendo las etapas indicadas en el apartado correspondiente a la biotransformación del limoneno estándar, teniendo en cuenta las proporciones tanto de cantidad de microorganismo inoculada, así como la cantidad de medio de cultivo liquido empleado en cada reactor y la cantidad de sustrato adicionada para este volumen de reactores. En la etapa final se realizaron dos extracciones consecutivas, en la primera de estas se emplearon 100 mL de una mezcla de hexano dietil éter 9:1 con 10,20 ppm de tridecano y en la segunda se utilizaron 50 mL de la mezcla del mismo disolvente junto con 30 mL del extracto obtenido en la primera extracción. Las muestras se llevaron a una agitación en orbital y la separación de las fases orgánicas resultantes se realizó bajo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, correspondiente al escalado en reactores de 250 mL de capacidad.

3.2.5.3.2 β-pineno

3.2.5.3.2.1 Reactores de 250 mL

En el proceso de escalado en reactores de 250 mL de capacidad para la biotransformación del sustrato β-pineno se empleó la cepa *A. niger*. Todo el proceso desde la activación del microorganismo en placas hasta la separación de las fases orgánicas resultantes del proceso de extracción de los metabolitos se realizó siguiendo el mismo procedimiento que se describió en el apartado del escalado en reactores del mismo volumen de capacidad para la biotransformación de limoneno estándar. Como sustrato se empleó β-pineno al 20% en etanol. Todas las muestras se hicieron por duplicado.

3.2.6. Seguimiento del contenido de terpenos

3.2.6.1 GC-MS y CG-FID

La identificación y posterior cuantificación de los terpenos se realizó empleando técnicas cromatográficas. Por un lado, se empleó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) para la identificación y por otro lado la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID) para la cuantificación.

Los dos equipos de cromatografía empleados, estaban equipados con inyectores automáticos Agilent 6890N. en el caso de CG-MS, acoplado a un espectrómetro de masas con un analizador de tipo cuádrupolo 5973 MSD Agilent y en el caso de CG-FID acoplado a un detector de ionización de llama de la misma casa comercial. Las columnas usadas fueron una HP-5MS y una DB-5MS UI (30m x 0,25 mm, 0,25 μ m). Las condiciones de trabajo fueron: gas portador He, volumen de inyección 1 μ L en modo splitless, inyector 250 °C, temperatura del horno – inicio 40 °C durante 2 min y programado de 40 a 280 °C a 12 °C min⁻¹, ionización electrónica 70 eV, parámetros de adquisición (relaciones m/z escaneadas): 40-500 amu. La adquisición de datos se realizó con el software Enhanced Data Analysis y en el software Instrument 1 Data Analysis. Estas metodologías han sido empleadas en nuestro laboratorio y estandarizadas en muestras con características similares. El análisis cualitativo se basó en la comparación de los espectros experimentales con los de la librería NIST11 y en su confirmación mediante los índices de retención Van Der Dool y Kratz (2). Estos índices fueron calculados con la **ecuación 3.1**. Para ello, se inyectó una mezcla de n-alcános.

$$I_{\text{TPGC,S}}^{\text{St.ph}} = 100n \frac{t_R(S) - t_R(z)}{t_R(z+n) - t_R(z)} + 100z$$

Ecuación 3.1. Fórmula de Van den Dool y Kratz. n: diferencia entre el número de carbonos de los n-alcános de referencia, I: Índice de retención, S: Compuesto de interés, z y z+n: corresponden a los n-alcános con z y z+n número de carbonos y TPGC: cromatografía de gas con temperatura programada.

Inicialmente se realizó una selección de compuestos de interés, específicamente se seleccionó un grupo de terpenos, que presentarán interés en la industria de aromas y fragancias y que pudiesen ser

identificados en los estudios llevados a cabo durante el proyecto. Dentro de estos se incluyeron principalmente: *cis*-nerodiol, farnesol, linalool, mircenol, α -pineno, *p*-cimeno, felandreno, geraniol, β -pineno, *cis*- β -ocimeno, *trans*-nerodiol, α -terpineol y limoneno.

Posteriormente se prepararon patrones de los compuestos seleccionados en hexano/ dietil éter 9:1, con tridecano como patrón interno a una concentración de 10,20 ppm. Los rangos de concentración para las curvas de calibración oscilaron entre 0,5 y 5000 ppm para el limoneno y de 0,5 a 1000 ppm para los demás terpenos. Cabe resaltar que, estos intervalos de concentración se variaron teniendo en cuenta las cantidades máximas y mínimas de compuestos obtenidos en los diferentes procesos de extracción. Adicionalmente la calibración con los patrones en el caso de CG-MS se realizó cada vez que realizaba el análisis de un grupo de muestras y en el caso de CG-FID, cada dos o tres grupos de análisis.

4. Resultados y discusión

El objetivo principal, así como los demás objetivos de esta investigación, estuvieron encaminados hacia revalorización de los residuos agroalimentarios. De modo que, estos pudiesen ser convertidos en una fuente alternativa para la obtención y/o producción de aromas, o como participantes dentro de procesos relacionados con este tema. Se establecieron cuatro ejes principales, dentro de los cuales se integró el uso directo o indirecto de los mismos, demostrando la circularidad conseguida durante el proyecto.

En la **figura 4.1** se indica de forma general y esquemática el proceso de investigación llevado a cabo, integrando la relación entre los residuos y los cuatro ejes principales. Adicionalmente se citan los numerales correspondientes a los procedimientos aplicados en cada uno de estos, con su respectiva ubicación en el apartado de métodos.



Figura 4.1. Esquema general del proyecto de investigación. Se indican los cuatro ejes que relacionan el uso directo o indirecto de residuos y se incluyen las citas de los apartados correspondientes a los métodos aplicados en cada etapa.¹ 3.2.2 **Figura 3.1**; ² 3.2.3; ³ 3.2.4; ⁴ 3.2.5.1; ⁵ 3.2.5.2 **Figura 3.9.**

El primer eje incluye la selección de fuentes alternativas de aromas a partir de los residuos agroalimentarios, por medio de diferentes procesos y técnicas de extracción, llevados a cabo a escala laboratorio y a escala pre-piloto. Tal y como se indica en el esquema de la **figura 3.1**, del apartado de métodos correspondiente al numeral 3.2.2.

En cuanto al segundo eje, se describen los procesos llevados a cabo para el aislamiento de algunas cepas de microorganismos presentes en los residuos agroalimentarios, su respectiva identificación y así mismo la evaluación de su potencial para producir aromas, tal y como se describió en el apartado de métodos en el numeral 3.2.3.

Para el tercer eje, se tuvieron en cuenta los procesos que permitieron obtener alternativas de medios de cultivo, preparados a partir de algunos de los residuos agroalimentarios de acuerdo con el protocolo indicado en numeral 3.2.4 del apartado de métodos.

Finalmente, el cuarto eje, engloba el uso de los residuos de acuerdo con los resultados obtenidos en los demás ejes, en procesos de biotransformación de sustratos, para dar lugar a la producción de aromas, como se indica en la **figura 3.9** del apartado de métodos, en el numeral 3.2.5.2.

Con toda esta información se indican a continuación los resultados obtenidos para cada eje, con su respectiva discusión. Se resalta que al final cada una de estas, se incluye un breve resumen con las valoraciones relevantes obtenidas para cada eje.

4.1. Selección de residuos como fuentes alternativas de aromas

Previamente al estudio del contenido de terpenos de los diferentes residuos, se determinó el porcentaje de humedad en los residuos agroalimentarios. De forma que, con esta información, fuese posible expresar los resultados en base a su masa respectiva en materia seca y poder compararlos entre sí correctamente, en el momento de la cuantificación de los respectivos terrenos extraídos en cada caso.

4.1.1. Porcentaje de humedad en los residuos

Los porcentajes de humedad de los residuos agroalimentarios obtenidos, se indican en la **tabla 4.1**. Dentro de estos datos se incluyen los porcentajes determinados también para las muestras de residuos de mandarina M-2018, que fueron sometidos a pretratamientos de trituración mecánica y doble trituración (mecánica y en frío con nitrógeno líquido).

Tabla 4.1. Porcentajes de humedad de los diferentes tipos de residuos, incluidos los residuos de mandarina de los diferentes lotes con sus respectivos pretratamientos físicos.

Residuo agroalimentario	Tipo de residuo/pretratamiento	% humedad
Alcachofa	Seco (polvo)	5,44
	M-2016 Húmeda	85,97
	M-2016 Liofilizada	10,44
	M-2017 Seca (polvo)	7,26
Mandarina	M-2018 Húmeda (Cascaras, semillas, tallos, hojas)	81,97
	M-2018-CN* Húmeda	77,75
	M-2018-SN** Húmeda	75,37
Tomate	Puré húmedo	90,98
Fresa	Fibras Húmedas	80,82
Pepino	Puré húmedo	97,74

* Pretratamiento físico de doble trituración: mecánica y manual en frío con nitrógeno líquido(CN)

** Pretratamiento físico de trituración mecánica (SN)

Como era de esperar, los residuos correspondientes a tomate y pepino que se encontraban como purés, presentaron un contenido mayor de agua, por encima del 90%. Por otro lado, se determinó menos de un 8% en los residuos que se encontraban secos y polvorientos como es el caso de la alcachofa y los residuos de mandarina M-2017. Sin embargo, resulto interesante la variación del porcentaje de humedad en los residuos de mandarina M-2018. Cuyo porcentaje fue de 81% para la muestra de residuos sin ningún tipo de pretratamiento y entre un 75-77% para aquellas muestras del mismo lote que fueron trituradas mecánicamente o se sometieron a doble trituración. Lo que indica que durante los pre-tratamientos o gracias a estos se pudo perder alguna cantidad de agua.

4.1.2. Extracción de aromas a escala laboratorio

En el esquema de la **figura 4.2** se resalta la parte correspondiente a los resultados que se mostrarán y se discutirán a continuación.

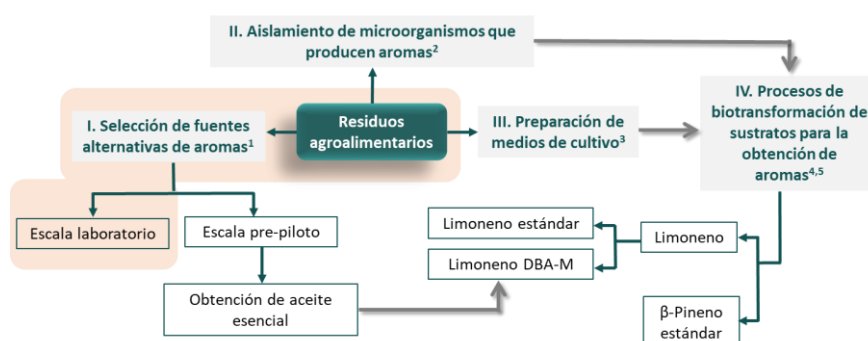


Figura 4.2. Esquema general del proyecto de investigación. Se indican los cuatro ejes que relacionan el uso directo o indirecto de residuos y se incluyen las citas de los apartados correspondientes a los métodos aplicados en cada etapa. En el esquema se resalta la parte que corresponde a los resultados y discusión, de la parte correspondiente a los ensayos a escala laboratorio. ¹ 3.2.2 **Figura 3.1**; ² 3.2.3; ³ 3.2.4; ⁴ 3.2.5.1; ⁵ 3.2.5.2 **Figura 3.9**.

4.1.2.1 Estimación inicial del contenido de terpenos contenidos en los residuos agroalimentarios

Para estimar inicialmente el contenido de terpenos en los residuos agroalimentarios y poder seleccionar posteriormente aquellos con un gran potencial, se realizaron dos ensayos de extracción.

En el primero de ellos se emplearon los residuos húmedos de las fibras de fresa, puré de tomate, puré de pepino, alcachofa y mandarina M-2016. Se obtuvieron los perfiles terpénicos de cada uno y se cuantificó la cantidad de limoneno, en aquellas muestras donde su presencia fue relevante. En el segundo, se liofilizaron algunos de estos residuos, de acuerdo con los resultados obtenidos en el primer ensayo. De forma que, se buscaba determinar si eliminando en gran medida la humedad de las muestras, se favorecía la extracción de los compuestos de interés. Los dos ensayos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos en los numerales 3.2.2.1.1 y 3.2.2.1.2 respectivamente del apartado correspondiente a métodos.

4.1.2.1.1. Residuos húmedos

Tras realizar la identificación de los principales terpenos de los residuos húmedos, se obtuvieron los perfiles que se describen en la **tabla 4.2** para cada uno de los residuos. Los compuestos se identificaron por medio de CG-MS, los cuales fueron comprobados por los respectivos índices de retención empleando la librería NIST.

Tabla 4.2. Terpenos identificados tras la extracción con hexano/dietil éter 9:1 en cada uno de los residuos agroalimentarios. Con sus respectivos índices de retención experimentales y teóricos de Van den Dool y Kratz.

Residuo	tr	Compuesto	I.R Exp	I.R T
RHF	7,801	Limoneno +	1031	1038
	14,139	α -Nerolidol ++	1564	1564
RHT	7,813	<i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno	1032	1006
RHP	7,804	Limoneno	1031	1038
	13,690	<i>p</i> -Cresol	1522	1517.5
RCA	12,771	Cariofileno +	1435	1434
	13,484	Selineno	1502	1501
	14,493	Oxido de cariofileno	1602	1606
RH-16	6,289	1 <i>R</i> - α -Pinoeno	927	927
	6,400	α -Tujeno +	935	933
	6,637	Canfeno	951	953
	7,001	Sabineno	975	976
	7,058	β -Pinoeno	979	979
	7,241	β -Mirceno ++	991	990
	7,457	α -Felandreno	1006	1005
	7,636	α -Terpineno	1019	1017
	7,913	Limoneno ++++	1039	1038
	8,061	β - <i>cis</i> -Ocimeno	1049	1045
	8,239	γ -Terpineno +++	1062	1068
	8,645	Terpinoleno	1091	1089
	8,767	Linalool	1100	1101
	9,841	Terpinen-4-ol	1183	1185
	10,004	α -Terpineol	1196	1194

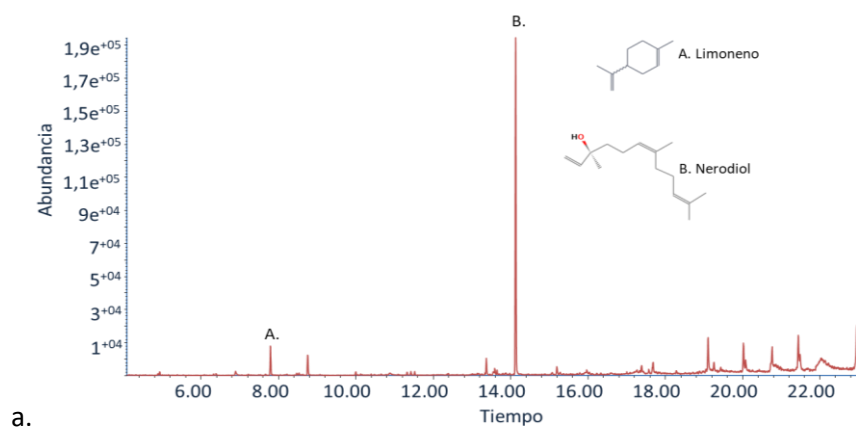
RHF: Fibras húmedas de fresa; RHT: Puré de tomate; RHP: Puré de pepino; RCA: Mezcla triturada de hojas, tallos y corazones de alcachofa; RH-16: Residuos húmedos de mandarina del lote M-16; tr: Tiempo de retención; I.R Exp: Índices de retención experimentales; I.R T: Índices de retención teóricos (Van Den Dool and Kratz RI, non-polar column, temperature ramp). + Indica de forma orientativa la cantidad de terpeno con relación a los demás presentes en el mismo residuo, establecida mediante la relación entre las áreas de las señales obtenidas para cada compuesto en las muestras.

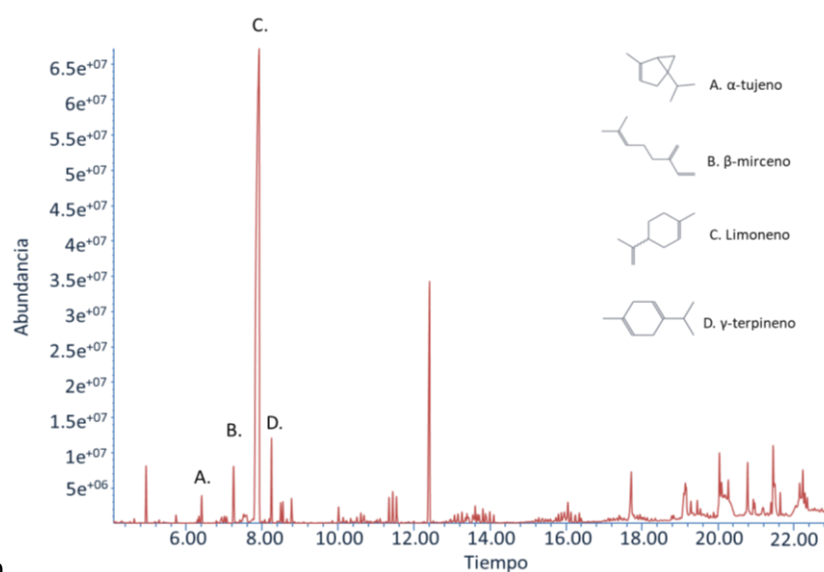
De todas las muestras de residuos analizadas, se logró evidenciar la presencia de compuestos terpénicos. No obstante, en el caso de los residuos de alcachofa, los compuestos identificados (selineno y cariofileno) no resultaron interesantes, al no ser considerados fuentes potenciales de aromas, por lo que su uso como una fuente de estos, quedó descartada. De igual forma se descartó el uso de los residuos de tomate y pepino, ya que pese a la identificación de *p*-Menta-1(7),8-dieno y limoneno respectivamente, la relación entre las áreas de estos compuestos en comparación con las áreas obtenidas en los residuos de mandarina y fresa fueron bastante inferiores, insinuando a su vez que la cantidad posiblemente de estos compuestos era baja. Además, cabe recordar que estos residuos son principalmente agua, de

forma que, lograr extraer cantidades importantes de estos compuestos requerirían procesos que no revalorizarían los residuos de forma sostenible o viable de aplicación a gran escala.

En cuanto a los residuos de mandarina y fresa, se obtuvieron resultados bastante interesantes. Puesto que se identificaron compuestos altamente aplicables en la industria de aromas y fragancias.

En el caso de la fresa, se identificó limoneno y α -nerodiol. En cuanto a los residuos de mandarina además del limoneno, se lograron identificar alrededor de 14 compuestos, dentro de los que se incluyen principalmente γ -terpineno, β -mirceno, α -tujeno y linalool entre otros. En la **figura 4.3** se muestran los perfiles obtenidos mediante CG-MS Para estos residuos, donde se indican las señales de los principales compuestos de interés identificados en cada caso.





b.

Figura 4.3. Perfiles obtenidos mediante CG-MS de los principales compuestos identificados en los residuos agroalimentarios. **a.** Fibra húmeda de fresa y **b.** Mandarina.

Al observar las proporciones de las señales de los compuestos en cada muestra, se logró intuir, cuáles de estos compuestos podrían estar en una mayor proporción en relación a los demás. Para el residuo de fresa estuvo claro que el compuesto aparentemente mayoritario correspondía a α -nerodiol, sin embargo, también se identificó limoneno. Para los residuos de mandarina, la señal que se presentó en mayor proporción en relación con las demás señales de los principales compuestos identificados, fue la correspondiente al limoneno. Teniendo en cuenta estas observaciones se procedió en este estudio inicial cuantificar el limoneno presente en los dos residuos. Se cuantificó únicamente este compuesto, dada su amplia aplicabilidad en la preparación de aromas y fragancias. La cuantificación se realizó mediante CF-FID, tal y como se indica en el numeral 3.2.6, del apartado correspondiente a métodos.

En la **tabla 4.3** se indican las cantidades, expresadas en miligramos por cada gramo de residuo seco, correspondientes al limoneno cuantificado en los extractos de los residuos de mandarina y fibras húmedas de fresa.

Tabla 4.3. Cantidad de limoneno extraído de los residuos de mandarina y fresa en mg/g de residuo seco cuantificado mediante CG-FID, durante el primer ensayo inicial..

Residuo	mg limoneno/g residuo seco
Mandarina	0,150
Fresa	0,001

De los residuos de mandarina se obtuvieron en total 0,150 mg y de los residuos de fresa tan solo 0,001 mg por cada gramo de residuo húmedo. Cabe mencionar que los rendimientos de extracción fueron bastante bajos, $9,81 \times 10^{-2} \%$ en el caso de los residuos de mandarina y de $6,49 \times 10^{-4} \%$ para los residuos de fresa. Estos valores fueron obtenidos, teniendo en cuenta la cantidad de residuo inicial empleada expresada en materia seca y la cantidad de limoneno obtenida. Esta información inicial, indicó que posiblemente uno de los residuos con mayor potencial, podría ser el correspondiente a la mandarina.

4.1.2.1.2. Residuos liofilizados

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el primer estudio se evaluó la extracción de terpenos tras un proceso de liofilización de los residuos de fibras húmedas de fresa y mandarina, de tal manera que se buscaba incrementar el rendimiento de extracción, por esta razón también se determinó realizar una segunda extracción consecutiva y no una sola como se había realizado en el primer ensayo, el protocolo seguido se describe en el numeral 3.2.2.1.2.

Los perfiles obtenidos por CG-MS, fueron los mismos que en el primer estudio, en cuanto al número de compuestos identificados en cada muestra, tanto en los extractos de la primera como en la segunda extracción. Indicando, que el proceso de liofilización no presentó ningún efecto en este sentido.

En cuanto a la cuantificación, se decidió conocer la cantidad de otros compuestos presentes en los residuos, además del limoneno. Por este motivo se incluyeron dentro de los análisis de CG-FID los terpenos: α -pineno, β -pineno, mirceno, linalool, α -felandreno y α -terpineol, debido a que son ampliamente usados en la elaboración de aromas y fragancias. El protocolo de cuantificación está indicado en el apartado de métodos específicamente en el numeral 3.2.6.

En la **tabla 4.4** se indican los miligramos de los compuestos obtenidos, por cada gramo de residuo seco.

Tabla 4.4. Cantidad de terpenos obtenidos en la extracción con hexano/dietil éter 9:1 por cada gramo de residuo agroalimentario seco (mg/g RS) y rendimiento de extracción de cada uno de estos, de los residuos liofilizados de mandarina M-2016 (RL-16) y de los residuos liofilizados de fibras de fresa (RLF). Los valores consignados en la tabla corresponden a la suma de las cantidades de volátiles en la primera y en la segunda extracción. Cada una de estas determinaciones se realizó por triplicado.

Compuesto	mg/g residuo seco		% de extracción	
	RL-16	RLF	RL-16	RLF
α -Pinoeno	0,172 \pm 0,001	-	9,00X10 ³	-
β -Pinoeno	0,163 \pm 0,001	-	8,50X10 ³	-
Mirceno	0,259 \pm 0,001	-	1,35X10 ²	-
α -Felandreno	0,144 \pm 0,001	-	7,50X10 ³	-
Limoneno	3,352 \pm 0,02	0,124 \pm 0,004	1,75X10 ¹	6,50X10 ³
Linalool	0,211 \pm 0,001	-	1,10X10 ²	-
α -Terpineol	0,105 \pm 0,002	-	5,50X10 ³	-

RL-16: Residuos de mandarina liofilizados del lote M-2016

RLF: Residuos liofilizados de fibra de fresa

Tal y como se observa en la **tabla 4.4** las cantidades obtenidas de limoneno en este ensayo fueron mayores en comparación con el primer estudio, pues presentó ser veinte veces mayor en el caso de los residuos de mandarina y ciento veinte veces mayor para los residuos de fresa. Por lo que al parecer la doble extracción realizada y la liofilización de los residuos favorecieron la extracción de este compuesto. Lo que incremento a su vez, de forma proporcional el rendimiento de la extracción.

En cuanto a los demás compuestos, si bien es cierto que no se cuantificaron en el ensayo inicial, podría suponerse que también son extraídos en mayor proporción al liofilizar los residuos y aumentar el tiempo de agitación. Cabe resaltar que cada uno de los compuestos identificados y posteriormente cuantificados en esta etapa, corresponden a compuestos que se ya se han descrito en las pieles de mandarina y algunos residuos cítricos, en los cuales el principal terpeno ha sido el limoneno (Londoño *et al*, 2012).

Con esta información se procedió a realizar una mejora de las condiciones del proceso de extracción para obtener una mayor cantidad de compuestos de interés. En este sentido, y teniendo en cuenta los resultados, se optó por seleccionar únicamente los residuos de mandarina como una posible fuente de terpenos y descartar los residuos de fresa.

Otro aspecto a destacar, es que pese a que los ensayos iniciales se llevaron a cabo únicamente con los residuos de mandarina correspondientes al lote M-2016, se decidió realizar extracciones de los demás lotes M-2017 y M-2018, y compararlos entre sí. Sin llevar a cabo pruebas o estudios iniciales de cada uno de estos. La razón básicamente radica, en que los residuos de cada lote llegaron con un año de diferencia durante tres periodos consecutivos.

4.1.2.2 Extracción de terpenos de los residuos de mandarina

Con el fin de lograr extraer la mayor cantidad posible de compuestos terpénicos de los diferentes residuos de mandarina, que pudiesen ser de interés en la elaboración de aromas, se decidió aplicar diferentes mecanismos.

Inicialmente se evaluó la extracción mediante disolventes. En este caso, se incluyeron en las extracciones de algunos residuos dos tipos de disolventes orgánicos: una mezcla de hexano/dietil éter 9:1 y ciclopentil metil éter, este último obtenido mediante procesos sostenibles.

Adicionalmente se evaluó la extracción mediante fluidos supercríticos, empleando como disolvente CO₂ supercrítico. Finalmente se realizaron distintos pre-tratamientos con el fin de evaluar el favorecimiento o no de la extracción de los terpenos presentes en los residuos.

A continuación, se indican los resultados obtenidos en cada caso para los diferentes residuos de mandarina a escala laboratorio.

4.1.2.2.1. Extracción empleando disolventes

Para la extracción de los terpenos de los diferentes residuos de mandarina, se emplearon en algunos de estos, dos tipos de disolvente. Por un lado, una mezcla de hexano/dietil éter 9:1 (Hex/Dee) seleccionado de acuerdo con las sugerencias de la empresa patrocinadora de la investigación, debido a que es el disolvente empleado por ellos para la extracción de aromas y fragancias de ciertos productos y por otro ciclopentil metil éter (CPME). Con el fin de evaluar la capacidad extractora de cada uno de estos y conseguir un proceso que permitiese incrementar la obtención del limoneno y otros terpenos de los residuos.

Los residuos empleados siguieron los protocolos descritos en el apartado de métodos, en el numeral 3.2.2.2.1 para las muestras húmedas de los residuos húmedos correspondientes a los lotes M-2016 y M-2018, 3.2.2.2.2 para la muestra seca del lote M-2017 y 3.2.2.2.3.1 en el caso de la muestra liofilizada

del lote M-2016. Un aspecto a destacar dentro de los protocolos, es que el tiempo de agitación fue mayor que el empleado en los ensayos iniciales, así mismo se decidió realizar, dos extracciones consecutivas, sobre la misma muestra y no solo una.

Inicialmente se obtuvieron los perfiles de los principales compuestos de cada tipo de residuo por CG-MS, para cada disolvente evaluado, los resultados fueron bastante similares, por lo que no se vio evidenciado un efecto particular del tipo de disolvente sobre la extracción de los terpenos identificados, motivo por el cual, la extracción de los terpenos de los residuos del lote M-2018, se llevó a cabo empleando únicamente la mezcla de disolvente Hex/Dee.

En la **figura 4.4** se muestran los perfiles de los tres lotes de residuos de mandarina cuando se empleó hexano/dietil éter 9:1. Estos perfiles corresponden a la suma de las fracciones orgánicas provenientes de las dos extracciones consecutivas llevadas a cabo.

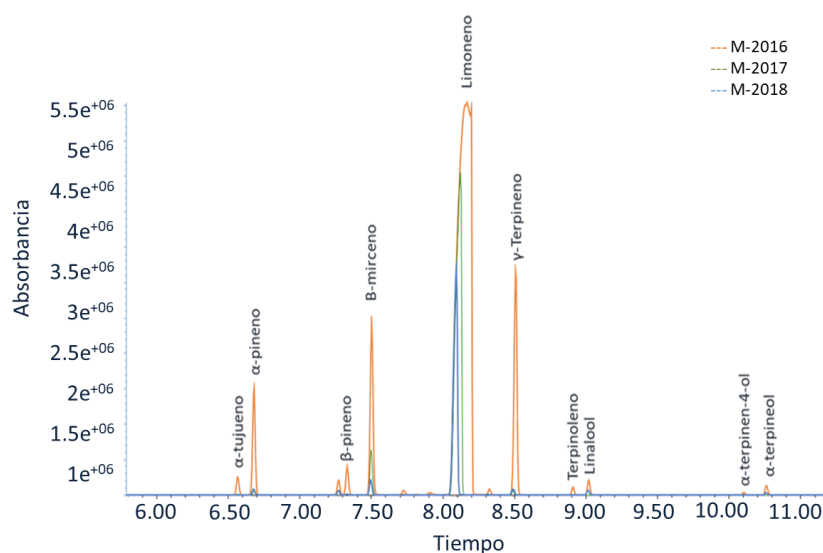


Figura 4.4. Perfiles obtenidos mediante CG-MS de los principales compuestos identificados en los residuos agroalimentarios de los tres lotes de mandarina, tras la extracción con hexano/dietil éter 9:1.

Como se observa en la figura comparativa de los tres perfiles de los distintos residuos de mandarina, está claro que el compuesto mayoritario en todos, resulto ser el limoneno. Aspecto que resulta lógico, teniendo en cuenta que, según los reportes bibliográficos, es uno de los principales terpenos presentes en pieles de frutos cítricos, como la mandarina (Londoño 2012).

Por otro lado, en cuanto al residuo del lote M-2016 se identificó un mayor número de compuestos de interés, adicionalmente la señal obtenida para el compuesto limoneno, además de ser la más intensa en comparación con los demás terpenos identificados, también resulto serlo al compararla los demás residuos.

Así mismo llamo la atención la poca presencia de compuestos en la muestra M-2017, situación que podría deberse al proceso térmico previo que se llevó a cabo para su respectivo secado, de forma que, pudo propiciar la pérdida de terpenos.

Tras la obtención de los perfiles, se procedió con la cuantificación de los principales metabolitos identificados en las muestras de los residuos de mandarina en cada disolvente evaluado. Los resultados de esta parte se muestran en la **tabla 4.5**. Cabe mencionar que los valores se expresan en miligramos por gramo de residuo seco. Estos valores fueron calculados teniendo en cuenta los porcentajes de humedad determinada e indicada en **la tabla 4.1**.

Tabla 4.5. Cantidad de compuestos volátiles obtenidos en la extracción con hexano/dietil éter 9:1 y ciclopentilmetil éter CPME por cada gramo de residuo de mandarina (mg/g RS), expresado en materia seca, para cada uno de los tipos de residuos de mandarina recibidos en los tres lotes. Los valores consignados en la tabla corresponden a la suma de las cantidades de volátiles en la primera y en la segunda extracción llevada a cabo en cada caso. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Compuesto	M-2016			M-2017			M-2018	
	RH-16 Hex/Dee	CPME	Hex/Dee	RL-16 Hex/Dee	CPME	Hex/Dee	RS-17 CPME	P-18 Hex/Dee
α -Pinoeno	2,746 \pm 0,178	3,559 \pm 0,257	0,048 \pm 0,0001	0,057 \pm 0,0004	0,467 \pm 0,002	0,400 \pm 0,013	0,587 \pm 0,040	
β -Pinoeno	0,913 \pm 0,073	1,241 \pm 0,032	0,393 \pm 0,001	0,431 \pm 0,003	0,120 \pm 0,0006	0,093 \pm 0,002		
Mirceno	5,555 \pm 0,350	4,685 \pm 0,512	2,471 \pm 0,006	2,807 \pm 0,040	0,573 \pm 0,002	0,533 \pm 0,016	1,101 \pm 0,050	
α -Felandreno	0,078 \pm 0,002	0,064 \pm 0,001	0,134 \pm 0,002	0,115 \pm 0,001				
<i>cis</i> - β -Ocimeno	0,029 \pm 0,001	0,036 \pm 0,001	0,192 \pm 0,0001	0,220 \pm 0,001				
Limoneno	34,538 \pm 0,597	32,092 \pm 2,50	63,180 \pm 0,169	76,868 \pm 0,092	8,933 \pm 0,038	8,133 \pm 0,258	15,219 \pm 0,041	
Linalool	1,597 \pm 0,213	3,880 \pm 0,122	1,197 \pm 0,003	1,379 \pm 0,027				
α -Terpineol	1,391 \pm 0,227	2,746 \pm 0,073	1,178 \pm 0,001	1,533 \pm 0,023				
Total ¹	46,847	48,303	68,793	83,41	10,093	9,159	16,907	

¹Cantidad de terpenos totales cuantificados para cada muestra, obtenidos mediante la sumatoria de los mg obtenidos para cada terpeno.

Hex/Dee: Mezcla de disolventes hexano/Dietil éter 9:1 con 10, 20 ppm de Tridecano; CPME: Ciclopentil metil éter con 10, 20 ppm de Tridecano;

RH-16: Residuos húmedos de mandarina del lote M-2016; RL-16: Residuos liofilizados de mandarina del lote M-2016; RS-17: Residuos secos de mandarina del lote 2017; P-18: Residuos húmedos del lote M-2018.

Al observar los resultados consignados en la **tabla 4.5** se evidenció que en general la cantidad de terpenos extraídos en las muestras de los residuos de mandarina analizados, fue mucho mayor que la cantidad extraída en los ensayos iniciales. Confirmando que el hecho de realizar dos extracciones consecutivas en lugar de una sola, así como el aumento en el tiempo de agitación favoreció considerablemente la cantidad extraída de este tipo de compuestos. Aspecto que puede observarse en el caso de limoneno extraído de los residuos RH-16, que en los ensayos iniciales estuvo alrededor de 3,35 mg/g RS y en este caso, la cantidad extraída estuvo diez veces por encima.

Otro aspecto que resultó interesante fue que la mayor cantidad de terpenos totales extraídos, se obtuvieron de los residuos correspondientes al lote M-2016. Particularmente de los residuos liofilizados RL-16 (68,79 mg/g RS con Hex/Dee y 83,41 mg/g RS con CPME). En los cuales, los compuestos α -felandreno, cis- β -ocimeno y limoneno presentaron cantidades que fueron casi el doble de las obtenidas en las muestras del residuo húmedo RH-16, cuya cantidad de terpenos totales fue de 46,84 mg/g RS con Hex/dee y 48,30 mg/g RS con CPME).

Por ejemplo, en el caso del limoneno las cantidades en el residuo RL-16 fueron de 63,18 mg/g RS al emplear Hex/dee y 76,86 mg/g RS con CPME y de 34,53 mg/g RS con Hex/dee y 32,09 mg/g RS con CPME para el residuo RH-16. Estas diferencias entre los valores obtenidos entre un residuo u otro estarían indicando que la liofilización es un proceso que permite extraer en mayor proporción estos terpenos específicamente. No obstante, no favorecería la extracción de compuestos como α -pineno, β -pineno, mirceno y linalool, ya que se observó que las cantidades extraídas de estos, en los residuos liofilizados fueron menores que en los residuos húmedos.

En cuanto al residuo seco, RS-17, se evidenció que la extracción de los compuestos de interés fue bastante baja, no superando los 10 mg de terpenos totales extraídos /g de RS tanto en la extracción con Hex/dee como en la extracción empleando CPME. Confirmando que, durante el proceso de secado de los residuos, los compuestos de interés en este estudio se pierden.

Para los residuos P-18, pertenecientes a los residuos de mandarina del lote M-2018, la cantidad de terpenos totales estuvo alrededor de 17 mg/g de RS. Si bien es cierto, que es una cantidad inferior a la obtenida en los residuos RL-16 y RH-16, estos residuos podrían considerarse una fuente interesante limoneno. Dado que, la cantidad extraída de este compuesto representó el 90% del total extraído.

En cuanto a la evaluación del potencial de los dos disolventes, no se observó en general diferencias en las cantidades extraídas de los terpenos que fueron cuantificados y extraídos tanto con un disolvente como con el otro, por lo que podría afirmarse que para este tipo de residuos y bajo este procedimiento, presentan el mismo potencial.

Finalmente, se decidió calcular el rendimiento de la extracción, específicamente para el compuesto mayoritario limoneno. Se seleccionó este terpeno, debido a que, por un lado, es el compuesto mayoritario en todos los residuos y por otro lado su aplicación en la industria de los aromas es bastante amplia y apetecida. Los valores usados para realizar este cálculo fueron las cantidades de residuo empleadas al iniciar los procesos de extracción, expresadas en materia seca (teniendo en cuenta la humedad de los residuos, descrita en la tabla 4.1) y los miligramos de limoneno extraídos en cada caso. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 4.6**.

Tabla 4.6. Rendimiento de extracción del limoneno de los diferentes tipos de residuos de mandarina enviados en los tres lotes correspondientes a los años 2016, 2017 y 2018 al emplear como disolventes hexano/dietil éter 9:1 y ciclopentilmetil éter CPME expresado en %.

Compuesto	M-2016		M-2017		M-2018		
	RH-16		RL-16		RS-17		
	Hex/Dee	CPME	Hex/Dee	CPME	Hex/Dee	CPME	
Limoneno	4,9	4,5	6,6	8,0	0,7	0,6	3,4

Hex/Dee: Mezcla de disolventes hexano/Dietil éter 9:1 con 10, 20 ppm de Tridecano; CPME: Ciclopentil metil éter con 10, 20 ppm de Tridecano; RH-16: Residuos húmedos de mandarina del lote M-2016; RL-16: Residuos liofilizados de mandarina del lote M-2016; RS-17: Residuos secos de mandarina del lote 2017; P-18: Residuos húmedos del lote M-2018.

Como se evidencia el rendimiento de extracción del limoneno aumentó, para cada una de las muestras analizadas en comparación con los ensayos iniciales ($9,81 \times 10^{-2}$ %). Estos valores, en el caso de los residuos húmedos de mandarina de los lotes 2016 y 2018 fueron superiores a los valores obtenidos por alguna empresa que ha empleado este tipo de residuos consiguiendo un rendimiento del 1,5%.

4.1.2.2.2. Extracción empleando fluidos supercríticos

Tal y como se indicó en el inicio de este apartado, con el fin de lograr extraer la mayor cantidad posible de compuestos terpénicos de los diferentes residuos de mandarina, se procedió a realizar la extracción mediante fluidos supercríticos empleando como disolvente CO₂ supercrítico. En este caso se

emplearon los residuos liofilizados RL-16, P-18 y DCNL18. Cabe aclarar que, dadas las características del método, las muestras empleadas deben estar completamente secas o liofilizadas. Por esta razón se emplearon los residuos mencionados. Así mismo, se optó por no evaluar la extracción de terpenos mediante esta metodología del residuo RS-17 por la poca cantidad extraída empleando disolventes.

La extracción por medio de esta técnica, se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado de métodos, específicamente en el numeral 3.2.2.3.2. Merece la pena recordar que la ejecución de esta metodología se llevó a cabo en tres etapas, tal y como se muestran en el esquema de la **figura 4.5**.

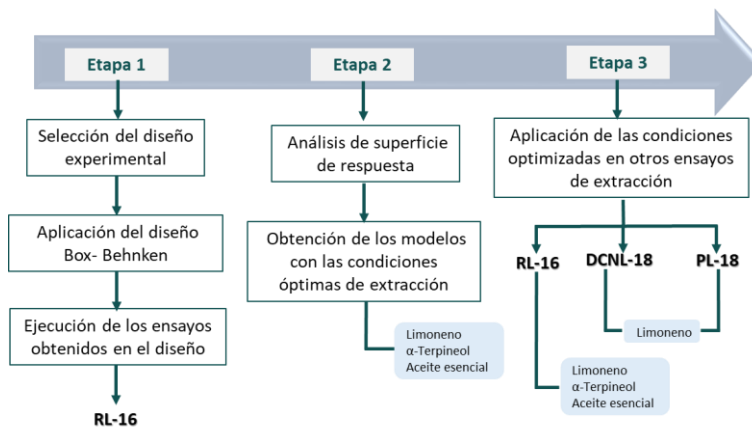


Figura 4.5. Etapas del proceso de extracción de terpenos y aceite esencial de los residuos de mandarina liofilizados. Empleando fluidos supercríticos. RL-16: Residuos húmedos de mandarina del lote M-2016; DCNL-18: Residuos triturados mecánicamente y manualmente en frío con nitrógeno líquido, posteriormente liofilizados. Correspondientes al lote M-2018; PL-18: Residuos liofilizados y homogenizados, correspondientes al lote M-2018. Los detalles del protocolo de cada etapa se describen en el apartado de métodos, numeral 3.2.2.3.2.

A continuación, se indican los resultados obtenidos en cada etapa.

Etapas 1:

Selección y aplicación del diseño experimental Box-Behnken

Tras la revisión bibliográfica llevada a cabo con el fin de seleccionar un diseño experimental que estuviese acorde con los objetivos de la extracción, se seleccionó el diseño de Box-Behnken. Que permitió identificar los valores de las variables que tienen efecto sobre a extracción de terpenos mediante fluidos supercríticos. En este caso se evaluaron la presión, la temperatura y el tiempo de extracción. Los rangos seleccionados de cada variable se encuentran descritos en la tabla 3.1.

Cabe resaltar que, gracias a este diseño, fue posible reducir considerablemente el número de experimentos, de forma que, con los 15 ensayos propuestos, se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción.

Ejecución de los ensayos obtenidos en el diseño experimental

Después de la ejecución de los 15 ensayos propuestos por el diseño experimental seleccionado, se procedió a la obtención de los perfiles de cada muestra mediante CG-MS y de la cuantificación de los terpenos mayoritarios identificados y que representaron interés de acuerdo con los objetivos de este estudio mediante CG-FID.

Resultados obtenidos por CG-MS:

Del estudio por CG-MS, se obtuvieron los porcentajes relativos de cada uno de los compuestos identificados tal y como se muestra en la **tabla 4.7**.

Los perfiles obtenidos en cada ensayo variaron según las condiciones de temperatura, presión y tiempo de extracción.

Se encontró que el mayor porcentaje relativo de limoneno, alrededor de un 70%, presentó en las muestras correspondientes a los ensayos 3, 5 y 7, todos llevados a cabo a una temperatura de 40°C y 300 o 350 bar de presión, lo que permitió deducir que estas condiciones permitirían obtener muestras con una mayor concentración de limoneno expresado en porcentaje relativo frente a los demás compuestos. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con los porcentajes relativos del compuesto α -terpineol del que se consiguió extraer alrededor de 28% (ensayos 4, 6, 11, 13, 14 y 15) e incluso un 52% (ensayo 8), con unas condiciones que favorecerían la extracción de este compuesto distintas a las que favorecerían la extracción del limoneno.

También se observó que el porcentaje relativo del α -terpineol fue mayor en las muestras que sobrepasaron los 50 °C y los 300 bar de presión, especialmente en el ensayo 8 (350 bar y 55 °C), en el que se alcanzó un porcentaje relativo de 52,12% curiosamente las condiciones en donde los porcentajes relativos del limoneno son menores.

Adicionalmente dentro de los resultados obtenidos se pudieron resaltar varios aspectos. Uno de ellos está relacionado con los compuestos que se extraen y son identificados en las muestras correspondientes a los ensayos 1 y 4 pues son los ensayos donde se identifican el mayor número de compuestos, 25 y 26 en total respectivamente.

Por un lado, en el ensayo 1 se identificaron los compuestos acetato de nerilo, α -copaeno, cariofileno, *cis*- β -farneseno y humuleno, que no fueron identificados en otros ensayos. Lo que indica que las condiciones de este estudio (40 °C, 250 bar y 20 min) favorecen sin duda la extracción de este tipo de terpenos. No obstante, estos compuestos no representan interés en la industria de aromas, excepto el acetato de nerilo, usado por su aroma floral, sin embargo, el porcentaje relativo dentro de la muestra fue bastante bajo (0,23%). Por lo que considerar este ensayo como una alternativa para su obtención, no tendría sentido.

Por otro lado, en el ensayo 4, se identificaron los terpenos isoborneol, γ -terpineol, (2R,4R)-p-menta-1(7),8-dien-2-ol y D-carvona, que no fueron observados en ningún otro ensayo. Todos estos con la coincidencia de presentar un grupo alcohol en sus estructuras. Lo que indica que las condiciones de este ensayo (55 °C, 350 bar y 20 min) favorecerían la extracción de este tipo de compuestos. No obstante, esta muestra no

representa una fuente de aromas, dados los porcentajes relativos de los compuestos de interés en el estudio pues no sobrepasan el 25%.

Dentro de los compuestos identificados llama la atención el compuesto escualeno, extraído en todos los ensayos. Los mayores porcentajes relativos (5,5-6%) se encontraron en los ensayos 2, 8, 10, 13, 14 y 15. Si bien es cierto que no es un compuesto que normalmente sea extraído de frutos cítricos, si se ha reportado su presencia en el flavedo de las mandarinas (Cheong *et al*, 2011; Jiang *et al*, 2011). Resulta importante resaltarlo, puesto que es bastante apetecido dadas sus aplicaciones en la industria cosmética. Así mismo, cabe resaltar que este terpeno no se extrajo en los otros procesos ensayados en este proyecto utilizando disolventes orgánicos con o sin pretratamientos enzimáticos. coincidiendo con algunos estudios que han reportado la extracción exitosa de este terpeno de matrices similares (Akakabe, 2010; Dong I, 2014; Sun *et al*, 2014; Benelli, 2010; Dong, 2014).

Otro de los compuestos que merece la pena mencionar, es el ácido oleico, de hecho, es el segundo compuesto que presenta un porcentaje relativo alto entre un 25 – 36% en comparación con el resto de compuestos identificados en cada uno de los extractos provenientes de los ensayos. Este ácido graso insaturado, está presente en el flavedo y se ha encontrado adicionalmente en las semillas especialmente de algunos frutos cítricos, como la mandarina (Londoño, 2012), lo que hace lógica su presencia en estos análisis, dado que en los residuos de mandarina empleados están compuestos por pieles, semillas tallos hojas y partes de pulpa. Se evidenció además que las condiciones en las que mejor fue extraído este compuesto, corresponden a rangos de temperatura entre 45°C y 55°C y presiones de 300-350 bar por tiempos de extracción entre 15 y 20 min

Finalmente se identificaron en todas las muestras γ -sitosterol y estigmasterol. Encontrándose un mayor porcentaje de estos (16,4% y 2,18% respectivamente), en el extracto del ensayo 2 (55°C, 250 bar y 20 min). Estos compuestos pertenecientes al grupo de fitoesteroles, se encuentran de forma abundante en el reino vegetal y han demostrado tener algunos efectos fisiológicos interesantes. Dentro de los cuales se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas (Ling y Jones, 1995), incluso se le han atribuido algunas propiedades hipocolesterolémicas (Valenzuela y Ronco, 2004). Por esto cabe resaltar que la extracción de estos compuestos podría aportarle algunas propiedades interesantes extracto obtenido de los residuos de mandarina, por esta técnica.

Resultados obtenidos por CG-FID:

A continuación, en la **tabla 4.8**, se muestran las cantidades extraídas de los terpenos cuantificados en cada una de las muestras para cada ensayo. Las cantidades se expresan en μg de terpeno por cada gramo de residuo liofilizado.

Tabla 4.8. Cantidad de terpenos extraídos de los residuos de mandarina liofilizados RL-16, cuantificados mediante CG-FID de cada uno de los ensayos del estudio de Box-Behnken tras el proceso de extracción mediante fluidos súper críticos de los residuos liofilizados de mandarina del lote 2016. Los valores están dados en μg de terpeno/ g de residuo liofilizado ($\mu\text{g}/\text{g RL}$)

Ensayo	$\mu\text{g}/\text{g RL}$										Totales ($\mu\text{g}/\text{g RL}$)
	α -Pinenos	β -Pinenos	Mirceno	α -Felandreno	Limoneno	γ -Terpineno	Linalool	Terpinen-4-ol	α -Terpineol		
1	2,29	0,33	1,32	0,27	61,30	2,02	3,69	0,56	10,30	82,07	
2	0,42	6,63	2,83	1,47	12,80	7,22	4,80	0,27	5,83	42,26	
3	3,74	0,72	5,59	0,54	306,00	8,43	7,36	0,97	9,33	342,68	
4	3,22	5,46	2,04	1,19	123,00	7,58	4,17	13,50	68,50	228,66	
5	2,47	0,51	4,32	0,54	309,00	9,54	8,97	1,12	6,18	342,65	
6	1,88	7,16	3,05	7,50	24,10	7,64	7,67	4,48	38,20	101,68	
7	2,64	0,39	2,73	0,29	164,00	3,80	3,61	0,46	3,17	181,09	
8	0,38	6,54	2,22	6,96	10,90	7,24	5,19	1,85	35,60	76,88	
9	1,56	0,12	1,46	1,30	95,80	3,64	1,21	0,41	5,38	110,88	
10	2,02	0,30	2,24	1,57	131,00	5,21	3,84	1,41	17,60	165,19	
11	2,30	0,27	0,50	0,32	16,90	1,60	2,63	1,83	35,10	61,44	
12	2,29	0,32	1,34	1,19	46,80	1,11	3,44	0,94	6,90	64,34	
13	1,83	0,30	1,36	-	24,30	7,43	1,58	15,90	70,50	123,20	
14	1,62	0,30	1,19	-	23,90	5,90	1,61	15,00	63,30	112,82	
15	1,77	0,29	1,19	-	25,60	6,92	1,70	15,40	66,50	119,37	

Las cantidades de terpeno extraídas en general de todos los compuestos cuantificados resulto ser mucho más baja que la cantidad extraída mediante la extracción empleando disolventes orgánicos. Los valores máximos alcanzados en este caso, por ejemplo, para el terpeno limoneno no superaron los 0,39 mg/g de RL frente a los 56,85 mg/g de RL (63,18 mg/g de RS) alcanzados con el empleo de disolventes sobre la muestra del mismo residuo.

Por otro lado, se observó el efecto de las variables evaluadas sobre las cantidades extraídas de los compuestos mayoritarios, coincidiendo con las apreciaciones realizadas en el análisis de los perfiles obtenidos mediante CG-MS. Ya que en los ensayos 3, 5 y 7, donde se reportaron los mayores porcentajes relativos para el limoneno, también se evidenció una mayor cantidad extraída de este compuesto (306 $\mu\text{g/g}$ RL, 309 $\mu\text{g/g}$ RL y 164 $\mu\text{g/g}$ RL respectivamente).

Una situación similar se observó con el compuesto α -terpineol, pues de los ensayos en los cuales este compuesto presento un mayor porcentaje relativo, también presento una mayor cantidad de terpeno extraída. Específicamente para los ensayos 4, 13, 14 y 15, estando por encima de los 60 $\mu\text{g/g}$ RL.

Estas observaciones confirmarían lo planteado en las observaciones realizadas sobre los resultados obtenidos mediante CG-MS, pues se podrían diferenciar claramente las condiciones que favorecen por un lado al limoneno en ser extraído y por el otro al α -terpineol.

Adicionalmente, se obtuvo que, la mayor cantidad de terpenos totales extraídos, provinieron de las muestras de los ensayos 3, 4 y 5. En las cuales las cantidades estuvieron entre los 228 – 342 $\mu\text{g/g}$ RL.

Para finalizar se calculó el rendimiento tanto de la extracción de limoneno, como de α -terpineol, en cada ensayo, ya que fueron los terpenos extraídos mayoritariamente. Adicional a esto y teniendo en cuenta que, durante los procesos de extracción, los extractos recogidos presentaron un aspecto aceitoso de color amarillo, muy similar a los aceites esenciales de mandarina comerciales. Se decidió calcular el rendimiento de la extracción, expresado también en el % de aceite extraído.

Para obtener los rendimientos, se tuvo en cuenta en los tres casos (limoneno, α -terpineol y aceite esencial) la masa de residuo liofilizado empleado en cada ensayo y la masa de cada uno de los compuestos cuantificados o la masa del

aceite. Cabe recordar que los viales de recolección se taraban antes de ser empleados, de forma que, con la diferencia de masas se lograba obtener el peso del aceite recuperado.

En la **tabla 4.9** se indican los valores obtenidos del rendimiento de la extracción en cada ensayo.

Tabla 4.9. Rendimiento (‰) de los terpenos mayoritarios extraídos, limoneno y α -terpineol y el % del aceite esencial extraído de los residuos de mandarina liofilizados en cada uno de los ensayos del estudio de Box-Behnken tras la extracción empleando fluidos súper críticos en los residuos liofilizados de mandarina RL-16

Compuesto/aceite	Ensayo														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Limoneno	0,06	0,01	0,31	0,12	0,31	0,02	0,16	0,01	0,10	0,13	0,02	0,05	0,02	0,02	0,03
α -Terpineol	0,01	0,01	0,01	0,07	0,01	0,04	<0,01	0,04	0,01	0,02	0,04	0,01	0,07	0,06	0,07
Aceite esencial	8,05	8,14	17,54	2,94	16,05	4,67	4,32	4,29	10,71	13,13	5,29	6,04	4,24	4,71	4,34

Se observa en la **tabla 4.9** que los porcentajes de rendimiento de extracción obtenidos para los compuestos volátiles limoneno y α -terpineol son muy bajos, teniendo en cuenta los rendimientos obtenidos empleando otras metodologías, como el empleo de disolventes en donde se alcanzó entre 6 y 8% y pretratamientos físicos y enzimáticos para el compuesto limoneno, como se expondrá más adelante. Hecho que sugiere que durante el proceso de liofilización se pierden de alguna manera estos compuestos. Sin embargo, se observa una situación muy interesante en cuanto a los porcentajes de rendimiento del aceite, aproximadamente 17%, un valor bastante superior al reportado en la bibliografía donde no supera el 3% (Londoño *et al*, 2012.). No obstante, y como se demostró en los resultados del análisis de CG-MS, en las muestras donde este porcentaje es mayor, también lo es el porcentaje relativo de los ácidos grasos y sus respectivos esteres.

Etapa 2: Análisis de superficie de respuesta y obtención de las condiciones óptimas de extracción.

Con los resultados obtenidos en la primera etapa (mg extraídos/ g RL de limoneno y α -terpineol y % de aceite extraído), para cada ensayo, con sus respectivas condiciones de temperatura, presión y tiempo de extracción, se procedió a realizar un análisis de superficie de respuesta. Con el fin de obtener un modelo matemático para cada caso, que permitiera conocer los valores de las variables independientes evaluadas para optimizar la extracción de los dos terpenos seleccionados y del aceite. Para llevar a cabo este análisis, se empleó el software STATGRAPHICS Centurion XVIII, tal y como se indicó en el apartado de métodos, en el numeral 3.2.2.2.3.2.

Los valores en $\mu\text{g/g}$ RL de los terpenos, el % de aceite y las condiciones de las variables para cada ensayo se encuentran en la **tabla 4.10**.

Tabla 4.10. Resultados experimentales para cada ensayo de extracción de limoneno y α -terpineol expresados en microgramos por gramo de residuo de mandarina liofilizado y rendimiento de aceite esencial tras la extracción, identificación por CG-MS y cuantificación por CG-FID en función de las variables independientes de temperatura, presión y tiempo evaluadas.

Ensayo	Variables independientes						Resultados experimentales		
	Temperatura		Presión		Tiempo		Limóneno	α -terpineol	Aceite
	X ₁	T(°C)	X ₂	P(bar)	X ₃	t(min)	mg/g RL*	mg/g RL*	%
1	-1	40	-1	250	0	20	61,30	10,30	8,05
2	1	55	-1	250	0	20	12,80	5,83	8,14
3	-1	40	1	350	0	20	306,00	9,33	17,54
4	1	55	1	350	0	20	123,00	68,50	2,94
5	-1	40	0	300	-1	15	309,00	6,18	16,05
6	1	55	0	300	-1	15	24,10	38,20	4,67
7	-1	40	0	300	1	30	164,00	3,17	4,32
8	1	55	0	300	1	30	10,90	35,60	4,29
9	0	45	-1	250	-1	15	95,80	5,38	10,71
10	0	45	1	350	-1	15	131,00	17,60	13,13
11	0	45	-1	250	1	30	16,90	35,10	5,29
12	0	45	1	350	1	30	46,80	6,90	6,04
13	0	45	0	300	0	20	24,30	70,50	4,24
14	0	45	0	300	0	20	23,90	63,30	4,71
15	0	45	0	300	0	20	25,60	66,50	4,34

*RL: residuo de mandarina liofilizado

Tras el estudio estadístico de los resultados en cada respuesta evaluada (extracción de limoneno, α -pineno y % de aceite esencial), se obtuvieron inicialmente los factores de inflación de la varianza (FIV). Tanto para cada variable independiente evaluada (temperatura, presión y tiempo de extracción), como para las posibles interacciones entre estas (Anexo II, tablas A2.1, A2.2 y A2.3).

Al obtener estos valores, se observó que el valor máximo en cada uno de los casos, fue inferior a 10. Siendo de 1,11 en los tres. Con esta información, se pudo determinar, por un lado, que el modelo aplicado fue viable y así mismo que se presentó correlación entre las variables independientes evaluadas. Esto quiere decir que en cada uno de los modelos obtenidos (limoneno, α -pineno y % de aceite esencial) dos o más variables tuvieron un efecto sobre la extracción.

Para conocer en cada caso específicamente, las variables relacionadas entre sí, se obtuvo el diagrama de Pareto de cada uno de los modelos. Tal y como se muestra en la **figura 4.6**.

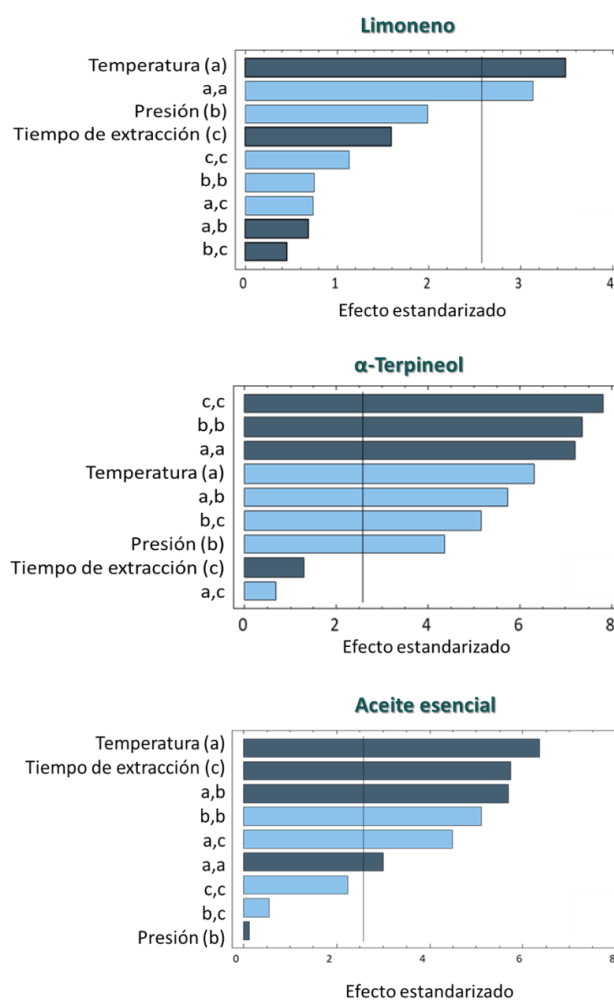


Figura 4.6. Diagramas de Pareto estandarizado, obtenidos para cada modelo evaluado, tras el análisis de superficie de respuesta mediante el software STATGRAPHICS Centurion XVIII. Las respuestas evaluadas fueron extracción de limoneno, α -terpineol y aceite esencial con un $\alpha=0,05$ en cada uno.

Antes de realizar el análisis respectivo a los diagramas de Pareto obtenidos, resulta importante aclarar que este tipo de gráficas permiten comparar la magnitud relativa, la significancia estadística de los efectos principales (en este caso: temperatura, presión y tiempo de extracción; a, b y c respectivamente), los efectos cuadrados de cada variable (a,a; b,b y c,c) y finalmente las interacciones que se pueden establecer entre las mismas (a,b; a,c y b;c). Las barras en cada diagrama, son organizadas jerárquicamente, de acuerdo a estas interacciones, de forma que aquellas variables que presentaron un mayor efecto en la respuesta (en este caso la extracción de limoneno, α -terpineol y aceite esencial), se ubican en la parte superior. En cuanto al nivel de significancia (α), es establecido como 0,05 por defecto en el software. Finalmente, línea de referencia en cada gráfica indica cuáles de estos efectos o correlaciones resultaron significativos estadísticamente.

Teniendo en cuenta esta información, se determinó que en el caso de la extracción de limoneno, el efecto que resulto significativo estadísticamente correspondió a la variable temperatura (a) y a las interacciones cuadradas de la misma (a,a), tal y como se observa en el diagrama de Pareto en figura 14.

En cuanto a los resultados de la extracción del α -terpineol, se observó que las tres variables representaron un efecto sobre la extracción. Principalmente para los cuadrados del tiempo de extracción (c,c), de la presión (b,b) y de la temperatura (a,a). Así mismo se obtuvieron efectos significativos para la temperatura (a), las interacciones entre la temperatura y la presión (a,b) y la presión y el tiempo de extracción.

Una situación similar se obtuvo con las interacciones observadas en la extracción del aceite esencial. Pues cada variable demostró tener un efecto significativo. Principalmente para la temperatura (a), el tiempo de extracción (c), las interacciones de la presión con la temperatura (a,b) y sus cuadrados respectivos b,b , a,c, a,a,.

Las correlaciones que resultaron ser significativas en cada caso (limoneno, α -terpineol y aceite esencial), pudieron ser corroboradas tras el análisis de la varianza (indicado detalladamente para cada respuesta en el Anexo II, tablas A2.4, A2.5 y A2.6). En donde se observó que, para cada una de estas, los valores de P, fueron inferiores al nivel de significancia establecido ($\alpha=0,05$), con un nivel de confianza del 95%. Así mismo se obtuvieron los valores correspondientes al coeficiente de correlación múltiple (R^2), coeficiente de correlación múltiple ajustado (R^2 ajustado), la desviación estándar (σ), valor

estadístico de Durbin-Watson (DW) y el error medio absoluto (MAE), para cada caso., indicados en la **tabla 4.11**.

Tabla 4.11. Resultados del análisis de varianza del modelo de regresión para cada respuesta de extracción evaluada (limoneno, α -terpineol y aceite esencial), mediante fluidos supercríticos. El software empleado fue STATGRAPHICS Centurion XVIII.

Modelo	R ²	R ² ajustado	σ	DW	MAE
Limoneno	85,7%	60,13%	0.063	2.18 (P=0.40)	0,029
α -Terpineol	96,7%	90,7%	0,008	2.58 (P=0.72)	0,003
Aceite esencial	98,4%	95,47%	0,986	2.20 (P=0.41)	0,470

R²: Coeficiente de correlación múltiple; R² ajustado: Coeficiente de correlación múltiple ajustado; σ : Desviación estándar; DW: valor estadístico de Durbin-Watson; MAE: Error medio absoluto

Respecto a la obtención de los modelos matemáticos, se obtuvieron las ecuaciones de los modelos ajustados para cada caso. Tal y como se indican en las **ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3**.

$$\text{mg de limoneno} = 5,71 - 0,20 X_1 - 0,0015 X_2 - 0,047 X_3 + 0,0021X_1^2 - 0,00005X_1 X_2 + 0,0003X_1X_3 + 0,000009X_1^2 - 0,00003X_1X_3 + 0,0007X_3^2$$

Ecuación 4.1

$$\text{mg de } \alpha\text{-terpineol} = 1,85 - 0,035 X_1 - 0,0043 X_2 - 0,035 X_3 + 0,00049 X_1^2 - 0,00005X_1 X_2 + 0,0003X_1X_3 + 0,000009X_1^2 - 0,00003X_1X_3 + 0,0005X_3^2$$

Ecuación 4.2

$$\% \text{ aceite esencial} = 196,6 - 3,8378 X_1 - 0,2979 X_2 - 4,1808 X_3 + 0,05438 X_1^2 - 0,00924 X_1 X_2 + 0,04773 X_1X_3 + 0,001299 X_1^2 - 0,00165 X_1X_3 + 0,0457 X_3^2$$

Ecuación 4.3.

X₁: Temperatura (°C)

X₂: Presión (bar)

X₃: Tiempo de extracción (min)

Con estos modelos matemáticos se obtuvieron las respectivas superficies de respuesta, para cada una de las extracciones. Estos gráficos resultan bastante

útiles, dado que representan la relación entre dos variables continuas en base al modelo. De forma que, resulta posible establecer valores de respuesta en condiciones operativas deseables.

A continuación, en la **figura 4.7** se muestra a modo de ejemplo el análisis de superficie de respuesta obtenido para la extracción de limoneno al aplicar su modelo matemático respectivo. En el gráfico se relacionan las variables presión y temperatura a un tiempo establecido de 22,5 min.

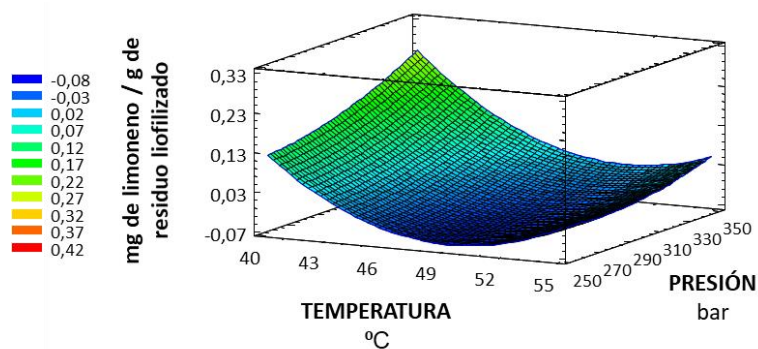


Figura 4.7. Superficie de respuesta obtenida tras aplicar el modelo matemático para extracción de limoneno. La respuesta está expresada en miligramos por gramo de residuo liofilizado. Se representan las variables continuas presión y temperatura, a un tiempo de extracción de 22,5 min.

Finalmente se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción para cada respuesta evaluada (**tabla 4.12**). Cabe recordar que los rangos de temperatura fueron 40, 45 y 55°C, de presión 250,300 y 350 bar y de tiempo de extracción 15, 20 y 30 min.

Tabla 4.12. Condiciones óptimas para los factores evaluados y sus respectivas cantidades esperadas al aplicar el modelo, para las extracciones de limoneno, α -terpineol y aceite esencial de mandarina. Los modelos están expresados en mg/g de residuo en el caso de los terpenos y en % en el caso del aceite esencial.

Respuesta	Factores			Óptimo esperado
	Temperatura °C	Presión bar	Tiempo de extracción min	
Limoneno	40,0	347,8	15,0	0,347
A-Terpineol	50,2	313,9	22,3	0,082
Aceite esencial	40,0	349,9	15,2	22,70

Tal y como se observa en la tabla, las condiciones óptimas para la extracción de limoneno y aceite esencial, son bastante similares, lo que resultaría útil para llevar a cabo proceso de extracción, en los que se buscase un rendimiento mayor de estos dos, que permitiría llevarlos a cabo en el mismo ensayo.

Con las condiciones optimizadas establecidas, se procedió con la aplicación de estas, en nuevas extracciones.

Etapa 3: Aplicación de las condiciones optimizadas en otros ensayos de extracción

Cuando se lleva a cabo un análisis de superficie de respuesta, para la obtención de condiciones optimizadas, en este caso puntual, para la extracción de limoneno, α -terpineol y aceite esencial de los residuos de mandarina. Se hace imprescindible realizar una serie de ensayos aplicando los factores optimizados, con el fin de comprobar si los modelos obtenidos corresponden a los resultados experimentales. Por esta razón se decidió llevar a cabo 5 ensayos de extracción. Tal y como se describe en el numeral 3.2.2.2.3.2 del apartado correspondiente a los métodos.

Para los tres primeros, se emplearon los residuos de mandarina RL-16, los mismos que se usaron durante en el diseño experimental Box-Behnken y se evaluaron los tres modelos obtenidos. Para los demás ensayos, se emplearon residuos liofilizados del lote M-2018 y se evaluó únicamente el modelo correspondiente a la extracción del limoneno. En la muestra del ensayo 4 se emplearon los residuos DCNL-18 y para el ensayo 5, los residuos PL-18. Cabe resaltar que estos residuos del lote M-2018, se incluyeron con el fin de

comparar a posteriori los resultados extraídos mediante esta técnica con el empleo de disolventes y distintos pre-tratamientos.

En la **tabla 4.13**, se resumen las condiciones optimizadas que fueron empleadas en cada uno de los ensayos, de acuerdo a los modelos obtenidos tras el análisis de superficie de respuesta.

Tabla 4.13. Condiciones optimizadas, empleadas sobre residuos de mandarina liofilizados del lote M-2016 y M-2018. Para la extracción de limoneno, limoneno, α -terpineol y aceite esencial por fluidos supercríticos.

Ensayo	Tipo de residuo	Modelo aplicado	Condiciones*		
			Temperatura °C	Presión bar	Tiempo min
1	RL-16	α -Terpineol	50	314	23
2		Limoneno	40	348	15
3		% de aceite esencial	40	350	15
4	DCNL-18	Limoneno	40	348	15
5	PL-18	Limoneno	40	348	15

*Las condiciones se redondearon, dado que en el equipo el control de las decimas no era posible.

RL-16: Residuos liofilizados de mandarina del lote M-2016; DCNL-18: Residuos con trituración mecánica y manual en frío, empleando nitrógeno líquido y posteriormente liofilizados; PL-18: Residuos liofilizados del lote M-2018 y posteriormente homogenizados.

Posterior a la extracción, los extractos resultantes se analizaron mediante CG-MS para la obtención de los perfiles y CG-FID para cuantificar los terpenos mayoritarios y de interés en el estudio.

Resultados obtenidos por CG-MS:

En la **tabla 4.14** se indican los perfiles obtenidos tras el análisis mediante CG-MS.

Cabe mencionar que en el **anexo I, tabla A1.1** se incluyen los valores que permitieron identificar los diferentes compuestos por CG-MS de acuerdo con su tiempo de retención y los índices experimentales de Van den Dool obtenidos y posteriormente comparados con la librería NIST.

Tabla 4.14. Porcentajes relativos de los compuestos identificados mediante CG-MS de cada uno de los ensayos realizados en la fase de optimización.

Compuesto	Ensayo				
	1	2	3	4	5
α -Pinoeno	0,36	0,83	0,86	2,67	2,46
Canfeno	-	-	0,18	0,42	0,13
β -Pinoeno	0,13	0,22	0,30	0,62	0,49
Mirceno	0,31	1,45	0,78	0,92	1,96
α -Felandreno	-	0,32	0,32	1,04	1,24
o-Cimeno	0,08	-	-	-	-
α -Terpineno	-	0,16	0,34	-	-
Limoneno	16,83	63,90	31,28	24,88	58,95
γ -Terpineno	2,74	2,51	1,89	0,98	0,95
Terpinoleno	7,28	0,45	1,42	1,25	1,26
Linalool	0,64	0,64	0,59	1,72	1,50
Terpinen-4-ol	0,76	0,30	-	0,51	0,02
α -Terpineol	42,72	3,73	7,25	5,69	10,94
Limonen-1,2-diol	2,20	-	-	-	-
β - <i>cis</i> -Cariofileno	-	-	-	0,34	-
Valenceno	2,10	0,31	1,44	5,11	1,95
Ácido mirístico	-	-	-	0,50	-
Ácido palmítico	-	-	-	1,06	-
Linoleato de metilo	1,68	1,46	2,07	7,33	3,92
10-Octadecenoato de metilo	2,61	2,54	3,99	7,61	4,27
<i>cis,cis</i> - Ácido linoleico	-	-	-	2,29	0,68
Ácido oleico	9,89	11,03	26,66	3,92	-
Linoleato de etilo	-	1,26	1,95	3,56	2,20
Linoleato de isopropilo	-	1,11	2,25	4,10	1,77
Escualeno	-	2,28	3,85	10,91	3,81
Campesterol	1,79	-	1,55	2,13	1,20
Estigmasterol	0,85	-	1,23	1,61	0,87
γ -Sitosterol	7,04	5,50	9,94	14,35	4,53
<i>Total de compuestos identificados</i>	18	19	21	25	21

Dentro de los perfiles obtenidos tras la extracción de las muestras, aplicando los modelos respectivos, se observa de forma general que los resultados coinciden con lo esperado.

Ya que tratándose del mismo residuo (RL-16) usado en el diseño experimental, se pudo observar, por un lado, que al aplicar el modelo para maximizar el α -terpineol (ensayo 1), se consiguió un porcentaje relativo de este compuesto mucho mayor en comparación con los demás compuestos, tal y como se esperaba. Por otro lado, al aplicar el modelo para la extracción del limoneno (ensayo 2), también se consiguió un porcentaje relativo acorde a los resultados del diseño experimental en condiciones similares a las óptimas, por lo que el modelo aplicado también estuvo acorde a los

resultados experimentales y finalmente al aplicar el modelo para la extracción de aceite (ensayo 3) se observó un porcentaje relativo de ácido oleico mayor.

En cuanto a los resultados de los ensayos 4 y 5, se observó que los perfiles obtenidos son diferentes en cuanto a que en el residuo DCNL-18 se identificó β -cis-cariofileno, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico, que no se observaron en las muestras PL-18. Lo que indica que el proceso realizado a este residuo (trituration mecánica y manual en frío) favoreció la extracción de este tipo de compuestos. Así mismo se observó en el caso del escualeno, cuyo porcentaje relativo en el ensayo 4 fue mayor, incluso superando los valores obtenidos en los ensayos del diseño experimental. En cuanto al porcentaje relativo del limoneno, se observó que fue mayor en el residuo PL-18, lo que indica que, para aplicar esta técnica de extracción sobre este lote de residuos, no conviene llevar a cabo ningún pre-tratamiento adicional (trituration mecánica y en frío).

Finalmente, al comparar los resultados de los ensayos 4 y 5, con los resultados del ensayo 2, queda claro por un lado que, los porcentajes relativos del limoneno son diferentes. Siendo mayor en los residuos RL-16. Así mismo se observó con el ácido oleico. Lo que podría indicar que la muestra RL-16 es más rica en este tipo de compuesto que los residuos del lote M-2018. Sin embargo, una situación contraria se observó en el caso de los compuestos campesterol, estigmasterol y γ -Sitosterol que estuvieron en mayor porcentaje en las muestras de los residuos del lote M-2018.

Tras la obtención y posterior comparación de los perfiles, se procedió a la cuantificación de los principales compuestos de interés mediante CG-FID.

Resultados obtenidos por CG-FID:

En la **tabla 4.15** se muestran los miligramos de limoneno y α -terpineol obtenidos por gramo de residuo liofilizado para cada uno de los extractos de las muestras analizadas.

Tabla 4.15. Comparación de la cantidad de terpenos extraídos y porcentaje de extracción de aceite esencial de los residuos de mandarina tras la optimización del análisis de superficie de respuesta para cada ensayo. Los terpenos se cuantificaron mediante CG-FID y el porcentaje de aceite esencial, tal y como se realizó en los ensayos del diseño experimental.

Ensayo	mg de terpeno/g RL ¹		% de aceite extraído
	Limoneno	α -Terpineol	
1	0,08	0,11	6,15
2	0,28	0,01	7,69
3	0,29	0,01	18,66
4	0,16	-	3,26
5	0,28	0,01	3,07

¹RL: residuo liofilizado

Se observa en el ensayo 1, en el que se aplicó el modelo para la extracción de α -terpineol que el valor obtenido (0,11 mg/ g RL) fue muy cercano y ligeramente superior al valor esperado de acuerdo con el modelo (0,08 mg/ g RL), lo que optimizaría la extracción de este compuesto empleando fluidos supercríticos. En cuanto al limoneno extraído en caso, se observa que la cantidad es bastante inferior a la cantidad del compuesto de interés en este modelo (0,08 mg/g RL), de igual manera ocurre con el porcentaje de aceite recuperado (61%), aspectos que coinciden con lo obtenido en los resultados del diseño experimental.

En cuanto al ensayo 2, sobre el cual se aplicó el modelo de extracción del limoneno, el valor obtenido de este compuesto, es ligeramente menor (0.28 y 0,11 mg/g RL respectivamente) a la cantidad esperada de acuerdo con el modelo (0,35 mg/g de residuo liofilizado), resultados que coincidieron con lo observado en los perfiles. Sin embargo y teniendo en cuenta que son residuos que han estado almacenados hasta la optimización, pese a estar liofilizados, pueden perder de alguna manera este compuesto, que como bien se ha observado durante el estudio es bastante volátil. En este contexto, podría decirse cantidad de limoneno del residuo RL-16 extraída es similar a la que se extrae cuando se aplican las condiciones del modelo optimizado para esta respuesta.

En cuanto a la muestra 3, se observan dos situaciones muy interesantes, la primera de estas es que, de acuerdo con el modelo aplicado para la extracción de aceite, el porcentaje que se obtuvo fue muy cercano (18,6%)

al porcentaje esperado (22,7%), de forma que el modelo coincidiría con los resultados experimentales.

Adicionalmente la cantidad de limoneno extraída es muy cercana a la cantidad máxima extraída en los ensayos del diseño experimental y sobre todo muy similar a la cantidad esperada en el modelo. Todo esto resulta lógico, ya que las condiciones de los dos modelos son relativamente similares, se varía la presión, siendo en el caso de la extracción de aceite ligeramente menor, por lo tanto podría entenderse por un lado que la cantidad de limoneno sea similar a la extraída aplicando su modelo extracción y por otro lado podría evidenciarse como este ligero cambio de presión hace que el porcentaje de extracción de aceite sea mucho mayor, evidenciado además en el perfil y los respectivos porcentajes relativos de los ácidos grasos que al ser extraídos de los residuos aportan peso a los respectivos extractos y por ende un mayor rendimiento de extracción.

Por otro lado, se tienen los resultados de los ensayos 4 y 5 sobre las cuales se aplicó el modelo de extracción del limoneno. Al observar los valores de limoneno obtenidos en las dos muestras se observa una diferencia considerable, ya que del residuo PL-18 se obtiene casi el doble de la cantidad de limoneno (0,28 mg/g RL), frente al residuo DCNL- (0,16 mg/g RL). Esto podría hacer pensar que el pretratamiento en frío y la doble trituración no favorecen la extracción de este terpeno, bajo estas condiciones empleando fluidos supercríticos.

Cabe resaltar que las cantidades extraídas de limoneno y α -terpineol (0,28 y 0,11 mg/g RL respectivamente), obtenidas mediante FSC, no superan las cantidades obtenidas cuando se emplearon disolventes sobre los residuos RL-16. Ya que se alcanzaron a extraer 8 mg de limoneno/g RL cuando se empleó como disolvente CPME y alrededor de 6 mg de limoneno/g de residuo cuando se empleó Hex/dee 9:1 y unos 0,16 y 0,12 mg de α -terpineol/g RL respectivamente, al emplear los disolventes mencionados. Por lo que, esta técnica no resulta una buena opción para extraer los aromas de los residuos de mandarina.

Por otro lado, pese a que el rendimiento de extracción de aceite esencial de mandarina por FSC (18,6%), estuvo por encima de los rendimientos reportados hasta el momento, que oscilan entre 0,1 y 3% (Londoño *et al*, 2012), podría estar relacionado con extracción de ácidos grasos y otros compuestos de alto peso molecular, que no se habían identificado en las extracciones con disolventes.

Lo anterior coincide con algunos reportes bibliográficos, en los que se resalta la utilidad del empleo de FSC en la extracción de ácidos grasos en diferentes tipos de matrices (Arnáiz y Bernal, 2011; Ivanov *et al*, 2011), dentro de las cuales no se mencionan residuos agroalimentarios de frutos cítricos.

4.1.2.2.3 Extracción empleando pretratamientos físicos y enzimáticos
Teniendo en cuenta que, en las extracciones mediante FSC las cantidades obtenidas fueron inferiores a aquellas logradas mediante la extracción con disolventes, se optó por aplicar una serie de pre-tratamientos a los residuos de mandarina disponibles. Con el fin de optimizar la extracción de aromas y por lo tanto lograr extraer la mayor cantidad de limoneno y otros terpenos de interés mediante el uso de disolventes orgánicos. En este caso la mezcla Hexano/Dietil éter 9:1.

Por un lado, se evaluaron pretratamientos físicos, como el enfriamiento de los residuos, la trituración mecánica y la trituración manual en frío con nitrógeno líquido. Así como pre-tratamientos enzimáticos, mediante el uso de enzimas celulasa y pectinasa y por otro lado la combinación de pre-tratamientos físicos y enzimáticos sobre una misma muestra.

Estos pre-tratamientos se realizaron sobre los residuos secos de mandarina M-2017 (enzimáticos) y sobre los residuos húmedos de mandarina M-2018 (físicos, enzimáticos y físico-enzimáticos). Los procedimientos aplicados a cada tipo de residuo se describen en el apartado de métodos en el numeral 3.2.2.2.4.1 y 3.2.2.2.4.2 respectivamente.

Las enzimas empleadas en los dos grupos de residuos correspondieron a celulasa ID y pectinasa ID. Las características de cada enzima, así como de las condiciones de la reacción enzimática, se resumen en la **tabla 4.16**.

Tabla 4.16. Características de las enzimas empleadas en el pre-tratamiento de las muestras secas del lote M-2017 (RS-17) y sobre los residuos del lote M-2018. Se incluyen las condiciones en el proceso de enzimólisis.

	Enzima	
	Celulasa ID	Pectinasa ID
Origen	<i>Trichoderma sp.</i>	Endogalacturonasa
Rango de pH óptimo ¹	3,5-6	3-5
Temperatura óptima ²	50-70 °C	10-55 °C
Condiciones de la enzimólisis para las muestras RS-2017 y los residuos del lote M-2018: ¹ pH 5.0; ² Temperatura 55 °C		

Los intervalos de tiempo de enzimólisis seleccionados para cada matriz, se llevaron a cabo teniendo en cuenta, lo reportado en algunos estudios, en donde los rendimientos de extracción de aromas como limoneno y linalool se vieron favorecidos al cabo de 3 y 5 horas (Zhang *et al*, 2019).

A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada grupo de residuos.

4.1.2.2.3.1. Residuos secos del lote M-2017 (RS-17)

Tras el pre-tratamiento enzimático de los residuos RS-17, se obtuvo mediante CG-MS el perfil de las muestras. No obstante, los perfiles obtenidos tras las 3 y las 5 horas de enzimólisis no presentaron diferencias importantes. Por lo que el tiempo de la reacción no tuvo ningún efecto en este aspecto. Una situación similar se evidenció, al comparar estos perfiles con el obtenido tras la extracción con disolvente sin pretratamiento (indicado en la figura 4.4. M-2017). De forma que, se pudo evidenciar, que en cuanto a los perfiles este pre-tratamiento enzimático no presentó ningún efecto.

Posteriormente se realizó la cuantificación de los extractos mediante CG-FID. Cabe aclarar que se decidió únicamente cuantificar el limoneno y mirceno, ya que eran los dos compuestos mayoritarios identificados. Las cantidades expresadas en mg de terpeno/g RS (residuo seco, estimado en base al porcentaje de humedad descrito en la **tabla 4.1**), se indican en la **tabla 4.17**.

Tabla 4.17. Miligramos de terpenos cuantificados por gramo de residuo seco (RS), tras la extracción con disolvente (Hex/dee 9:1) de los residuos secos de mandarina del lote M-2017 (RS-17) pre-tratados enzimáticamente con celulasa ID y pectinasa ID (CelPecID). Las extracciones se realizaron por duplicado.

% Enzima	t reacción h	Mirceno	Limoneno	mg totales/g RS
5	3	0,015 ± 0,002	1,325 ± ≤0,001	1,339
5	5	0,016 ± 0,002	1,252 ± 0,039	1,268
10	3	0,015 ± ≤0,001	1,058 ± 0,056	1,073
10	5	0,014 ± 0,002	1,081 ± 0,057	1,095

La mayor cantidad de terpenos, se obtuvo al emplear la mezcla de enzimas al 5% por un periodo de enzimólisis de 3 horas. La misma situación se observó con el limoneno, puesto que la mayor cantidad de limoneno fue de 1,32mg/g RS, bajo las mismas condiciones. Alrededor de 200 mg más, que al emplear la mezcla de enzimas al 10% en un periodo de tiempo igual o mayor. En

cuanto al mirceno, las cantidades en todos los casos fueron similares (entre 0,14 – 0,16 mg/g RS). Pese a todo esto, las cantidades obtenidas de ambos terpenos fueron muchísimo menores que las cantidades obtenidas sobre el mismo residuo (R-17), cuando no se empleó ningún pre-tratamiento (limoneno: 8-9 mg/g RS, mirceno: 0,53-0,57 mg/g RS) De manera tal que, en este caso en particular, el empleo de enzimas como una alternativa de pre-tratamiento, para mejorar la extracción de aromas de estos residuos no fue exitosa. Lo que llevó a descartar este residuo en procesos posteriores de extracción aromas.

4.1.2.2.3.2. Residuos húmedos lote 2018

Tras la evaluación del pre-tratamiento enzimático de los residuos de mandarina secos del lote M-2017 (RS-17), se decidió evaluar sobre los residuos del lote M-2018 una serie de pre-tratamientos previos a la extracción con Hex/dee 9:1. Dentro de los que se incluyeron pre-tratamientos físicos, enzimáticos y una mezcla de ambos en algunos casos. Todo esto con el fin de conseguir mejorar la extracción llevada a cabo mediante el uso de disolventes. Los diferentes procedimientos llevados a cabo sobre este residuo del lote M-2018, se indican esquemáticamente en la figura 1, del apartado de métodos. Para este residuo adicionalmente se evaluaron dos tiempos de agitación en el momento de realizar las dos extracciones consecutivas (4 y 2 h en la primera extracción, 2 y 1 h en la segunda).

Tras el análisis de las muestras por CG-MS se obtuvieron los perfiles indicados en la **tabla 4.18**, con sus porcentajes relativos dentro de cada muestra. Cabe mencionar que los tiempos de retención, así como los índices experimentales de Van den Dool y su respectiva comparación con los índices teóricos de la librería NIST, se encuentran indicados en el **anexo I, tabla A1.1**.

Tabla 4.18. Porcentajes relativos de los terpenos identificados en los residuos de mandarina 2018, tras la aplicación de diferentes pretratamientos físicos (trituration mecánica y doble trituration en frío) y enzimáticos (mezcla de celulasa ID y pectinasa ID), tras la etapa de extracción empleando la mezcla de hexano/dietil éter 9:1. Se incluyen los resultados obtenidos en los dos tiempos de agitación empleados en la etapa de extracción consecutiva.

Terpeno	PEM-18		PNEM-18		C-18		CDN-18		CEM-18		CDNEM-18	
	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**
α -Pinoeno	2,55	1,77	2,75	1,66	1,55	1,62	2,21	2,02	1,7	2,00	0,64	0,65
Sabineno	0,64	1,03	0,64	1,03	0,81	0,95	0,60	0,64	0,55	0,65	0,20	0,12
β -Pinoeno	0,20	0,17	0,39	0,16	0,16	0,15	0,07	0,07	0,10	0,12	5,92	5,33
β -Mirceno	5,92	4,59	6,28	4,48	3,61	4,05	6,54	5,93	4,80	5,33	0,14	0,14
α -Felandreno	0,14	0,14	0,12	0,12	0,11	0,12	0,18	0,15	0,14	0,14	-	0,04
α -Terpineno	-	-	0,04	-	-	-	0,03	0,03	0,03	0,04	88,77	89,73
Limoneno	88,77	90,61	86,23	90,23	91,59	90,88	88,88	89,4	90,31	89,73	0,11	0,20
β -Ocimeno	0,11	0,15	0,15	0,13	0,05	0,12	0,21	0,23	0,19	0,20	0,56	0,55
γ -Terpineno	0,56	0,86	2,13	0,87	0,76	0,74	0,10	0,09	0,64	0,55	0,05	0,04
Terpinoleno	0,05	-	0,09	-	-	-	0,03	0,03	0,05	0,04	0,45	0,31
Linalool	0,45	0,05	0,49	0,61	0,68	0,68	0,20	0,22	0,35	0,31	0,03	-
Oxido de limoneno	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-
Citronelal	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23	0,12
(-)-Terpinen-4-ol	0,23	0,07	0,18	0,07	0,07	0,08	0,09	0,11	0,13	0,12	0,29	0,31
α -Terpineol	0,29	0,56	0,21	0,64	0,59	0,62	0,34	0,5	0,34	0,31	-	-

Tras observar los perfiles obtenidos, se puede evidenciar que se presentan diferencias. Lo que indica que los pre-tratamientos tienen efectos sobre los compuestos que se extraen de las muestras cuando se aplica alguno de estos. Si bien es cierto que se identifican compuestos que no se habían identificado en los perfiles de las muestras extraídas sin pre-tratamiento, los porcentajes relativos son menores a 0,5 %, de forma que no representarían una fuente importante de aromas.

Sin embargo, en el caso, por ejemplo, del compuesto α -pineno, aquellas muestras en las que se emplearon enzimas, los valores de los porcentajes relativos resultaron ser mayores ($\geq 2\%$) que en las muestras en las cuales no se emplearon (1,5-1,7%). Una situación contraria se evidenció con el sabineno, cuyos porcentajes fueron mayores en las muestras en las cuales se emplearon pre-tratamientos físicos únicamente (0,8-1%) frente a aquellas en las que se emplearon enzimas (0,5-0,6%). Otro aspecto que se observó, fue en el caso del mirceno, del cual se obtuvo un mayor porcentaje, al aplicar pre-tratamientos enzimáticos y físicos en ausencia de trituración en frío (5,9-6,5%), frente a aquellos que incluían el enfriamiento de la muestra con nitrógeno líquido (3,6-4,8%). Como comentario general se pudo observar que al aplicar pre-tratamientos enzimáticos el número de compuestos que se obtiene es mayor, no obstante, los perfiles en cuanto al interés en la extracción de aromas, se mantiene en los compuestos mayoritarios limoneno, α -pineno, mirceno, γ -Terpineno, α -Terpineol y linalool.

Ahora bien, al observar de forma general los datos de las extracciones de todas las muestras, se logró extraer una concentración expresada en porcentaje relativo de limoneno por encima del 86%, concentración que coincide con lo indicado en la bibliografía consultada (Dugo *et al*, 2005; Muhoho *et al*, 2004) para este tipo de residuos, y para los diferentes tipos de mandarina, siendo éste el compuesto mayoritario (y el compuesto de interés en este proyecto).

Finalmente, otra anotación que cabría resaltar, está relacionada con los tiempos de extracción evaluados en las muestras en las cuales se aplicó este factor, no se evidenció un efecto en la extracción de uno u otro compuesto, ya que los resultados entre un perfil u otro para la misma muestra pre-tratada, fueron similares en todos los casos.

Después de obtener los perfiles cromatográficos, se calcularon las cantidades de los principales terpenos identificados (y de los que se contaba con patrón) en todas las muestras. Los resultados se expresaron en mg/g de RS, con el fin

de mantener un mismo parámetro de comparación entre todas las muestras, tal y como se realizó con la cuantificación de las muestras de los lotes 2016, 2017 y 2018 sin pretratamientos, se tuvo en cuenta el porcentaje de humedad de cada muestra. En la tabla **4.19** se indican los valores obtenidos para cada muestra.

Tabla 4.19. Miligramos por gramo de residuo seco (mg/g RS) de los terpenos cuantificados en los residuos de mandarina 2018, tras la aplicación de diferentes pretratamientos físicos (trituration mecánica y doble trituración en frío) y enzimáticos (mezcla de celulasa ID y pectinasa ID), tras la etapa de extracción empleando la mezcla de hexano/dietil éter 9:1. Se incluyen los resultados obtenidos en los dos tiempos de agitación empleados en la etapa de extracción consecutiva.

Terpeno	PEM-18		PNEM-18		C-18		CDN-18		CEM-18		CDNEM-18	
	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**	4/2*	2/1**
Limoneno	9,746	9,838	8,019	7,467	3,959	4,531	27,068	24,947	12,898	18,327	12,898	18,327
α -Pinoeno	0,416	0,323	0,212	0,212	0,163	0,204	0,424	0,552	0,408	0,531	0,408	0,531
β -Mirceeno	0,739	0,647	0,552	0,509	0,367	0,449	1,400	1,273	0,776	1,102	0,776	1,102
β -Pinoeno	0,924	0,600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Felandreno	0,277	0,185	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalool	0,370	0,231	0,679	0,594	0,694	0,653	0,339	0,339	0,367	0,327	0,367	0,327
α -Terpineol	0,554	0,323	0,891	0,891	0,898	0,857	0,552	0,552	0,490	0,531	0,490	0,531
TOTAL	13,025	12,148	10,352	9,673	6,082	6,694	29,784	27,662	14,939	20,816	14,939	20,816

*4 H de agitación durante la primera extracción y 2 h durante la segunda.

**2 H de agitación durante la primera extracción y 1 h durante la segunda.

En el caso de las muestras PEM-18 y PNEM-18 los tiempos de extracción consecutiva fueron de 2 y 1 h
 PEM-18: Residuo húmedo del lote M2018 pre-tratado con una mezcla de enzimas; PNEM-18: Residuo enfriado con nitrógeno líquido y pre-tratado con una mezcla de enzimas C-18; Residuo triturado mecánicamente; CDN-18: Residuo triturado mecánicamente y posteriormente triturado de forma manual en frío con nitrógeno líquido; CEM-18: Residuo triturado mecánicamente y pre-tratado con una mezcla de enzimas; CDNEM-18: Residuo triturado mecánicamente, posteriormente triturado en frío con nitrógeno líquido y pre-tratado con una mezcla de enzimas

Como se observa, los resultados obtenidos, coinciden con las apreciaciones realizadas en los perfiles obtenidos mediante CG-MS de cada muestra analizada, tal y como se esperaba.

La mayor cantidad de terpenos se extrajeron de la muestra CEM-18 en los dos tiempos de extracción evaluados (29,7 y 27,6 mg/g RS respectivamente). Así como de limoneno, ya que se lograron extraer cerca de 27 mg/g de residuo húmedo cuando se empleó un mayor tiempo de agitación (4/2) y aproximadamente 25 mg/g de residuo húmedo cuando se empleó un tiempo menor (2/1). Estos valores claramente son mayores que los obtenidos en los ensayos iniciales cuando se empleó el residuo sin ningún pre-tratamiento y el mismo disolvente de extracción empleado en este caso, cuyo valor fue de aproximadamente 15 mg/g de residuo seco (**tabla 4.5**).

Por lo tanto, el rendimiento final de extracción del limoneno estaría siendo del 7,4 ‰ frente al 3,4 ‰ conseguido en las muestras sin pre-tratamiento. Este nuevo rendimiento superaría a algunos que se han reportado empleando otras metodologías como arrastre de vapor, destilación y microondas etc., que no han superado el 1,5‰ (Shakir y Salih, 2015; Navarrete 2010). Incluso superior al reportado por una empresa que ha empleado este tipo de residuos, tal y como se mencionó en apartados anteriores. En este sentido, se estaría mejorando la extracción de aromas.

En cuanto a los compuestos linalool y α -terpineol por el contrario a lo observado con el limoneno y mircenol, se evidenció, que se extraen mejor tras pre-tratamientos físicos de trituración mecánica y trituración manual en frío (0,59-0,69 mg/g RS y 0,85-0,89 mg/g RS, respectivamente) que cuando se aplica sobre estos la acción enzimática, pues no se obtienen más de 0,37 mg/g RS en el caso del linalool y 0,55 mg/g RS en el caso del α -terpineol.

En este contexto, se podría pensar que el mejor mecanismo para obtener la mayor cantidad de compuestos empleando los residuos del lote de 2018 de mandarina, podría ser empleando enzimas sobre las muestras trituradas. Sin embargo y observando los perfiles obtenidos en cada uno de los pretratamientos, los métodos probados se podrían aplicar en función al perfil de aromas que se deseen obtener y/o a la cantidad de los mismos, haciéndolos selectivos. Sin embargo, no sobra decir, que la aplicación de pre-tratamientos físicos y enzimáticos lograron mejorar la extracción de aromas de los residuos de este lote (M-2018), específicamente de limoneno.

En lo que respecta al tiempo de agitación evaluado en la etapa de extracción, se podría decir que en general un menor tiempo de agitación sería adecuado

para obtener una cantidad superior de terpenos, sobre estos residuos (dos horas en la primera fase extractiva y una hora en la segunda), aspecto que sin duda implicaría mayor celeridad en el proceso y un ahorro en los costos del mismo.

Con esta parte se da por terminada la etapa de extracción a pequeña escala y se continua con la propuesta de la extracción en escala pre-piloto.

4.1.3. Escalado pre-piloto del proceso de extracción del aceite esencial de los residuos de mandarina de los lotes 2016 y 2018

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento a escala laboratorio con los residuos de mandarina de los tres lotes (M-2016, M-2017 y M-2018) con sus respectivos pre-tratamientos. Se decidió realizar un proceso de escalado pre-piloto, siguiendo las condiciones que pudiesen escalarse y empleando los residuos que estuviesen a disposición y representasen ser una fuente de aromas. En el esquema de la **figura 4.8**, se resalta la parte correspondiente a los resultados que se mostrarán y se discutirán a continuación.

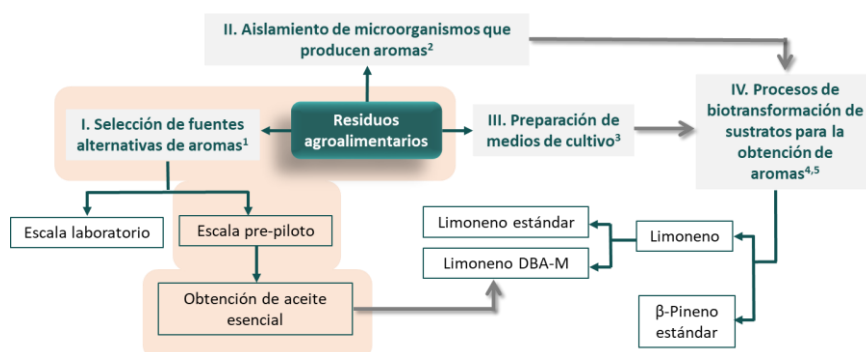


Figura 4.8. Esquema general del proyecto de investigación. Se indican los cuatro ejes que relacionan el uso directo o indirecto de residuos y se incluyen las citas de los apartados correspondientes a los métodos aplicados en cada etapa. En el esquema se resalta la parte que corresponde a los resultados y discusión, de la parte correspondiente a los ensayos a escala pre-piloto. ¹ 3.2.2 **Figura 3.1**; ² 3.2.3; ³ 3.2.4; ⁴ 3.2.5.1; ⁵ 3.2.5.2 **Figura 3.9**.

El escalado se llevó a cabo en tres etapas: extracción en reactores de 2 L de capacidad, concentración del extracto y obtención del aceite esencial y la última caracterización del aceite esencial.

Para ello se emplearon los residuos húmedos del lote M-2016 (RH-16) y los residuos del lote M-2018, triturados mecánicamente (C-18). En este último caso en particular, se seleccionaron estos residuos con pre-tratamiento físico únicamente, dado que, llevar el proceso a escala pre-piloto resultaba ser viable, en comparación con el pre-tratamiento enzimático, que si bien es cierto presentaba un mejor rendimiento, no se tenían las condiciones físicas para escalarlo.

Adicionalmente cabe recordar que los residuos del lote de mandarina M-2017, se descartaron como una fuente de extracción de aromas, dada las bajas cantidades extraídas de limoneno y otros compuestos, mediante disolventes y pre-tratamientos enzimáticos.

4.1.3.1. Extracción en reactor de 2 L de capacidad

En esta etapa de extracción, se llevaron a cabo dos procesos de extracción. Uno empleando los residuos húmedos de mandarina RH-16, y otro empleando los residuos triturados de mandarina C-18. Los procedimientos correspondieron a los numerales 3.2.2.3.1 y 3.2.2.3.2 respectivamente, descritos en el apartado correspondiente a los métodos. Cabe recordar que se realizaron tres extracciones consecutivas de cada muestra. Es decir, sobre cada residuo se realizaron tres extracciones cada 24 horas con una mezcla de disolvente Hex/dee 9:1. Por lo que se iban teniendo extractos de 800 mL en cada una de estas. En total se obtuvieron seis (tres para cada residuo). Se decidió realizar este grupo de tres extracciones seguidas en cada residuo, ya que en los ensayos a escala laboratorio el rendimiento de las extracciones se había mejorado al realizar hasta dos extracciones de forma consecutiva, de forma que, al emplear una tercera en este proceso a gran escala se estaría de alguna forma extrayendo el máximo posible. Para el análisis cromatográfico CG-MS se mezclaron alícuotas de los tres extractos para cada residuo y se obtuvo el perfil correspondiente, en el caso del análisis mediante CG-FID, se cuantificaron los compuestos presentes en cada extracto, por separado y para determinar los totales, se sumaron las cantidades obtenidas individualmente.

Tras análisis cromatográfico por CG-MS, se obtuvo el perfil general de los terpenos recuperados. En la **tabla 4.20** se resumen los compuestos identificados con sus respectivos porcentajes relativos.

Tabla 4.20. Porcentajes relativos de los terpenos identificados mediante CG-MS tras el escalado pre-piloto de extracción, de las muestras de los residuos de mandarina de los lotes 2016 y 2018 empleado un reactor de 2L de capacidad.

Terpeno	Residuo	
	RH-16	C-18
α -Tujeno	0,27	-
α -Pineno	1,64	2,26
α -Sabineno	0,30	1,17
β -Pineno	0,43	0,09
β -Mirceno	3,14	6,46
α -Felandreno	0,10	0,16
Limoneno	88,01	88,83
α -Terpineno	0,06	-
Ocimeno	0,12	0,21
γ -Terpineno	4,29	-
α -Terpinoleno	0,12	-
Linalool	0,82	0,27
(-)-Terpinen-4-ol	0,14	0,04
α -Terpineol	0,55	0,52

RS-16: Residuos húmedos de mandarina del lote 2016; C-18: Residuos húmedos triturados mecánicamente del lote M-2018

Como se observa, el perfil de las muestras es diferente en composición, coincidiendo con los resultados obtenidos en los ensayos a escala laboratorio, donde al igual que en este caso, se obtuvieron un mayor número de compuestos de los residuos del lote 2016 frente a los obtenidos en el lote 2018. En cuanto a los porcentajes relativos, los valores fueron similares también- De manera tal, que el proceso de escalado no ha afectado en este sentido los resultados obtenidos en escala laboratorio. Incluso para el limoneno, cuyo porcentaje relativo estuvo alrededor del 88% en los perfiles correspondientes a los dos residuos, frente al 90% obtenido en los ensayos a menor escala.

A modo de comentario general, cabría mencionar la ausencia de γ -terpineno en la muestra M-2018 a diferencia de lo que se observó a escala laboratorio, en donde se obtuvo alrededor de un 0,86%. Esta situación pudo deberse posiblemente a dos opciones. Por un lado, es probable que este compuesto se haya transformado, ya que es un terpeno que presenta una gran facilidad para formar isómeros como limoneno, incluso algunos estudios lo han

demostrado (Retajczyk y Wróblewska, 2017; Malko y Wróblewska, 2016; McGraw 1999). Otra posibilidad podría estar relacionada con la pérdida de este compuesto durante el proceso de extracción, que resultaría lógica, dada la volatilidad de este, sin embargo, se evidenciaría una pérdida también en cuanto a la identificación de otros compuestos molecularmente similares a este.

Tras la obtención del perfil de los extractos obtenidos, se obtuvo la cantidad en miligramos de los principales compuestos identificados, para cada extracción consecutiva y para cada residuo tal y como se indica en el Anexo III, tabla A3.1. Con estos resultados fue posible determinar la cantidad de terpenos totales extraídos durante todo el proceso y a su vez se determinó la cantidad de miligramos de cada compuesto por cada gramo de residuo seco, como se registra en la **tabla 4.21**.

Tabla 4.21. Miligramos totales y miligramos por gramo de residuo de los principales terpenos cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de extracción de los residuos de mandarina de los lotes 2016 y 2018 en la etapa de escalado pre-piloto, empleando un reactor de 2L de capacidad.

Terpeno	RH-16		C-18	
	mg totales	mg/residuo seco	mg totales	mg/residuo seco
α -Pino	18,99	0,39	20,78	0,24
β -Pino	60,34	1,23	58,53	0,68
β -Mirceno	41,37	0,84	47,93	0,56
α -Felandreno	9,46	0,19	25,84	0,30
Limoneno	2367,93	48,22	1982,00	22,99
Linalool	13,32	0,27	16,97	0,20
α -Terpineol	25,41	0,52	25,82	0,30
TOTAL	2536,82	51,66	2177,87	25,27

RS-16: Residuos húmedos de mandarina del lote 2016; C-18: Residuos húmedos triturados mecánicamente del lote M-2018

Se logró extraer una mayor cantidad de terpenos totales de los residuos de mandarina RH-16, tal y como se había observado en los resultados a escala laboratorio. En este caso se obtuvieron alrededor de 51 mg/g RS del residuo RH-16 y 25,2 mg/g RS del residuo C-18.

Al observar los datos correspondientes al limoneno, se evidenció un aumento en las cantidades extraídas de los dos lotes a escala pre-piloto, frente a las cantidades extraídas a escala laboratorio. Por ejemplo, en el caso de los residuos RH-16, se obtuvieron alrededor de 48 mg/g RS y 34 mg/g RS respectivamente. Así mismo ocurrió con el limoneno extraído de los residuos del lote M-2018, pues se obtuvieron del escalado alrededor 23 mg/g RS, un valor que resulto ser, por un lado, cercano al máximo valor obtenido de las extracciones en este lote de residuos, específicamente al emplear el residuo CEM-18 (**tabla 4.19**), del cual se obtuvo 27 mg/g RS y por otro lado superior, a los valores al emplear los residuos P-18 y C-18, cuyas cantidades fueron 15 mg/g RS (**tabla 4.5**) y 8 mg/g RS (**tabla 4.19**), respectivamente. Con estas observaciones quedo claro que el proceso, así como las condiciones del mismo, permitieron extraer de los residuos de mandarina empleados, cantidades similares a las obtenidas a escala laboratorio, incluso mayores en algunos casos.

Por otro lado, se puede observar que, otros compuestos como α -pineno, β -mirsceno, α -felandreno y linalool se extrajeron de forma similar y en algunos casos en mayor cantidad, de los residuos C-18 al compararlos con los resultados registrados a escala laboratorio y descritos en la tabla 4.19. Con lo que se podría confirmar que se estaría mejorando la extracción de este grupo de aromas al escalar el proceso. Lo que se vería reflejado en los distintos toques aromáticos que la presencia de estos compuestos le aportaría al extracto final.

Finalmente se puede decir que el rendimiento de extracción del limoneno, en este proceso hasta este punto, fue aproximadamente de 6,7‰, un valor superior al obtenido empleando el mismo residuo a escala laboratorio (3,4 ‰) y muy cercano al máximo obtenido tras la evaluación de pre-tratamientos físicos y enzimáticos sobre los residuos del lote de M-2018. Específicamente sobre aquellos que fueron pre-tratados con enzimas y triturados mecánicamente CEM-18 (7,4 ‰).

Como como se describió en los métodos en el apartado correspondiente a los métodos (3.2.2.2.4) y como se mencionó en el inicio de este numeral, se obtuvieron tres extractos de cada uno de los dos procesos de extracción, tanto para el residuo RH-16, como para el residuo C-18, (en total seis), con un volumen individual de aproximadamente 800 mL (cabe mencionar que este volumen es aproximado, ya que durante el proceso y el cambio de disolvente se perdieron aproximadamente 50 mL de cada uno), de forma que se contaba con un volumen total 4,5 L aproximadamente. Teniendo en

cuenta cantidad de extracto y que la etapa siguiente consistía en concentrarlo, hasta conseguir el aceite esencial libre de disolvente. Se hizo necesario evaluar la posibilidad de seleccionar aquellos extractos que presentaran una mayor cantidad de limoneno (se elige este terpeno como referencia, al ser el compuesto extraído mayoritariamente), con el fin de manejar un volumen menor en el proceso de concentración. En la **tabla 4.22** indican las cantidades de limoneno cuantificadas en cada uno de los extractos para cada residuo.

Tabla 4.22. Miligramos totales cuantificados en cada extracto proveniente de las tres etapas de extracción consecutiva, cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de extracción de los residuos de mandarina de los lotes 2016 y 2018 en la etapa de escalado pre-piloto, empleando un reactor de 2L de capacidad.

Compuesto	RH-16			C-18		
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
Limoneno	1548,64	480,12	339,17	1155,15	486,25	340,60

RH-16: Residuos húmedos de mandarina del lote 2016; C-18: Residuos húmedos triturados mecánicamente del lote M-2018.

De acuerdo con estas cantidades, se seleccionaron los extractos de la 1ª y 2ª extracción para cada residuo. Pues tal y como se observa en la **tabla 4.22** la mayor cantidad de limoneno extraída de los residuos R-H16 y C-18, se obtuvo tras la primera y la segunda de las tres extracciones consecutivas llevadas a cabo en cada proceso., representando entre 65-58% y entre un 20-25% respectivamente. Entre los extractos seleccionados se obtuvo un total de 3 L, que posteriormente fueron usados en la etapa de concentración.

Ahora bien, con el fin de controlar el rendimiento del proceso de concentración hasta obtener el aceite esencial de los residuos, se calcularon las cantidades totales de los principales terpenos contenidos en el volumen de extracto seleccionado. Estos valores fueron obtenidos sumando las cantidades extraídas en la 1ª y 2ª para los dos residuos. En la **tabla 4.23** se indican las cantidades de los principales terpenos, contenidas en los 3 L de extracto.

Tabla 4.23. Miligramos totales de terpenos cuantificados en el volumen final (3L) de los extractos seleccionados tras el proceso de extracción en escala pre-piloto de los residuos de mandarina del lote M-2016 (RH-16) y M-2018 (C-18).

Terpeno	mg totales
α -Pino	39,77
β -Pino	118,87
β -Mirce	81,72
α -Felandreno	35,30
Limoneno	4010,77
Linalool	26,40
α -terpineol	51,24

Como se observa, dentro de los extractos seleccionados, se tenían alrededor de 4 g de limoneno en un volumen total de 3L. Pese a que es el compuesto mayoritario, cabe resaltar la cantidad de compuestos como: β -pino (118,87 mg), β -mirce (81,72 mg) y α -terpineol (51,24 mg) ya que son compuestos también de interés en la industria de fragancias y aromas.

4.1.3.2. Concentración de los extractos obtenidos tras el proceso de escalado

Siguiendo el proceso descrito al inicio de este numeral, se continuo con la segunda etapa para la obtención del aceite esencial extraído de los residuos de mandarina (RH-16 y C-18). La cual consistió en la concentración de los 3L del extracto final resultante del escalado. Tal y como se describe en el apartado de métodos (3.2.2.3.3.1), esta etapa se dividió en dos fases de destilación del disolvente. Una de ellas llevada con un destilador de gran capacidad en el campus de la Universidad de Lleida situado en Igualada y otra fase en el DBA.

En la primera etapa de destilación del disolvente, se obtuvieron aproximadamente 150 mL de fracción concentrada. la cual fue analizada mediante técnicas cromatográficas, para obtener por un lado el perfil (CG-MS) y por otro la cantidad de limoneno y demás terpenos (CG-FID).

En la **tabla 4.24**, se indican los diferentes terpenos identificados con sus respectivos porcentajes relativos. Cabe recordar que los tiempos de retención, los índices de Van den Dool teóricos y experimentales, que permitieron identificar los terpenos en las muestras, se encuentran en el **Anexo I, tabla A1.1**.

Tabla 4.24. Terpenos identificados la fracción concentrada (150 mL) obtenida tras la primera etapa de concentración, a partir del extracto resultante de la extracción en escala pre-piloto (3L) de los residuos de mandarina RH-16 y C-18. Con sus respectivos porcentajes relativos Empleando CG-MS.

Compuesto	%	Compuesto	%
α -Pino	1,34	Alaoromadendreno	tr
β -Pino	0,71	Humuleno	0,02
β -Mirreno	3,75	β -Selineno	tr
Limoneno	91,95	β -Cubebeno	tr
Terpinoleno	0,06	Eremofieno	0,17
Linalool	0,21	β -Cadineno	tr
(-)-Terpinen-4-ol	0,04	7-epi- α -Selineno	tr
α -Terpineol	0,38	o-Ment-8-eno-4-metanol	tr
Citronelol	0,02	β -Sinesal	0,05
Carvona	0,02	α -Sinensal	0,19
Peril aldehído	tr	Nootkatona	tr
m-Mentha-1,8-dieno	tr	Ester metílico del ácido linoleico	0,02
Peril alcohol	tr	Ester metílico del ácido (E)-9-octadecenoico	0,03
α -Terpineno	tr	Ácido linoleico	0,71
2,6-dimetil-2,6-octadieno	tr	Gliceril 2-palmitato	tr
Neril ester	0,02	Ácido 9,12-octadecadienoico	tr
Acetato de geranilo	tr	Escualeno	0,04
α -Copaeno	0,02	Campesterol	0,02
β -Cubebeno	0,03	Stigmasterol	tr
Cariofileno	tr	γ -Sitosterol	0,08
cis- β -Farneseno	tr		

tr: $\leq 0,01$

Se identificaron alrededor de 41 compuestos, además de los terpenos esperados, se identificaron trazas de ácidos grasos y otros compuestos que hasta el momento no se habían identificado. Esto podría deberse a que en el proceso de destilación se elevó la temperatura y pudo permitir la oxidación de algunos compuestos. A su vez, al concentrar la muestra se hace más sencillo detectar aquellos compuestos que están en cantidades muy pequeñas en las pieles de la mandarina. Los compuestos identificados han estado descritos en la bibliografía como componentes de las pieles de mandarina (Muhoho *et al*, 2004; Dugo *et al*, 2005; Djas *et al*, 2016; Stark *et al*, 1995).

Cabe mencionar que el porcentaje relativo de limoneno en la muestra es del 91.95% respecto a los demás compuestos extraídos e identificados.

Tras la cuantificación de los principales compuestos identificados, se estimó la cantidad de limoneno y otros terpenos en el concentrado, así mismo fue posible calcular el rendimiento de la extracción para cada uno de estos terpenos, este último se calculó teniendo en cuenta la cantidad inicial contenida de cada uno de ellos en el volumen total muestra que se utilizó para la concentración (**tabla 4.23**). En la **tabla 4.25** se registran los resultados obtenidos.

Tabla 4.25. Cantidad en miligramos de los principales terpenos identificados en la fracción concentrada (150 mL) obtenida tras la primera etapa de concentración, a partir del extracto resultante de la extracción en escala pre-piloto (3L) de los residuos de mandarina RH-16 y C-18. Con sus respectivos porcentajes de recuperación. Empleando CG-FID.

Terpeno	mg	% recuperación
α -Pinoeno	17,39	43,73
β -Pinoeno	37,31	37,73
β -Mirceeno	32,02	39,18
α -Felandreno	18,08	51,22
Limoneno	3032,37	75,61
Linalool	6,77	25,62
α -Terpineol	44,08	86,03

Se observa que, tras el primer proceso de concentración, la recuperación de cada terpeno varió. En el caso de los compuestos α -terpineol y limoneno se recuperó un porcentaje elevado (86 y 75%) mientras que la recuperación de

otros compuestos se situó entre un 25 y un 50% aproximadamente. Pese a la pérdida evidente de la cantidad de algunos terpenos, es importante resaltar que se logró un 75% de recuperación de limoneno durante esta primera fase.

Teniendo un volumen de 150 mL de concentrado, se hizo necesario llevar a cabo un segundo proceso de destilación del disolvente, de forma que, el resultado final, correspondiese única y exclusivamente al aceite esencial de los residuos de mandarina R-16 y C-18. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el numeral 3.2.2.3.3.1 del apartado de métodos. En este caso se empleó un sistema de destilación de menos tamaño que el usado en la primera etapa.

Ahora bien, durante esta segunda fase de destilación del disolvente, se obtuvieron alrededor de 10,5 g de aceite esencial, que correspondieron a 14 mL aproximadamente. Por lo que, teniendo en cuenta que la cantidad total de residuo empleada (RH-16 y C-18) fueron 700 g el rendimiento en la obtención de este aceite fue del 1.4%. Este valor, está dentro del rango de rendimiento (entre 0.1 y 3%) que se obtiene en la extracción de aceite de mandarina cuando se emplean las frutas (Londoño, 2012) y no los residuos agroindustriales como ha sido en este caso.

Cabe resaltar, que el rendimiento de extracción en este proceso de escalado, estuvo por encima de los rendimientos reportados en procesos convencionales de extracción de aceites esenciales de pieles de mandarina o residuos de la misma. Por ejemplo, mediante la hidrodestilación clásica o el prensado en frío de las pieles, los rendimientos no superan el 0,2% y 0,05% respectivamente (Ferhat 2006; Merle 2004; Blanco 1995) y empleando arrastre de vapor clásico o asistido con microondas de las pieles y/o de algunos residuos, los valores se encuentran entre 0,07 -1,1% (Bousbia 2009; Navarrete 2010; Shakir y Salih 2015). Por lo tanto, gracias a este estudio, se estaría demostrando que el rendimiento de extracción del aceite esencial de los residuos, mediante los protocolos llevados a cabo se habría mejorado. No obstante, para realizar tal afirmación, se hace necesario, por un lado, obtener de nuevo el perfil de los aromas y otros compuestos en el aceite obtenido, por otro lado, la cuantificación de los principales terpenos y finalmente la caracterización del mismo, tal y como se explicará más adelante.

A partir de estas observaciones, se procedió a identificar el perfil del aceite obtenido de los residuos (DBA-M) mediante CG-MS, sin embargo, con el fin de poder conocer si el aceite obtenido, cumplía o no con las características de algunos de los aceites comerciales, obtenidos mediante técnicas

convencionales, CARINSA suministroo una muestra de un aceite esencial comercial (CAR-M), conocido por ellos. En la **figura 4.9** se indican los perfiles de los dos aceites con los principales compuestos identificados.

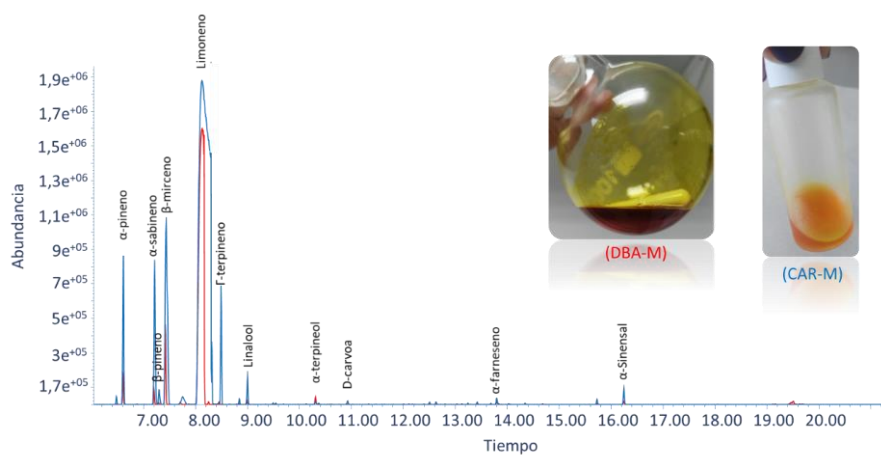


Figura 4.9. Compuestos identificados por CG-MS en las muestras del aceite de mandarina extraído de los residuos (DBA-M) y del aceite comercial suministrado por CARINSA (CAR-M).

Tal y como se ve en la **figura 4.9**, la señal predominante corresponde al limoneno en los dos aceites ya que es el terpeno que se encuentra en una mayor cantidad en mandarinas. Sin embargo, al comparar el resto de señales de los terpenos identificados se ve claramente que en el aceite de mandarina comercial (CAR-M en azul, **fig. 4.9**) se identifica un mayor número de compuestos y las señales son más intensas que en el aceite obtenido de los residuos (DBA-M en rojo, **fig. 4.9**). Esto puede indicar que posiblemente el aceite obtenido de los residuos sea relativamente más puro en cuanto a la presencia de limoneno en relación con otros terpenos.

Esta característica, podría ser aprovechada en procesos, que requieran que la concentración de este terpeno sea mayoritaria en relación a otros compuestos que generalmente se encuentran de forma simultánea junto con este (α -pineno, sabineno, β -mirceno y γ -terpineno). Una de las aplicaciones podría ser, como sustrato en procesos de biotransformación para obtener nuevos aromas mediante el empleo de microorganismos.

A continuación, en la **tabla 4.26**, se indican los porcentajes relativos de los compuestos identificados en el perfil de los dos aceites esenciales (DBA-M y CAR-M). Cabe recordar que los tiempos de retención, así como los índices de

Van den Dool teóricos y experimentales calculados y comparados con la librería, para cada compuesto identificado, se encuentran en el **Anexo I**, tabla **A1.1**.

Tabla 4.26. Porcentajes relativos de los terpenos identificados en el aceite de mandarina obtenido a partir de los residuos de mandarina tras los procesos de extracción a escala pre-piloto (DBA-M) y del aceite comercial (CAR-M), empleando la técnica de CG-MS.

Compuesto	% relativo	
	DBA-M	CAR-M
α -Pino	1.87	3.67
β -Pino	0.90	4.37
β -Mirce	5.11	9.45
Limoneno	90.09	78.22
γ -Terpino	0.09	2.37
Terpinoleno	0.17	0.12
Linalool	0.29	0.60
(-)-Terpino-4-ol	0.04	tr
α -Terpineol	0.54	0.03
Citronelol	0.02	tr
Carvona	0.01	0.11
Peril aldehído	tr	0.01
m-Menta-1,8-dieno	0.02	0.01
α -Terpino	tr	0.01
2,6-dimethyl-2,6-Octadieno	0.01	0.02
Neril ester	0.03	tr
Acetato de geranilo	0.01	0.02
α -Copaeno	0.03	0.06
β -Cubebeno	0.04	0.06
Cariofileno	0.02	0.01
cis- β -Farneseno	0.01	0.03
Humuleno	0.03	0.06
β -Selineno	tr	0.03
Eremofileno	0.27	0.17
β -Cadineno	0.01	0.03
7-epi- α -Selineno	0.002	tr
o-Ment-8-eno-4-metanol	0.02	0.03
β -Sinesal	0.05	0.14
α -Sinesal	0.25	0.37
Éster metílico del ácido linoleico	0.03	tr
Ácido linolénico	0.02	tr

tr: $\leq 0,01$

Al observar los datos de la tabla 4.26, se evidencia que el número de compuestos identificados en la muestra de aceite extraído a partir de los residuos de mandarina (DBA-M), es mayor (en total 29) que el número de

compuestos identificados en el aceite comercial (CAR-M, 25 en total). Dentro de los compuestos identificados en el aceite proveniente de los residuos y no en el aceite comercial se encontraron: (-)-terpinen-4-ol, citronelol, neril éster, 7-epi- α -selineno, éster metílico del ácido linoleico, y ácido linolénico. Sin embargo, los porcentajes relativos de éstos dentro de la muestra con respecto al total de los identificados por esta técnica, son bajos. Situación similar se observó en los compuestos identificados únicamente el aceite comercial (CAR-M), en el que se encontró peril aldehído, α -terpineno y β -selineno también en porcentajes relativos bajos.

Por otro lado, los porcentajes relativos de otros compuestos como β -mirceno, α -pineno, β -pineno y γ -terpineno presentes en ambas muestras, fueron mayores en el aceite comercial. No obstante, en el caso del limoneno, el valor obtenido fue mayor en el aceite obtenido de los residuos de mandarina (DBA-M), alrededor de un 90%, frente a un 78% en la otra muestra (CAR-M).

Finalmente cabe mencionar que todos los compuestos identificados en las dos muestras analizadas por esta técnica han sido descritos en la bibliografía en diferentes estudios relacionados con la extracción y caracterización de los componentes de pieles y otras partes de la mandarina (Dugo, 2005; Londoño, 2012; Muhoho, 2004; He y Xiao, 2016).

En cuanto a la cuantificación de los principales compuestos mediante CG-FID, se obtuvieron resultados bastante interesantes, como se detallan en la **tabla 4.27**.

Tabla 4.27. Miligramos de terpenos cuantificados en el aceite total extraído a partir de los residuos de mandarina RH-16 y C-18. Mediante CG-FID.

Terpeno	mg
α -Pineno	8.36
β -Pineno	2.91
β -Mirceno	6.39
Limoneno	3181.58
Linalool	6.64
α -Terpineol	7.17

En los resultados de la tabla 4.27 se puede observar que la cantidad de limoneno obtenida es de 3.18 g, muy superior al resto de terpenos de la muestra. Con cantidades similares, aunque muy inferiores a la de limoneno,

se encuentran cuatro terpenos α -pineno, α -terpineol, linalool y β -mirceno. Cabe aclarar que la cantidad de limoneno recuperada en esta parte fue 15 mg mayor, debido probablemente a que, durante la segunda etapa de destilación del disolvente, en el momento de los lavados y arrastre del extracto de un recipiente a otro, se llevó a cabo empleando parte de los extractos iniciales que se habían reservado, por lo que parte del limoneno presente en este, pudo extraerse, aumentando la cantidad final de este compuesto.

Para el linalool, la cantidad extraída (6,64 mg) es prácticamente la misma que la cuantificada en el primer extracto (6,70 mg, tabla 4.25), lo que podría explicarse de la misma forma que lo que ocurrió con el limoneno, además de sugerir que en este segundo proceso de separación del disolvente, estos dos compuestos en específico se concentrarían mejor y no se perderían, como si pudo ocurrir con los demás terpenos ya que se observó como en la mayoría de ellos, la cantidad de terpeno se redujo a la mitad, por ejemplo el α -pineno del cual se obtuvo en el primer extracto alrededor de 17,3 mg (tabla 4.25) y 8 mg en el aceite DBA-M; por lo que los compuestos distintos al limoneno y al linalool son más susceptibles de ser evaporados o perdidos en el proceso.

De la misma manera se cuantificaron los compuestos en el aceite comercial CAR-M y se compararon las concentraciones (expresadas en g/L) de los diferentes terpenos identificados con el aceite obtenido de los residuos DBA-M. Los valores obtenidos se indican en la **tabla 4.28**.

Tabla 4.28. Concentración en g/L de los principales terpenos cuantificados en el aceite comercial (CAR-M) y en el aceite obtenido en el DBA (DBA-M) por la técnica de CG-FID.

Terpeno	CAR- M	DBA- M
α -pineno	6.25	0.60
β -pineno	1.13	0.21
β -mirceno	21.07	0.46
Limoneno	740.17	227.26
Linalool	3.28	0.47
α -terpineol	2.29	0.51

Como se observa en la **tabla 4.28**, es bastante mayor la concentración de los compuestos de interés identificados y cuantificados en el aceite comercial CAR-M. Sin embargo y teniendo en cuenta que el aceite obtenido por DBA es a partir de residuos, los valores no se podrían considerar negativos o bajos. Es más, el rendimiento de extracción del aceite está dentro de los valores

consultados en la bibliografía como se mencionó en apartados anteriores. Otro aspecto importante a resaltar, es que se desconoce la cantidad de mandarina empleada para la obtención del aceite comercial (CAR-M), así como su proceso de extracción, por lo que estos resultados solo permitirían como tal la comparación de perfiles y de concentración y no de un proceso, o de un mejor rendimiento etc.

4.1.3.3. Caracterización del aceite esencial obtenido de los residuos de mandarina

Con el fin de determinar si el proceso de escalado además de presentar una mejora en la extracción de aromas de los residuos, podía convertirse en una alternativa a la obtención de un aceite esencial con diversas aplicaciones. Se decidió conocer qué tipo de compuestos distintos se encontraban junto con los aromas ya identificados.

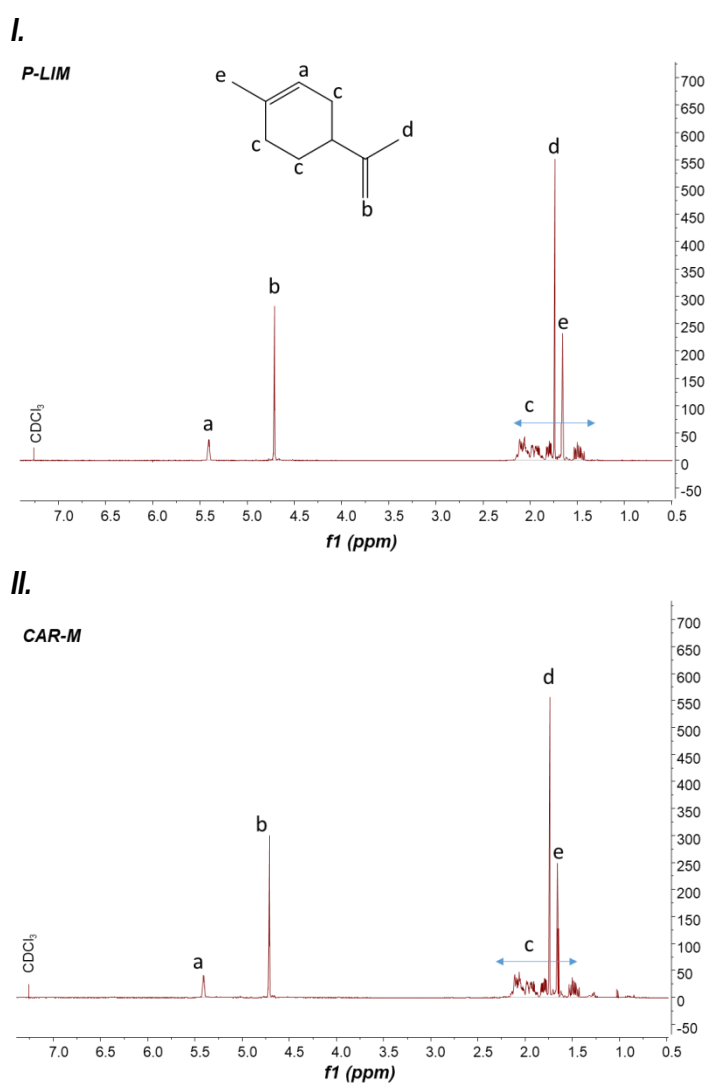
Para ello, se llevó a cabo un análisis empleando técnicas como: espectroscopia de resonancia magnética (RMN) con experimentos de análisis de protón y carbono, y así mismo, experimentos de espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), tal y como se describe en el apartado de métodos en el numeral 3.2.2.3.3.2. De forma adicional se realizaron análisis de COSY y HSQC, sin embargo, con estos, no fue posible dilucidar ningún resultado relevante.

4.1.3.3.1. Análisis de protón ^1H y carbono ^{13}C

Se realizó un análisis de protón ^1H y carbono ^{13}C , tanto del aceite obtenido de los residuos CAR-M como del aceite comercial DBA-M. De forma simultánea se realizó el análisis de un patrón de limoneno adquirido en SIGMA del 96% de pureza (P-LIM), con el fin de compararlos entre sí y poder caracterizar el aceite extraído.

En los espectros obtenidos tras el RMN- ^1H , se identificaron primero las señales correspondientes al limoneno con el fin de descartarlas y analizar la presencia de otras señales correspondientes a protones de otros compuestos extraídos de los residuos de mandarina. Para esto se utilizó como referencia el espectro obtenido con el patrón de limoneno comercial y, con la ayuda de la base de datos Spectral Database for Organic Compounds SDBS, se confirmaron las señales correspondientes a cada tipo de protón en esta molécula. Los espectros obtenidos en el análisis de protón, con las

señales características de los protones del limoneno, se muestran en la **figura 4.10**.



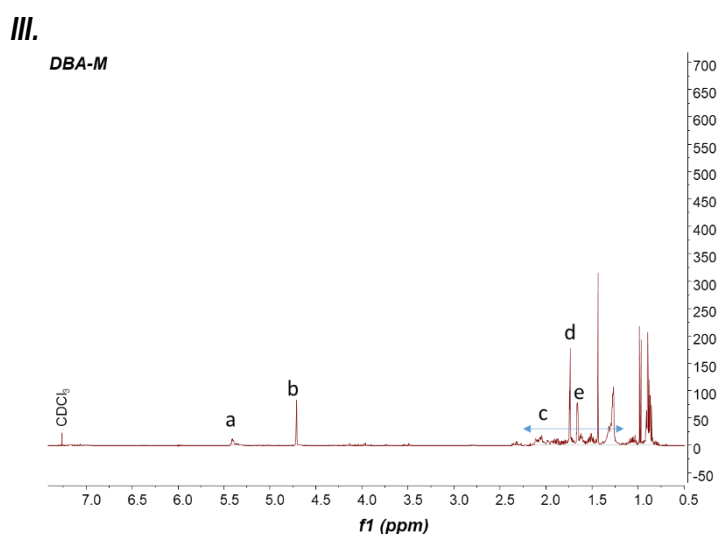


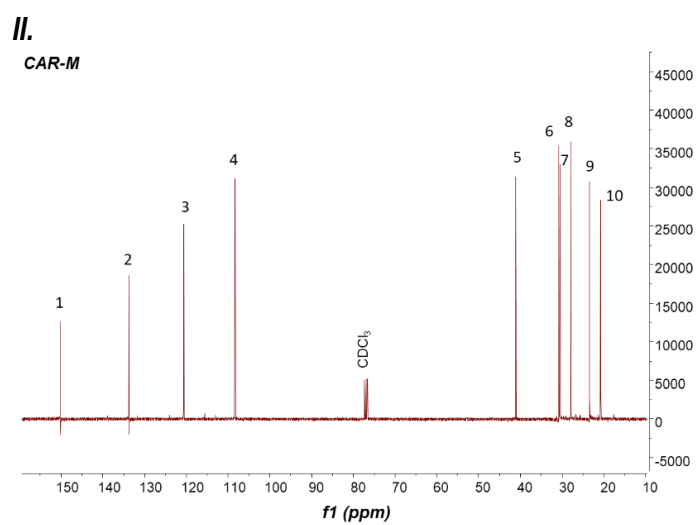
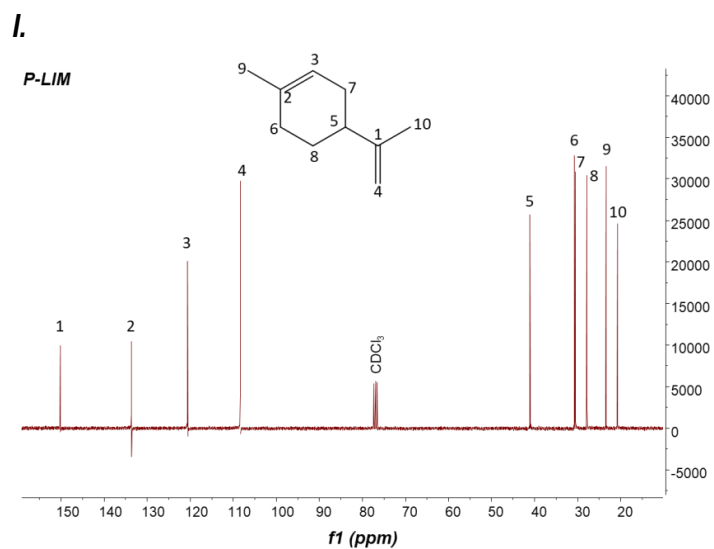
Figura 4.10. Espectros correspondientes análisis de protón por resonancia magnética nuclear RMN- ^1H , de las muestras analizadas. Con las señales respectivas a cada tipo de protón del limoneno, compuesto mayoritario en los aceites de mandarina **I.** P-LIM: Patrón de limoneno adquirido en SIGMA 96% de pureza. **II.** CAR-M: Aceite esencial de mandarina suministrado por CARINSA y **III.** DBA-M: Aceite obtenido tras los procesos de extracción en el escalado pre-piloto, empleando residuos de mandarina.

Como se observa en los espectros de la **figura 4.10**, las señales de los protones en las muestras P-LIM y CAR-M son casi iguales lo que indica que en este aceite comercial no se encuentran otros compuestos diferentes a los ya identificados por la técnica de CG-MS. La situación es diferente en la muestra de aceite DBA-M ya que, pese a tener una mayor concentración de limoneno en relación con otros compuestos terpénicos, se evidenciaron señales entre 0,7 y 1,5 ppm, algunas de ellas características de protones de CH_2 , cuya intensidad es mayor en comparación con otras no identificadas, lo que indicaría la presencia de otro tipo de compuestos además de los terpenos ya identificados por CG-MS.

En cuanto a los resultados obtenidos por RMN- ^{13}C , los resultados fueron similares. El análisis se llevó a cabo siguiendo las mismas directrices del análisis de los resultados del espectro de protón. Se compararon las tres muestras P-LIM, CAR-M y DBA-M y se dilucidaron las señales correspondientes al limoneno, no solo teniendo en cuenta el patrón sino la

confirmación de las señales en la base de datos Spectral Database for Organic Compounds SDBS.

Los espectros obtenidos con las respectivas señales identificadas y asignadas al compuesto mayoritario se indican en la **figura 4.11**.



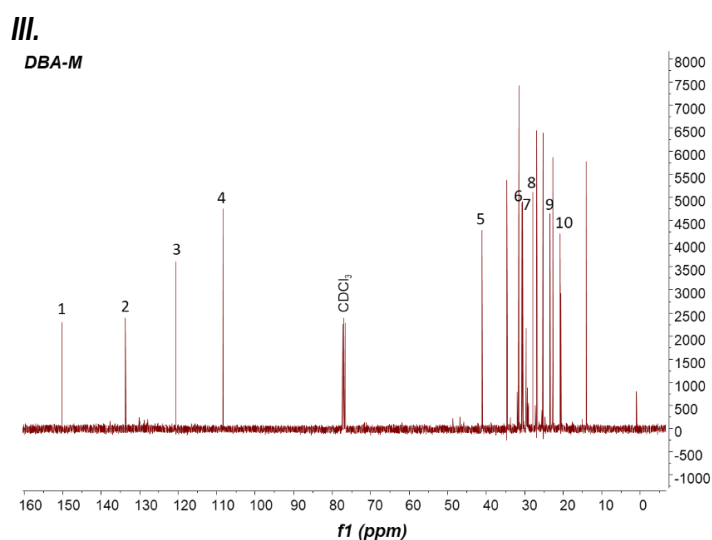


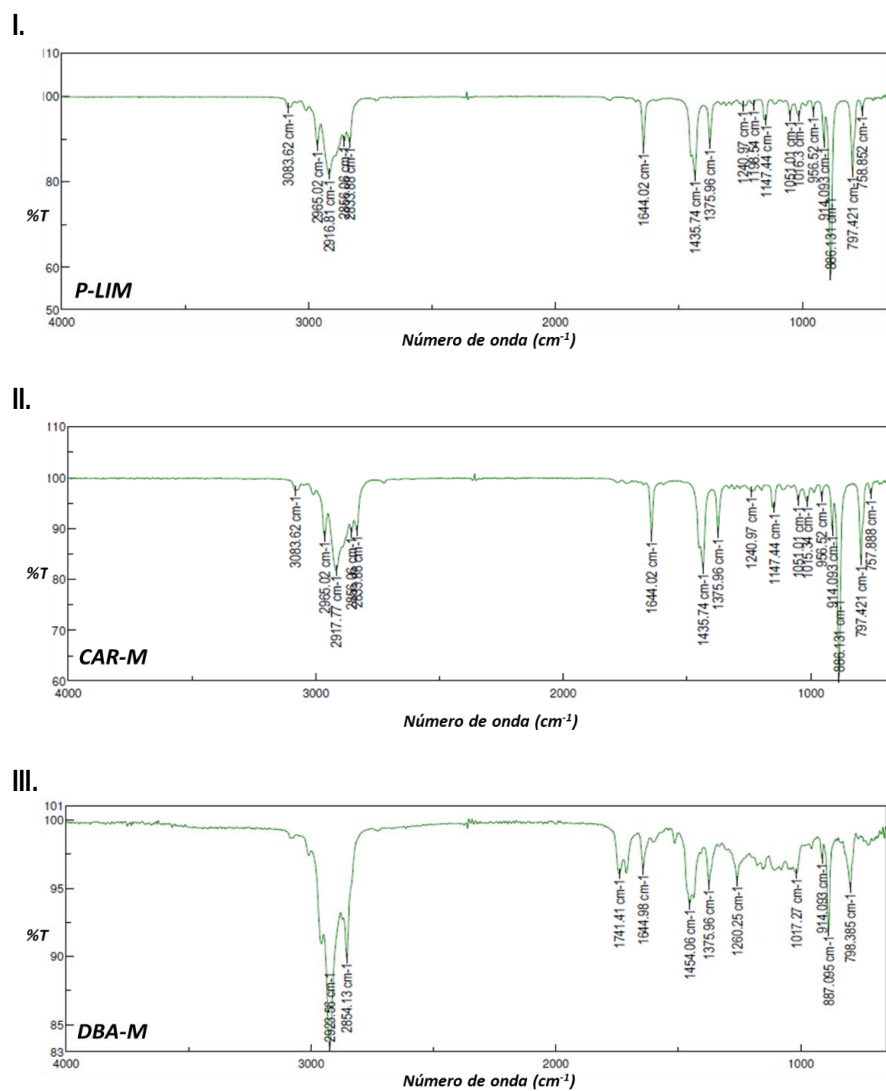
Figura 4.11. Espectros correspondientes análisis de protón por resonancia magnética nuclear RMN-13C, de las muestras analizadas. Con las señales respectivas a cada tipo de protón del limoneno, compuesto mayoritario en los aceites de mandarina **I.** P-LIM: Patrón de limoneno adquirido en SIGMA 96% de pureza. **II.** CAR-M: Aceite esencial de mandarina suministrado por CARINSA y **III.** DBA-M: Aceite obtenido tras los procesos de extracción en el escalado pre-piloto, empleando residuos de mandarina.

Como se observa, en la **figura 4.11**, los espectros de las muestras del patrón de limoneno y del aceite comercial coinciden, sin embargo, en la muestra del aceite extraído de los residuos, se evidencian además de las señales características de los carbonos del limoneno, otras que indican la presencia de hidrocarburos con carbonos de tipo CH₂.

4.1.3.3.2 Análisis de espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier FTIR.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por los métodos anteriormente mencionados, las señales con gran intensidad que confirman la presencia de CH₂ probablemente de hidrocarburos como triterpenos, limonoides etc., y la dificultad para identificar la posible presencia de ácidos, ésteres, cetonas u otros compuestos en el aceite extraído de los residuos de mandarina, se hizo necesario realizar un análisis de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.

Durante un primer análisis de las muestras se obtuvieron los espectros que se indican en la **figura 4.12**. Se pueden apreciar las señales correspondientes al limoneno, y aquellas que sugieren la posible presencia de otro tipo de compuestos. Cabe mencionar que para la comparación de las señales y su confirmación se empleó la base de datos Spectral Database for Organic Compounds SDBS.



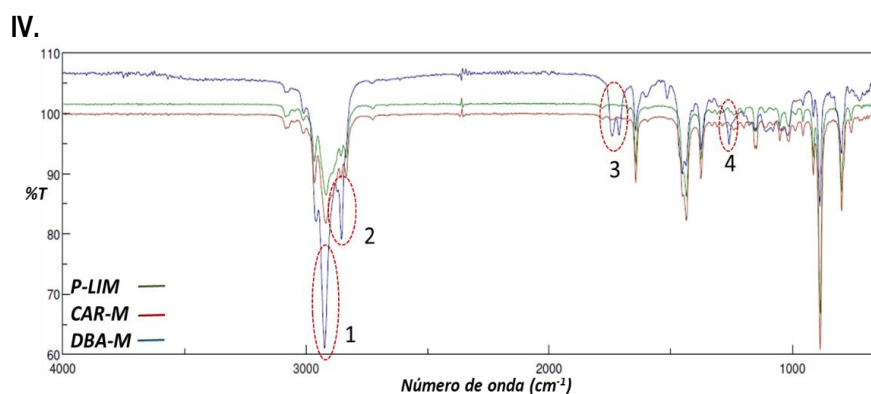


Figura 4.12. Espectros correspondientes al estudio por espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier FTIR de las muestras analizadas. I. P-LIM: Patrón de limoneno adquirido en SIGMA 96% de pureza. II. CAR-M: Aceite de mandarinas verdes suministrado por CARINSA. III. DBA-M: Aceite obtenido tras los procesos de extracción en el DBA, empleando residuos de mandarina. IV. Comparación de los espectros obtenidos en las tres muestras, donde se indican las señales distintas presentes en la muestra del aceite DBA-M.

Al observar los espectros obtenidos, se pueden hacer varias apreciaciones. Primero se evidencia que las muestras correspondientes al patrón de limoneno P-LIM y al aceite suministrado por la empresa CAR-M, presentan las mismas señales. Los espectros son casi iguales, y cada uno de los picos corresponde al compuesto limoneno, las señales además de coincidir entre sí, coinciden con los espectros de la base de datos consultados. Sin embargo, en el caso del aceite extraído de los residuos de mandarina DBA-M, se observan diferencias en las señales. Como se observa en la **figura 4.12. IV**. Las señales 1 y 2, pese a que se encuentran también en las otras dos muestras, son de mayor intensidad en este aceite, lo que confirma la presencia de un mayor número de carbonos de tipo CH_2 y CH_3 , que además de estar presentes en la molécula de limoneno, compuesto mayoritario en todas las muestras analizadas, también están presentes en otro tipo de compuestos, este aspecto concuerda con los resultados obtenidos por resonancia magnética nuclear.

Al observar la señal 3 se evidencia la presencia de carbonilos $\text{C}=\text{O}$ sobre 1741 cm^{-1} , específicamente de dos tipos. El primer pico podría corresponder a un éster, una lactona de 5 o 6 carbonos o a una ciclopentanona. También podría corresponder a un aldehído en cuyo caso debería observarse una señal sobre

2700, que en los espectros se intuye, aunque no es posible su confirmación exacta. En este caso, en los resultados de resonancia magnética nuclear debería aparecer una señal de protón sobre 8-9, que no se ve claramente. En el caso del segundo pico ocurre algo similar, ya que podría corresponder a un carboxilo. Sin embargo, no se evidencia su desplazamiento y tampoco se evidencia la señal característica de este tipo de compuestos por RMN. Esto podría deberse a que no se trate de un ácido carboxílico o que la cantidad de este tipo de compuestos sea tan baja en la muestra DBA-M que no permita evidenciar las señales de los protones por RMN tan características de estos grupos funcionales.

En cuanto al pico indicado en la señal 4, es característico de compuestos como ciclopentanonas, algunos ácidos carboxílicos y flavonas, según lo consultado en la base de datos Spectral Database for Organic Compounds SDBS.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se decidió realizar un lavado con bicarbonato sódico a una porción pequeña de la muestra de aceite DBA-M, a la que se le asignó el código DBA-MoNa. Este lavado se realizó debido a que los ácidos carboxílicos reaccionan con bases como el NaHCO_3 para formar sales, dióxido de carbono y agua como se indica en la **figura 4.13**. De esta manera, si en la muestra hubiese un ácido carboxílico, la segunda señal de uno de los tipos de carbonilo identificados sobre 1741 cm^{-1} ya no sería posible verla tras haberse formado la sal correspondiente.

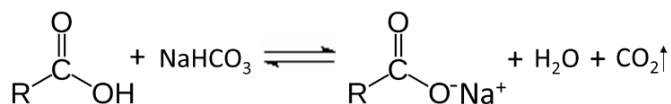


Figura 4.13. Formación de acetatos a partir de los ácidos carboxílicos y bicarbonato sódico

En la **figura 4.14** se muestra el espectro obtenido tras el estudio con FTIR de la muestra del aceite extraído de los residuos tras el lavado con bicarbonato sódico (DBA-MONa) con las señales de interés marcadas en comparación con la misma muestra de aceite sin lavado DBA-M.

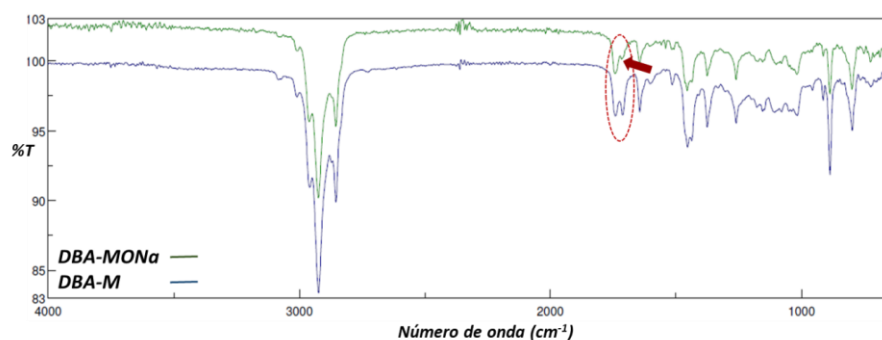


Figura 4.14. Espectros correspondientes al estudio por espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier FTIR de la muestra DBA-MONa: Aceite obtenido tras los procesos de extracción en el DBA, empleando residuos de mandarina tras el lavado durante 24 horas con bicarbonato sódico en comparación con la muestra DBA-M: Aceite extraído de los residuos de mandarina.

Como se observa en los espectros, se evidencia claramente como uno de los picos correspondientes a un tipo de carbonilo desaparece parcialmente en la muestra DBA-MONa, que ha sido sometida a un lavado con bicarbonato sódico, en comparación con la muestra sin lavar. Esta aparente disminución, puede confirmar la presencia de algún tipo de ácido carboxílico, y a su vez indicarnos la presencia de aldehídos y cetonas, cómo se indicó en apartados anteriores. Ahora bien, estas señales, que deberían haberse apreciado en los estudios por RMN, no se observaron, debido probablemente a la baja concentración de estos compuestos en la muestra.

Para poder dilucidar la naturaleza de los demás compuestos minoritarios presentes en el aceite extraído de los residuos de mandarina, se realizó una revisión bibliográfica para determinar los tipos de compuestos presentes en las mandarinas y que pudiesen corresponder a las señales encontradas por los diferentes estudios realizados hasta el momento. Hay que tener en cuenta que las mandarinas, al igual que todos los cítricos, están constituidas por diferentes partes, dentro de las cuales se concentran un tipo de compuestos u otros. Sin embargo, la muestra de la que se ha extraído el aceite, proviene de los residuos de la fruta entera, por lo que resulta lógica la presencia de todos o la gran mayoría de compuestos ya reportados para este cítrico, a diferencia de lo que se encontraría si se trabajase con pieles de mandarina únicamente, donde se concentran la mayoría de los compuestos terpénicos, especialmente limoneno.

De manera que, gracias a esta revisión se pudo explicar la presencia de los dos tipos de carbonilo, uno de ellos correspondiente a un grupo ácido, seguramente de los ácidos 10, 16 – dihidroxihexadecanoico o 9, 16 – dihidroxihexadecanoico, que componen la cutina uno de los principales componentes de la cera epicuticular presente en la piel de la mandarina. Si bien es cierto, que las muestras provienen de residuos de esta fruta también es un hecho que son residuos de fruto maduro, y es en este estadio es donde mayor cantidad de cera está presente (Sala, 1992). Adicionalmente dentro de esta cera se encuentran otros ácidos grasos, alcanos y aldehídos.

Debajo de las pieles se encuentra también el flavedo que es la parte donde se concentran los aceites esenciales, principalmente el limoneno, y los pigmentos que dan el color amarillo característico de estas frutas y que explica el color de los aceites evaluados. El contenido global de carotenoides en las mandarinas oscila de 80 a 140 mg/Kg (neocromo 3,1%, β -citraurina 13,3%, luteoxantina 1,6%, 9Z-violaxantina 18%, luteína 5,4%, β -criptoxantina 23,4%. (Londoño, 2012; Agocs, 2007).

Teniendo en cuenta esta información la cantidad de residuo empleado en la extracción del aceite de mandarina proveniente de residuos, se puede estimar una cantidad teórica de carotenoides presente en la masa de residuo empleada de aproximadamente 60 mg. Esta cantidad evidentemente no es extraída en su totalidad en los procesos llevados a cabo y, teniendo en cuenta que el rendimiento total del aceite obtenido de una planta oscila entre un 0,1 – 3% dependiendo del tipo de mandarina, estado de maduración etc. (Londoño, 2012), la cantidad de este tipo de compuestos dentro del aceite extraído de los residuos sería muy inferior a los 60 mg teóricamente calculados para la masa de residuo empleada. Por esta razón, su presencia no se ve confirmada por las técnicas empleadas, al estar en concentraciones bajas.

Por otro lado, se tienen las semillas, también presentes en los residuos, ricas en aceites, conformados principalmente por ácidos grasos como el ácido linoleico identificado en el perfil del aceite extraído de los residuos por medio de CG-MS y sus respectivos ésteres. Otro grupo interesante de compuestos encontrados en esta parte de los cítricos, son los limonoides, que son un grupo de triterpenos tetracíclicos que consisten en variaciones de la estructura del núcleo de la furo lactona y conformados por cuatro anillos de seis miembros que explicarían las señales correspondientes a carbonos e hidrógenos de tipo CH_2 observadas en los análisis realizados por resonancia y FTIR y las señales correspondientes a lactona de cinco o seis carbonos

observadas por medio de FTIR. En la **figura 4.15**, se indican las estructuras de los limonoides descritos en la bibliografía y que se encuentran en las semillas de mandarina (Manners, 2007). Se indica en rojo la parte de la molécula que explicaría las señales mencionadas anteriormente y que corresponde al núcleo de furolactona.

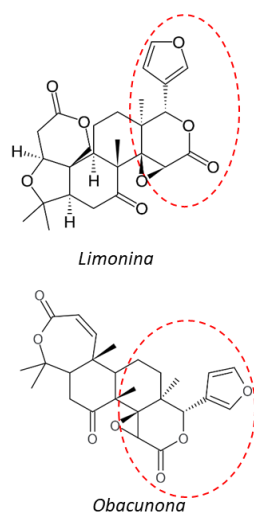


Figura 4.15. Principales limonoides presentes en la mandarina.

Es importante mencionar que estos compuestos tienen aplicaciones interesantes. Por un lado, son empujados como repelentes de insectos y en el control de algunos de estos, ya que inhiben su crecimiento y reproducción (Londoño *et al.*, 2012; Manners, 2007). Por otro lado, se utilizan en el campo de la medicina, ya que se ha visto que presentan un potencial efecto antitumoral (Champagne *et al.*, 1992; Chidambara y Jayaprakasha, 2011) por lo que resultaría de gran valor el poder extraerlos de estos tipos de residuo.

En resumen, se podría decir que además de los aromas identificados en el perfil obtenido mediante CG-MS, se podrían intuir, gracias a las demás técnicas empleadas, compuestos como: distintos ácidos como 10, 16 – dihidroxihexadecanoico, 9, 16–dihidroxihexadecanoico, 9, 17–octadecadienal, limonina, obacunona además de algunos flavonoides y carotenoides que le confieren sin duda un valor importante al aceite obtenido de los residuos, mediante el escalado.



¿Qué obtuvimos en este eje?

1. De los residuos alimentarios húmedos (mandarina, pepino, fresa y tomate) y liofilizados (mandarina y fibras de fresa) que se analizaron, las muestras procedentes de la mandarina fueron las que más contenido de monoterpenos presentaron.
2. Se evaluó la cantidad de monoterpenos extraída de los residuos procedentes de mandarina (húmedos, secos y liofilizados) utilizando disolventes orgánicos y sin ningún tipo de pre-tratamiento. Las muestras liofilizadas, permitieron extraer una mayor cantidad de éstos, siendo los residuos secos, los que presentaron menor cantidad.
3. Se extrajeron los terpenos presentes en los residuos liofilizados de mandarina mediante CO₂ supercrítico. Usando el análisis de superficie de respuesta, del que se obtuvieron las condiciones óptimas para obtener aromas (limoneno y α -terpineol) y aceite esencial. Las cantidades de aromas obtenidos estuvieron por debajo de los valores obtenidos mediante el uso de disolventes orgánicos con y sin pre-tratamientos. No obstante, el porcentaje de aceite extraído resultó mayor (18,6 %) que el reportado en la bibliografía (0,1 – 3%).
4. Para aumentar la cantidad extraída de limoneno y otros terpenos, se ensayaron diferentes pretratamientos físicos (trituración con y sin nitrógeno), enzimáticos y una combinación de ambos. La combinación de un pretratamiento físico de trituración de las muestras sin adición de nitrógeno con enzimas y empleando un mayor tiempo de agitación en la fase de extracción, permitió obtener una cantidad superior.
5. Dependiendo del pretratamiento usado, varían los compuestos obtenidos y la cantidad de limoneno extraída, siendo posible seleccionar uno u otro en base al perfil que se desee extraer.
6. Se escaló en un reactor, el proceso de extracción de terpenos de las muestras de residuos de mandarina, obteniendo un rendimiento del 1.4 %. Rendimientos similares han sido reportados para la extracción de aceite esencial de cáscaras de mandarina. De esta forma, el proceso utilizando residuos resulta ser una alternativa revalorizadora.
7. Se caracterizó mediante cromatografía de gases, el aceite esencial de los residuos de mandarina (DBA-M) y el aceite comercial (CAR-M) y se determinaron los perfiles con los porcentajes relativos de los principales terpenos en cada aceite: para el limoneno se obtuvo un 90.09% en el aceite de residuos de mandarina y un 78.22% en el aceite comercial.
8. La determinación mediante resonancia magnética nuclear y espectroscopia de infrarrojo reveló la presencia de compuestos de valor añadido como limonoides (limonina y obacunona), carotenoides (β -citraurina y β -criptoxantina) y ácidos grasos.

4.2. Aislamiento e identificación de microorganismos de los residuos alimentarios

Culminada la parte correspondiente a la selección de fuentes alternativas de aromas, empleando residuos agroalimentarios, se prosiguió con el uso de estos residuos como fuente de microorganismos.

En el esquema de la **figura 4.16** se resalta la parte correspondiente a los resultados que se mostrarán y se discutirán a continuación.

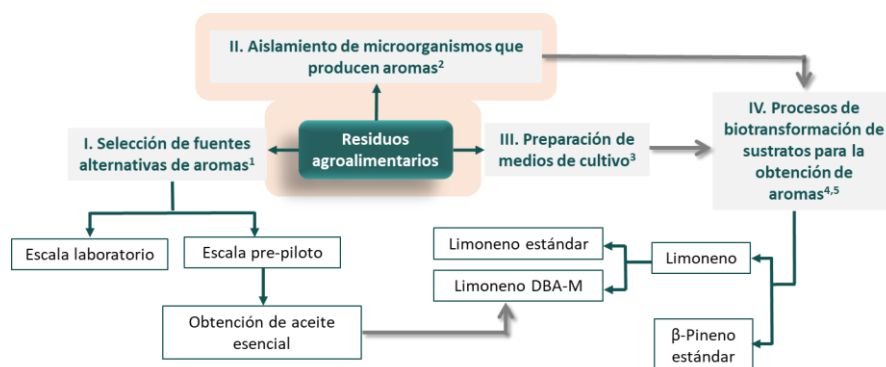


Figura 4.16. Esquema general del proyecto de investigación. Se indican los cuatro ejes que relacionan el uso directo o indirecto de residuos y se incluyen las citas de los apartados correspondientes a los métodos aplicados en cada etapa. En el esquema se resalta la parte que corresponde a los resultados y discusión, de la parte correspondiente al aislamiento de microorganismos que producen aromas. ¹3.2.2 **Figura 3.1**; ²3.2.3; ³3.2.4; ⁴3.2.5.1; ⁵3.2.5.2 **Figura 3.9**.

Esta parte, se desarrolló con el fin de identificar y seleccionar aquellos microorganismos que fuesen capaces de producir aromas y posteriormente biotransformar sustratos en compuestos de interés en la industria de aromas y fragancias.

Para esto, se llevó a cabo inicialmente el aislamiento de los microorganismos de los residuos húmedos de tomate (en puré y fruto), puré de pepino, mandarina (M-2016), limón, champiñones, alcachofa y fibras de fresa. Dentro del aislamiento se tuvieron en cuenta únicamente aquellos que fuesen hongos. Se siguió el protocolo descrito en el numeral 3.2.3.1 del apartado de métodos. Posteriormente se evaluó la capacidad metabólica de estos microorganismos, siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 3.2.3.2 y finalmente, se seleccionaron aquellos que dentro de sus perfiles metabólicos incluyeran la presencia de terpenos de interés en el proyecto de

forma que, por un lado, se identificaron mediante ADN, de acuerdo con el procedimiento del numeral 3.2.3.3 y por otro, se determinó la toxicidad de los mismos mediante el protocolo descrito en el numeral 3.2.3.1.4.

4.2.1. Aislamiento de microorganismos de los residuos

Tras el proceso de aislamiento de los microorganismos de los residuos se obtuvieron en total 14 cepas. A cada microorganismo se le asignó un código de acuerdo con el residuo del que fue aislado tal y como se indica en la **tabla 4.29**.

Tabla 4.29. Microorganismos aislados de cada tipo de residuo agroalimentario con su respectivo código asignado.

Residuo	Código
Puré de pepino	P1
	P2
Residuo de mandarina húmedo (M-2016)	M1C
	M3
	M4
	M5
	M6
	M6
Piel de limón	LE1
	LE2
Fibras húmedas de fresa	F1
Tomate (fruto)	TE1
	TE2
Tomate (puré)	TP1
	TP2

Tal y como se evidencia la mayor cantidad de microorganismos aislados se obtuvo de los residuos húmedos de mandarina del lote M-2016.

4.2.2. Evaluación de la actividad metabólica de los microorganismos seleccionados

Para evaluar la actividad metabólica de los microorganismos aislados de los residuos, se realizó un control al tercer y quinto día de crecimiento. En estos periodos de tiempo se identificaron mediante SPME los terpenos producidos por cada uno de estos. En el **Anexo IV, tabla A4.1** (día 3) y **A4.2** (día 5), se encuentran todos los compuestos identificados de cada una de las cepas, con sus respectivos porcentajes relativos, así como los tiempos de retención y los

respectivos índices teóricos y experimentales que permitieron la identificación y confirmación de los mismos. Adicionalmente se indican los compuestos presentes en algunas de las cepas evaluadas, de los cuales no fue posible conocer su identidad por los métodos empleados, pero si su presencia por la técnica cromatográfica aplicada.

A continuación, se indican únicamente los resultados para aquellos microorganismos que presentaron producción de uno o más compuestos de interés, tanto al tercer como al quinto día de crecimiento. Se indican sus respectivos porcentajes relativos y se incluyen únicamente aquellos que presentaron valores $\geq 5\%$.

Microorganismos aislados de puré de pepino: Dentro de los compuestos identificados mayoritariamente, se destacó la presencia de α -pineno y limoneno, tanto en la cepa P1 como en la cepa P2. Las concentraciones de estos compuestos expresadas en porcentaje relativo variaron de acuerdo con el tiempo. Tal y como se observa en la **figura 4.17**.

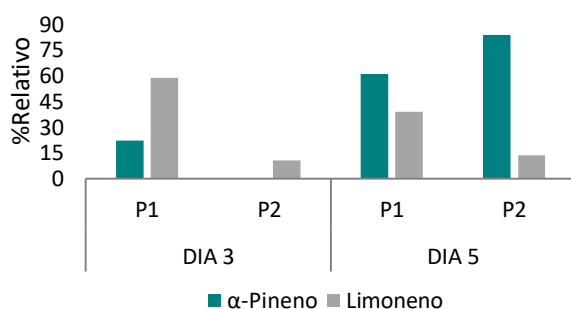


Figura 4.17. Porcentajes relativos de los compuestos identificados tras la actividad metabólica de los microorganismos extraídos de los residuos de puré de pepino evaluada a los 3 y 5 días.

En el caso de la cepa P1 se identificó limoneno y α -pineno tanto al tercer como al quinto día. Siendo mayor el porcentaje relativo de limoneno al tercer día (58,92%) y de α -pineno al quinto día (61,02%).

En el caso de la cepa P2, se identificó limoneno tanto al tercer como al quinto día de crecimiento (10,6% y 13,4% respectivamente). Pero el compuesto α -pineno, solo fue observado, pasados cinco días de crecimiento, cuyo porcentaje fue del 83,97%.

Con estos resultados se puede afirmar que estas dos cepas presentan una mayor actividad metabólica pasados cinco días de crecimiento.

Microorganismos aislados del residuo de mandarina húmedo (M-2016): Los resultados obtenidos para este grupo de microorganismos, resultaron ser bastante interesantes, ya que inicialmente, se evidenció de forma general una mayor actividad metabólica en la mayoría de las cepas al transcurrir los cinco días de crecimiento. Esto se vio reflejado en el mayor número de compuestos identificados en cada caso.

En la **figura A.18** se observan los principales compuestos de interés identificados tras la evaluación de la actividad metabólica al tercer y quinto día.

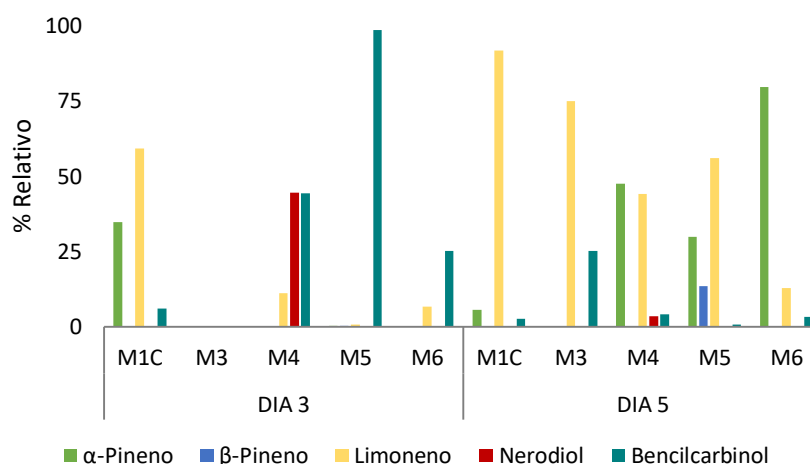


Figura 4.18. Porcentajes relativos de los compuestos identificados tras la actividad metabólica de los microorganismos extraídos de los residuos de mandarina húmedos del lote M-2016, evaluada a los 3 y 5 días.

Dentro de los compuestos principales identificados y que representaron interés, de acuerdo con los objetivos de este estudio, se resaltaron cinco terpenos, cuyos aromas son muy particulares y ampliamente usados en la industria de fragancias, estos fueron: limoneno, α-pineno, nerodiol y bencilcarbinol.

Al tercer día llamó la atención el alto valor de los porcentajes relativos obtenidos para compuestos como limoneno, nerodiol y bencilcarbinol. En el caso del limoneno, este se presentó en un mayor porcentaje en la cepa M1C (59,1%) y en cuanto al nerodiol en la cepa M4 (45,5%). Por otro lado, el compuesto bencilcarbinol, pudo ser identificado en las cepas M4 (44,3%), M5

(98,5%) y M6 (25,2%). Estos resultados demostraron el potencial de estos microorganismos para producir compuestos relacionados con el objetivo de este estudio.

Al observar los resultados obtenidos al quinto día de crecimiento, sorprendió el cambio en los perfiles de cada una de las cepas. Por un lado, los compuestos mayoritarios en este caso fueron limoneno, α -pineno y bencilcarbinol. En cuanto al limoneno, el mayor porcentaje relativo se obtuvo de la cepa M1C (91,6%), en el caso del α -pineno se obtuvo de la cepa M6 (79,5%) y finalmente el mayor porcentaje de bencilcarbinol de la cepa M3 (25,1%). En este último caso, esta cepa llamó particularmente la atención, ya que además del bencilcarbinol, se identificó limoneno (74,8%) y son compuestos que no se habían observado al tercer día de su crecimiento. Así mismo se evidenció en el caso de las cepas M4, M5 y M6 con el compuesto α -pineno, puesto que al tercer día no se había observado.

Todas estas apreciaciones, permiten reconocer que con el paso del tiempo la actividad metabólica de los microorganismos es distinta. Lo que permite obtener ciertos compuestos en los primeros días en concentraciones relativas altas, y otros pasado el tiempo. En general estos microorganismos demostraron capacidad para producir aromas.

Microorganismos aislados de piel de limón: los compuestos identificados de la actividad metabólica de las dos cepas aisladas de estos residuos, se muestran en la **figura 4.19**.

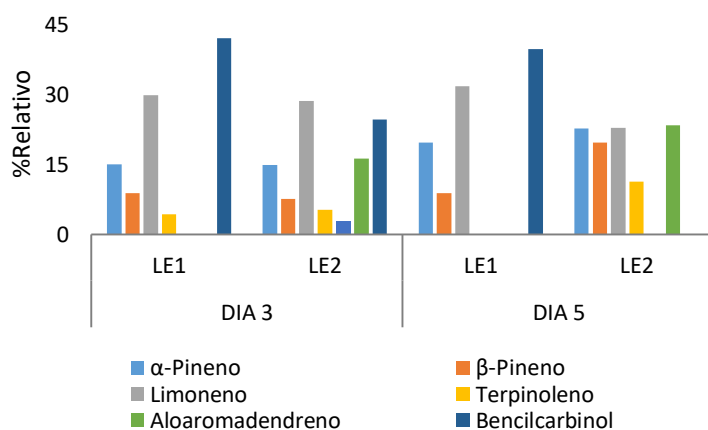


Figura 4.19. Porcentajes relativos de los compuestos identificados tras la actividad metabólica evaluada a los 3 y 5 días en los microorganismos extraídos de los residuos de piel de limón.

Tal y como se observó con los residuos de mandarina, las actividades metabólicas de estas cepas fueron mayores en comparación con las cepas aisladas de los residuos de pepino. Pues en este caso también se identificaron un mayor número de compuestos de interés en las dos cepas LE1 y LE2. Dentro de los compuestos mayoritarios se encontró limoneno, α -pineno, β -pineno, bencilcarbinol y terpinoleno en los dos días de crecimiento evaluados. Todos estos terpenos de interés en la industria de aromas.

Al tercer día los compuestos que se identificaron en porcentajes relativos mayores en las cepas LE1 y LE2 fueron bencilcarbinol (42 y 24,6% respectivamente) y limoneno (29,8 y 28,5% respectivamente). En el caso de la cepa LE2, se identificó adicionalmente el compuesto aloaromadendreno (16,30%), que hasta el momento no se había observado en ningún caso.

En cuanto a los resultados observados al quinto día, resulto interesante observar que la actividad metabólica del microorganismo LE1 fue muy similar a la observada al tercer día. Los porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios limoneno (31,7%) y bencilcarbinol (39,7%) se mantuvieron similares y exceptuando la ausencia del compuesto terpinoleno, la actividad metabólica registrada se mantuvo constante. Sin embargo, una situación distinta se observó en la cepa LE2, puesto que se evidenció un aumento en el porcentaje relativo de compuestos como α -pineno (22,7%), β -pineno (19,7%), terpinoleno (11,2%) y aloaromadendreno (23,3%), indicando una mayor actividad metabólica de esta cepa en el transcurso del tiempo.

Al igual que con los microorganismos aislados de la mandarina, se evidenció que estas cepas aisladas de la piel del limón, presentaron potencial para la producción de compuestos de interés en este estudio.

Microorganismo aislado de las fibras húmedas de fresa: De este tipo de residuo se aisló la cepa F1, tras el seguimiento de su actividad metabólica, únicamente se identificaron compuestos de interés al tercer día de crecimiento. El compuesto mayoritario correspondió al limoneno (88,26%), adicionalmente se identificó α -terpineno (6,35%) y terpinoleno (5,39%). Por lo tanto, esta cepa también demostró potencial para producir aromas.

Microorganismos aislados del tomate (puré y fruto entero): Los compuestos identificados como producto de la actividad metabólica de las cuatro cepas aisladas de este residuo se describen en la **figura 4.20**.

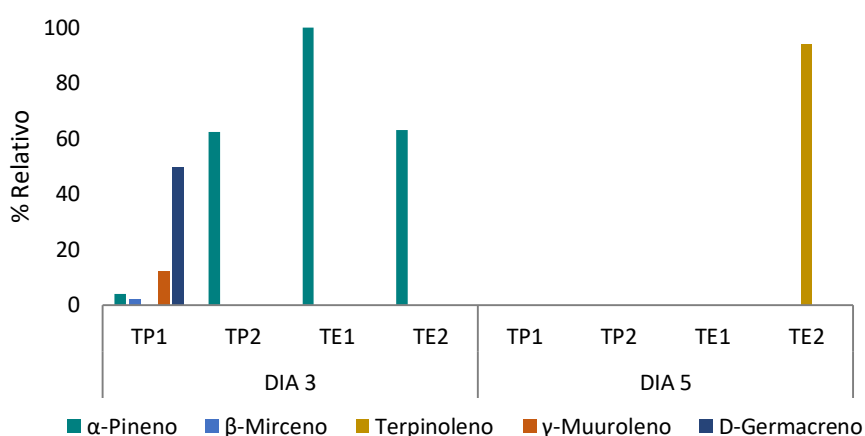


Figura 4.20. Porcentajes relativos de los compuestos identificados tras la actividad metabólica evaluada a los 3 y 5 días en los microorganismos extraídos de los residuos de tomate.

Dentro de los principales compuestos de interés para este proyecto se encontró α -pineno en cada una de las cepas tanto al tercer como al quinto día de crecimiento (4 y 62,3% respectivamente) y terpinoleno en la cepa TE2 al quinto día de crecimiento (94%). Adicionalmente se identificaron otros compuestos en la cepa TP1 que resultaron interesantes como γ -muuroleno (12,2%) y D-germacreno (49,5%), este último con un aroma similar a la vainilla.

Con toda la información adquirida durante la evaluación de las actividades metabólicas de las distintas cepas, se llevó a cabo una evaluación a través de una apreciación sensorial realizada por uno de los perfumistas de la empresa patrocinadora del proyecto. Para ello se sembraron en placa aquellos microorganismos que demostraron un perfil interesante al tercer y quinto día de crecimiento (no se incluyó la cepa M3, ya que su inhalación directa puede resultar perjudicial). Las cepas seleccionadas fueron M4, M5, M6, LE1, LE2 y F1.

De esta apreciación sensorial, resultó que las cepas M4 y F1 presentaron un aroma floral, siendo mucho más intenso en el tercer día de crecimiento. Por

otro lado, las cepas LE1 y LE2 presentaron un aroma a cítrico intenso durante los primeros 5 días de crecimiento. En el caso de las demás cepas, no se apreciaron aromas interesantes de forma sensorial. Con toda esta información se procedió a la identificación de las cepas mediante técnicas genéticas.

4.2.3. Identificación de las cepas seleccionadas mediante técnicas genéticas

Teniendo en cuenta los resultados de la actividad metabólica y sensorial, el origen de los residuos y el objetivo de este proyecto, se seleccionaron los microorganismos aislados de los residuos cítricos, y de los residuos de las fibras de fresa para ser identificados por técnicas genéticas, En la **tabla 4.30** se indican las especies identificadas.

Tabla 4.30. Especies identificadas, tras el análisis genético de las cepas aisladas de los residuos agroalimentarios.

Residuo	Código	Microorganismo
Residuo de mandarina húmedo (M-2016)	M1C	<i>Aspergillus niger</i>
	M3	<i>Aspergillus niger</i>
	M4	<i>Geotrichum citri-aurantii</i>
	M5	<i>Penicillium expansum</i>
	M6	<i>Penicillium expansum</i>
Piel de limón	LE1	<i>Aspergillus flavus</i>
	LE2	<i>Aspergillus flavus</i>
Fibras húmedas de fresa	F1	<i>Aspergillus nidulans</i>

Una vez identificadas las cepas, resultó que la mayoría pertenecían al género *Aspergillus*, de acuerdo con lo reportado por algunos autores, algunas cepas pertenecientes a este género son capaces de producir limoneno, α -pineno y β -pineno (Jongedijk 2016; Lee 2016), coincidiendo, por lo tanto, con las apreciaciones obtenidas en la evaluación sensorial, donde las cepas LE1 y LE2 (*A. flavus*) presentaron toques cítricos, aromas característicos de este grupo de terpenos.

Teniendo en cuenta que el objetivo además de identificar aquellas cepas con potencial de producción de aromas, presentasen potencial para biotransformarlos, se seleccionaron cinco cepas de las ocho identificadas, para continuar con los demás ensayos del proyecto. Estos microorganismos

fueron: *Aspergillus niger* (M3), *Aspergillus flavus* (LE2), *Aspergillus nidulans* (F1) y *Geotrichum citri-aurantii* (M4).

4.2.4. Toxicidad de los microorganismos seleccionados

Tras la selección de los microorganismos debidamente identificados, se decidió evaluar la presencia de toxinas en los microorganismos. Esto con el fin de evitar usar cepas que pudiesen resultar nocivas tras su manipulación o al usar en un futuro metabolitos provenientes de más mismas en productos que estuviesen en contacto humano.

De acuerdo con los resultados obtenidos, no se detectó la presencia de las toxinas: ocratoxinas, fumonisinas, aflatoxinas y deoxinivalenol, evaluadas en los microorganismos de las cepas identificadas como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. nidulans* y *Geotrichum citri-aurantii*. Con lo cual se estimó que son cepas que no representan ningún tipo de riesgo que esté relacionado con la exposición a este tipo de sustancias que puedan generar algún efecto adverso sobre la salud. Por lo que su aplicación en procesos de revalorización de residuos y posibles aplicaciones en el ámbito de la industria de aromas y fragancias sería seguro.



¿Qué obtuvimos en este eje?

1. Para la obtención de distintos microorganismos se trataron los residuos agroalimentarios, en ellos se aisló un total de 14 cepas de hongos. Mediante el aislamiento de ADN, se identificaron aquellos microorganismos que presentaron potencial para producir aromas. Entre ellos, se encontraron cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium expansum* y *Geotrichum citri-aurantii*.
2. En la determinación del perfil de monoterpenos obtenidos del metabolismo de estos microorganismos se pudo observar que todos ellos produjeron diversidad de compuestos, sin embargo, predominó la producción de limoneno y también α -pineno y β -pineno (excepto *G. citri-aurantii*). A diferencia del resto, *G. citri-aurantii* resultó ser productor de nerodiol.

4.3. Preparación de medios de cultivo a partir de residuos agroalimentarios

Siguiendo con el desarrollo del proyecto tal y como se indica en el esquema de la **figura 4.21**, con el fin de dar una revalorización total a los residuos agroalimentarios empleados durante este estudio, se planteó la preparación de medios de cultivo a partir del uso de algunos de estos. De tal manera que fuesen suficientes para sustituir total o parcialmente alguno de los componentes del medio de cultivo convencional empleado para el crecimiento de los microorganismos.

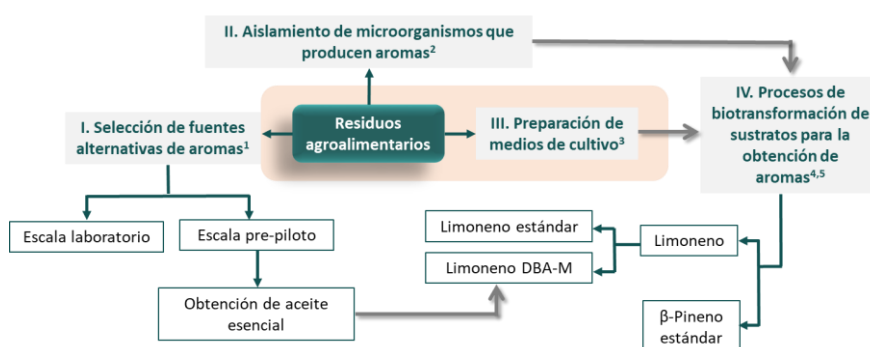


Figura 4.21. Esquema general del proyecto de investigación. Se indican los cuatro ejes que relacionan el uso directo o indirecto de residuos y se incluyen las citas de los apartados correspondientes a los métodos aplicados en cada etapa. En el esquema se resalta la parte que corresponde a los resultados y discusión, de la parte correspondiente a la preparación de medios de cultivo, empleando los residuos agroalimentarios. ¹3.2.2 **Figura 3.1**; ² 3.2.3; ³ 3.2.4; ⁴ 3.2.5.1; ⁵ 3.2.5.2 **Figura 3.9**.

De acuerdo con su disponibilidad y especialmente sus características (contenido de azúcar, proteínas, nitrógeno etc., suministrados por INDULLEIDA y Conservas Azagresa **tabla 4.31**), se seleccionaron los residuos de mandarina secos del lote del 2017 (M-2017) y los residuos secos de alcachofa.

Tabla 4.31. Caracterización físico-química de los residuos agroalimentarios de mandarina del lote M-2017 y alcachofa, secos. Los resultados se expresan en % sobre muestra seca.

Parámetro	Residuo seco	
	Mandarina	Alcachofa
Materia Orgánica	96,13	95,34
Grasa	0,85	1,35
Proteínas	8,86	14,65
Azúcares	28,85	9,80
<i>Glucosa</i>	8,16	0,1
<i>Fructosa</i>	12,5	0,89
Nitrógeno (N)	1,41	2,33
Fosforo (P)	0,03	0,07
Sodio (Na)	0,01	0,26
Potasio (K)	0,63	1,14
Calcio (Ca)	0,41	0,40
Magnesio (Mg)	0,06	0,20

A continuación, se describen detalladamente los resultados de cada uno de los ensayos realizados.

4.3.1. Residuos secos de mandarina y alcachofa. Toxicidad de los microorganismos seleccionados

Se evaluaron distintas alternativas, en las cuales el residuo agroalimentario (alcachofa o mandarina), sustituía total o parcialmente el extracto de malta de medios de cultivo preparados de acuerdo con el procedimiento descrito en el numeral 3.2.4.2 del apartado correspondiente a métodos.

Se desarrollaron en total 4 alternativas por cada tipo de residuo (**tabla 3.3**), además de un control que estaba elaborado con medio de cultivo convencional a base de extracto de malta. En este caso se emplearon las cepas de los microorganismos *A. flavus* (LE2), *A. niger* (M3) y *G. citri-aurantii* (M4).

Inicialmente se planteó evaluar el crecimiento de los microorganismos en cada medio de cultivo, a través del diámetro de cada punto de siembra, sin embargo, se observó que no era un buen parámetro, ya que, en algunos casos pese a haber un incremento en esta medida, no se evidenciaba una evolución comparable con el aspecto físico del microorganismo en la muestra control. Por lo tanto, se decidió realizar la selección del medio más

adecuado comparando de forma visual cada una de las placas con los medios elaborados a partir de extracto de malta.

En general los microorganismos respondieron positivamente a la siembra en cada uno de los medios elaborados especialmente en aquellos elaborados con los residuos de alcachofa. Si bien es cierto que se evidenciaron algunas diferencias físicas con las muestras control. Todas estas cepas crecieron e incluso llegaron a la esporulación en cada una de las alternativas.

Se observó adicionalmente que algunas cepas presentaron incluso un crecimiento mayor que en la muestra control, fue el caso de los microorganismos correspondientes a las especies *Aspergillus niger* (M3) y *A. flavus* (LE2). Cuyas placas en el séptimo día, especialmente en aquellas alternativas en las que se había sustituido por completo el extracto de malta por residuo y se habían mantenido las proporciones de los demás componentes, tal y como en el medio de cultivo convencional, presentaban un aspecto más voluminoso y una mayor formación de esporas. Especialmente en los medios preparados con residuos de alcachofa.

Esto podría deberse a que estos residuos presentan una mayor cantidad de grasa, proteínas, nitrógeno, fósforo, sodio, potasio y magnesio (**tabla 4.31**), que le suministrarían una mayor cantidad de nutrientes en comparación con los residuos de mandarina.

En la **figura 4.22** se observa a modo de ejemplo, el crecimiento del microorganismo *A. flavus* y su respuesta frente a las cuatro alternativas de medio para cada residuo.



Figura 4.22. Respuesta de crecimiento del microorganismo *Aspergillus flavus* (LE2), para cada una de las alternativas de medio elaboradas con los residuos secos de mandarina y alcachofa en los días 3, 5 y 7. **1:** 2% residuo, 2% glucosa; **2:** 1% residuo, 2% glucosa, 1% extracto de malta; **3:** 0,5% residuo, 2% glucosa, 1,5% extracto de malta; **4:** 2% residuo. En todos los medios de cultivo las proporciones de agua destilada, peptona y agar se mantuvieron constantes (94,4%, 0,1% y 1,5% respectivamente).

Tal y como se observa en la figura, las mejores respuestas corresponden a las alternativas 1 y 2, que corresponden a los medios de cultivo en los cuales se ha reemplazado totalmente el extracto de malta o se ha reemplazado en un 50%. Por otro lado, el crecimiento menos favorable se evidenció en la alternativa 3 (0,5% residuo, 2% glucosa, 1,5% extracto de malta), en el caso del residuo de mandarina y 4 en el caso del residuo de alcachofa (2% residuo de alcachofa y sin adición de glucosa).

Teniendo en cuenta estos resultados, se determinó que los residuos empleados podrían convertirse en una alternativa en la elaboración de medios de cultivo, reemplazando el extracto de malta usado convencionalmente, especialmente los residuos de alcachofa.

Por esta razón se decidió preparar suspensiones de esporas que permitiesen conocer si se producían en mayor cantidad en el medio elaborado con los residuos o en el medio convencional. La preparación de las suspensiones y el conteo de esporas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el numeral 3.2.5.1.1.2 del apartado de métodos. Cabe resaltar que las proporciones empleadas para la preparación del medio de cultivo con los

residuos de alcachofa correspondió a la alternativa en la cual el extracto de malta se sustituyó por el residuo y se mantuvieron las proporciones de los demás componentes tal y como en el medio de cultivo convencional.

Dentro de los microorganismos evaluados se incluyeron las especies del género *Aspergillus* únicamente, ya que las demás especies no presentan formación de esporas.

Tras el conteo de esporas se obtuvieron las concentraciones de las suspensiones para cada uno de los medios de cultivo. Los resultados se indican en la **tabla 4.32**.

Tabla 4.32. Concentración de las suspensiones de esporas obtenidas para los microorganismos *A. flavus* (LE2) y *A. niger* (M3) provenientes de los dos medios de cultivo sólidos evaluados.

Medio	Microorganismo	Esporas/mL
EMA	<i>Aspergillus flavus</i>	$6,1 \times 10^6$
	<i>Aspergillus niger</i>	$2,9 \times 10^6$
ALC	<i>Aspergillus flavus</i>	$3,48 \times 10^6$
	<i>Aspergillus niger</i>	$1,4 \times 10^6$

EMA: Medio elaborado con extracto de malta; ALC: Medio elaborado con residuos secos de alcachofa

Los resultados obtenidos, mostraron una mayor concentración de esporas en las suspensiones provenientes de los microorganismos sembrados en el medio de cultivo elaborado con los residuos. De forma que se pudo comprobar que los microorganismos sembrados en medio de alcachofa presentaron una mayor esporulación en comparación con aquellos sembrados en el medio de cultivo convencional pese a haber transcurrido el mismo tiempo desde la siembra hasta la preparación de las suspensiones. Este hecho se observó especialmente en las suspensiones de la cepa del microorganismo *A. niger*, cuya concentración fue de $6,1 \times 10^6$ esporas/mL en el medio elaborado con los residuos frente a $1,4 \times 10^6$ esporas/mL en el medio convencional.

Adicionalmente y en concordancia con lo expuesto anteriormente, se pudo evidenciar una gran diferencia en el aspecto físico de los microorganismos sembrados en los dos medios, al mismo tiempo de siembra, como se observa en la **figura 4.23a**, donde se pueden ver los estados decrecimiento para las especies de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* tras cuatro días de crecimiento en placa en el medio convencional y en el medio elaborado con el residuo de alcachofa. Así mismo en la **figura 4.23b**, a modo de ejemplo se

puede ver una comparación de la cantidad de esporas recogidas en la suspensión de las placas de medio convencional y medio de residuo de alcachofa para la especie *Aspergillus niger* bajo el microscopio.

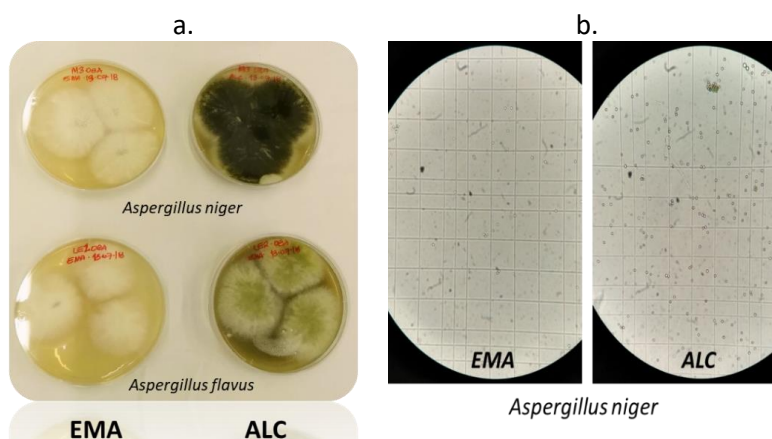


Figura 4.23. a. Aspecto de las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* tras cuatro días de crecimiento en placa en el medio convencional (EMA) y en el medio elaborado con el residuo de alcachofa (ALC). b. Esporas recogidas en la suspensión de las placas de medio convencional EMA y medio de residuo de alcachofa ALC para la especie *Aspergillus niger* bajo el microscopio.

Estos datos y observaciones resultan interesantes, puesto que en este sentido se pudo demostrar que el empleo de residuos de alcachofa para la preparación de medios de cultivo puede favorecer la concentración de esporas, que posteriormente pueden ser empleadas en otros procesos que requieran su inoculación en medios líquidos.

4.3.2. Residuos secos de mandarina pre-tratados enzimáticamente

Posteriormente se aplicó sobre los residuos secos de mandarina del lote M-2017 un pre-tratamiento enzimático, usando celulasa y pectinasa. Este se llevó a cabo dado el alto contenido de pectinasa en los residuos, de forma que, se buscaba evaluar si el crecimiento de los microorganismos podría verse favorecido o no al hidrolizar la celulasa y la pectinasa presente en la mandarina al aumentar la disponibilidad de azúcares y nutrientes. Por esta razón se determinó evaluar diferentes alternativas de hidrolisis (**tabla 3.4**), con el fin de identificar aquella que permitiese obtener un medio con una mayor respuesta de crecimiento por parte de los microorganismos tal y como

se describe en el numeral 3.2.4.3 de métodos. Con los hidrolizados resultantes, se prepararon medios de cultivo y se evaluó el crecimiento las cepas *A. flavus*, *A. niger* y *P. expansum*.

Al igual que con el ensayo descrito en el apartado anterior, se planteó inicialmente realizar el seguimiento del crecimiento midiendo los diámetros de cada uno de los discos sembrados a los 3, 5 y 7 días, sin embargo, se observó también que este criterio no permitía obtener el resultado esperado ya que en varios casos el diámetro de crecimiento de las cepas era similar sin embargo la observación visual del desarrollo del microorganismo (color, presencia de esporas...) era muy distinta.

La respuesta de crecimiento de los microorganismos cultivados en estos medios, fue positiva, sin embargo, se presentaron algunas diferencias entre algunas cepas y no se evidenció una homogeneidad en los resultados como ocurrió con el ensayo del apartado anterior. En la **tabla 4.33** se muestran los resultados obtenidos en el monitoreo del crecimiento de las tres cepas en los distintos medios obtenidos a partir de muestras secas de mandarina hidrolizadas.

Tabla 4.33. Seguimiento del crecimiento de los microorganismos *A. niger* (M3), *A. flavus* (LE2) y *P. expansum* (M5) en cada uno de los medios preparados a partir de muestras secas de residuos de mandarina hidrolizados en diferentes alternativas de hidrolisis, en medio de cultivo convencional y en el control negativo.

	Alternativa	Microorganismos		
		M3	LE2	M5
Cel-SA y Pec-SA	1	+++	+++	+++
	2	+++	+++	++
	3	+++	+++	+++
	4	+++	+++	++
	5	++	++	++
	6	++	++	++
CelPec-ID	1	+++	+++	+++
	2	+++	+++	++
	3	+++	+++	+++
	4	+++	+++	++
	5	++	++	++
	6	+	+	++
Control negativo	CN	+	+	+
Blanco de medio	B-EMA	++++	++++	++++

+ Indica de forma orientativa el crecimiento de los microorganismos en comparación con las muestras correspondientes al blanco de medio B-EMA. Cel-SA y Pec-SA: celulosa y pectinasa SA; CelPec-ID: celulosa y pectinasa ID. CN: Control negativo elaborado con todos los componentes del medio de cultivo convencional exceptuando el extracto de malta; B-EM: medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta. 1: 5% enzima, 3h; 2: 5% enzima, 5h; 3: 10% enzima, 3 h; 4: 10% enzima, 5 h; 5: 5% enzima, 24 h; 6: 10% enzima, 24 h.

Se observa que, en la mayoría de casos, los medios preparados a partir de las muestras secas de residuos de mandarina hidrolizadas enzimáticamente permitieron el crecimiento de los microorganismos si bien en el caso de la cepa de *P. expansum* el crecimiento observado fue tal vez un tanto menor que con el medio convencional.

Por otro lado se observó una situación particular en la cepa M3 (*A. niger*), ya que su crecimiento fue menos favorable en los medios elaborados con hidrolizados de residuo de mandarina, especialmente en los casos en que el tratamiento enzimático fue más prolongado (24h), por lo que se podría decir que un tratamiento enzimático superior a las 5 horas, no merecería la pena, de hecho al observar los resultados de los demás microorganismos y los respectivos tiempos de hidrolisis de cada alternativa de medio, no se

evidenció una diferencia que permitiera asumir que un mayor tiempo de hidrólisis mejoraría o favorecería el crecimiento.

Así mismo no se observó ninguna diferencia considerable en el crecimiento al emplear en la hidrólisis una concentración del 5 o del 10% de enzima. Finalmente, el control negativo confirma que el microorganismo no crece o crece de forma reducida en ausencia de extracto de malta (o residuo) en el medio.

A continuación, en la **figura 4.24**, se muestra a modo de ejemplo el crecimiento de la cepa *Penicillium expansum* en diferentes alternativas de medio a los siete días de crecimiento, se incluyen los blancos y los controles negativos.

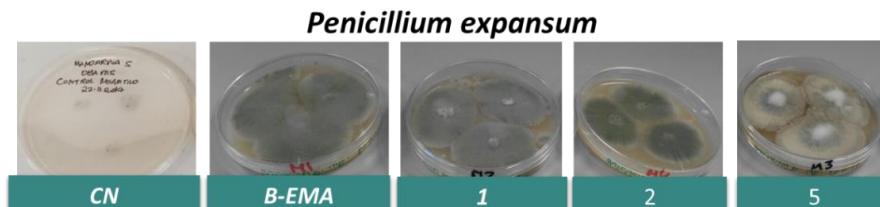


Figura 4.24. Crecimiento de los microorganismos *P. expansum* y *A. niger* en el séptimo día tras la siembra en placas de control negativo, blanco y medios a partir de muestras secas de mandarina tras un pretratamiento enzimático. 1: 5% enzima, 3h; 2: 5% enzima, 3 h; 5% enzima, 24 h. CN: Control negativo elaborado con todos los componentes del medio de cultivo, excepto extracto de malta; B-EMA: Blanco de medio de cultivo elaborado con extracto de malta.

Como resumen puede considerarse que la utilización de este residuo hidrolizado a un tiempo de 3 h, con una concentración de enzima del 5% empleando cualquiera de los dos grupos de enzimas (ID o SA) puede ser una buena alternativa para sustituir el extracto de malta del medio convencional para el crecimiento de las cepas ensayadas. Sin embargo, si se plantease un uso futuro a nivel industrial, este pre-tratamiento supondría un empleo mayor de tiempo, reactivos etc., que no permitiría revalorizar este residuo de forma adecuada.

Por lo que, teniendo en cuenta la apreciación anterior y los resultados obtenidos en esta fase del proyecto, se optó por usar el residuo de alcachofa en la preparación de medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos (2%

residuo, 2% glucosa, 0,1% peptona, 94,4%, agua destilada y 1,5% agar), de forma paralela al medio de cultivo convencional.

Con esto, se dio paso a la última fase del proyecto. La obtención de aromas por medio de procesos de biotransformación.



¿Qué obtuvimos en este eje?

1. Se prepararon medios de cultivo a partir de residuos para el crecimiento de los microorganismos. Se trabajó con muestras secas de residuos de mandarina y de alcachofa, usando el medio convencional (EMA) como referencia. Se observó un buen crecimiento en los medios de residuos, observando mayor esporulación en los medios de alcachofa, lo que convirtió a este medio, en una alternativa sustitutiva al medio convencional.

2. El efecto del pre-tratamiento enzimático de hidrólisis sobre los residuos secos de mandarina fue evaluado, previo a la preparación de los medios de cultivo para la activación de los microorganismos (medio sólido). En los casos en los que el tratamiento enzimático se había realizado con la menor de las proporciones de enzima y durante un periodo de reacción más corto el crecimiento de los microorganismos fue mejor en comparación con el medio convencional.

4.4. Procesos de biotransformación de sustratos para la obtención de aromas

Tal y como se planteó desde el comienzo, otro de los objetivos del proyecto, era poder obtener aromas, por medio de la biotransformación de sustratos, empleando distintos microorganismos aislados de los residuos (**figura 4.25**).

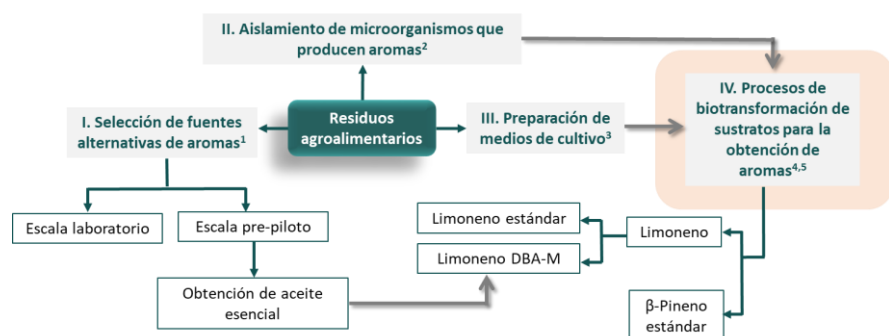


Figura 4.25. Esquema general del proyecto de investigación. Se indican los cuatro ejes que relacionan el uso directo o indirecto de residuos y se incluyen las citas de los apartados correspondientes a los métodos aplicados en cada etapa. En el esquema se resalta la parte que corresponde a los resultados y discusión, de los procesos de biotransformación de sustratos para la obtención de aromas. ¹3.2.2 **Figura 3.1**; ² 3.2.3; ³ 3.2.4; ⁴ 3.2.5.1; ⁵ 3.2.5.2 **Figura 3.9**.

Para llevar a cabo lo planteado en este último eje, fue necesario, optimizar algunas fases del proceso de biotransformación. De forma que, se pudiese obtener un procedimiento que permitiese evaluar la biotransformación los sustratos limoneno y β -pineno, por parte de los microorganismos aislados de los residuos. Que incluso pudiese ser llevado a cabo no solo a pequeña escala, sino a escala pre-piloto.

Este último eje, resultó ser muy importante, ya que se consiguió el uso directo o indirecto los residuos agroalimentarios. Por un lado, se emplearon microorganismos aislados de los residuos, por otro lado, la siembra tanto en medio sólido, así como la inoculación en medio líquido se llevó a cabo, no solo empleando un medio de cultivo convencional (elaborado con extracto de malta), sino el medio de cultivo preparado con los residuos de alcachofa y se logró emplear como sustrato, no solo limoneno y β -pineno comerciales, sino el limoneno contenido en el aceite esencial obtenido tras el proceso de extracción en escala pre-piloto de los residuos de mandarina.

A continuación, se describen los resultados obtenidos en la optimización y posteriormente de la biotransformación de los sustratos.

4.4.1. Optimización de algunas fases del proceso de biotransformación

Antes de iniciar con los resultados de esta parte, cabe recordar que el proceso de biotransformación consta de cuatro etapas (figura 3.8): 1. Activación de los microorganismos, 2. Inoculación en medio líquido, 3. Adición de sustrato y 4. Extracción de metabolitos, tal y como se indicó en el numeral 3.2.5.1 del apartado correspondiente a métodos. De modo que, de la etapa 2, se evaluó la inoculación de los microorganismos, por dos métodos: siembra por discos y conteo de esporas (3.2.5.1.1) y de la etapa 3, el tipo de sistema/reactor empleado: sistema convencional y sistema cerrado (3.2.5.1.2) y el mecanismo de adición del sustrato. En esta parte de optimización se evaluaron los dos sustratos limoneno y β -pineno (estándares comerciales).

Inicialmente se empleó un sistema convencional con inoculación por el método de discos, en el cual se adicionó el sustrato puro sobre los medios de cultivo inoculados. En el caso del limoneno se realizó sobre las cepas *A. niger* (M3), *G. citri-aurantii* (M4), *A. flavus* (LE2) y *A. nidulans* (F1) y en el caso del β -pineno sobre las cepas *A. niger* (M3) y *G. citri-aurantii* (M4), siguiendo el protocolo propuesto por Pescheck, *et al.*, 2009 y Maróstica, *et al.*, 2007. Sin embargo, dada la solubilidad tan baja de estos compuestos en medio acuoso y la ausencia de resultados al analizar los extractos resultantes de los procesos por las técnicas cromatográficas, se optó por buscar una alternativa que permitiese aumentar la disponibilidad de los sustratos en el medio. Por esta razón y siguiendo lo sugerido por algunos autores se optó por preparar una disolución en etanol 1:4 de los sustratos (Tan Q., Day D. 1998; Demyttenaere 2001; Adams 2003). Este disolvente según estos autores resulta ser uno de los menos nocivos para el desarrollo del crecimiento de los microorganismos.

Con estos sustratos preparados se procedió a realizar el proceso de biotransformación de los sustratos limoneno y β -pineno empleando el sistema convencional. Al analizar los extractos de cada caso, a diferencia lo ocurrido al realizar una adición directa del sustrato, en este caso se lograron identificar un gran número de compuestos.

Los resultados obtenidos en cuanto al proceso de biotransformación del limoneno se muestran en la **tabla 4.34**.

Tabla 4.34. Biotransformación de limoneno (limoneno-etanol 1:4) en el sistema convencional, realizado por las cepas de los microorganismos *A. niger* (M3), *G. citri-aurantii* (M4), *A. flavus* (LE2) y *A. nidulans* (F1).

Compuesto	Microorganismo			
	M3	M4	LE2	F1
α -Felandreno	x	x		x
<i>trans</i> - β -Ocimeno		x		
β -Ocimeno		x	x	x
γ -Terpineno	x	x	x	x
Terpinoleno	x	x	x	x
Bencilcarbinol		x		
Terpinen-4-ol	x	x	x	x
α -Terpineol		x	x	x
Neohidrocarveol	x			
<i>cis</i> -Carveol	x			x
<i>cis</i> -Geraniol	x			x
Geraniol				x
Alcohol perílico	x	x		

En estos resultados se incluyen únicamente los compuestos que posiblemente serían resultado del proceso de biotransformación del sustrato. Dentro de estos se encontraron: α -felandreno, γ -terpineno, terpinoleno, terpinen-4-ol, α -terpineol, *cis*-carveol y alcohol perílico sobre los cuales se profundizará más adelante, en los ensayos elaborados con los sistemas optimizados.

Por otro lado, se identificaron compuestos, que, pese a no estar directamente relacionados con la biotransformación del limoneno, sí sugirieron una posible transformación de otros compuestos presentes en el sustrato o ser resultado de la producción propia del microorganismo bajo estas condiciones. Estos fueron: bencilcarbinol, neohidrocarveol, *cis*-geraniol y geraniol sobre los cuales también se profundizará más adelante.

Cabe mencionar que en la muestra control, conformada por el medio de cultivo y el sustrato, en ausencia de microorganismo, se identificaron además del limoneno otros compuestos que probablemente fueron el resultado de los efectos propios del medio, las condiciones del proceso etc., sobre el

propio sustrato o sobre los compuestos que lo acompañan, al no ser un patrón completamente puro. Más adelante se profundizará acerca de estos posibles efectos. Por tal motivo, no se incluyeron dentro de los compuestos que posiblemente hubiesen sido producto de la biotransformación de los microorganismos. Adicionalmente se indica que, de los controles conformados únicamente por el medio de cultivo en ausencia de microorganismo y sustrato, no se identificó ningún compuesto de interés.

En cuanto a la biotransformación del β -pineno en la **tabla 4.35**, se muestran los principales compuestos identificados.

Tabla 4.35. Proceso de biotransformación de β -pineno (β -pineno-etanol 1:4) en el medio convencional, realizado por las cepas de los microorganismos *A. niger* (M3) y *G. citri-aurantii* (M4).

Compuesto	Microorganismo	
	M3	M4
β -Mirceno	x	x
γ -Terpineno	x	x
Terpinoleno	x	x
Fenchol	x	x
Pinocanfona	x	
Borneol	x	x
α -Terpineol	x	
Terpinen-4-ol	x	x

Dentro de los compuestos de interés se encontraron: γ -terpineno, terpinoleno, fenchol, pinocanfona, borneol y α -terpineol sobre los cuales se profundizará más adelante, en los ensayos elaborados con los sistemas optimizados.

Cabe resaltar que, en este caso, también se identificaron algunos compuestos en las muestras correspondientes al blanco de medio y sustrato que incluyeron α -pineno, canfeno, limoneno, pinocarveol y mirtenol, probablemente como producto de la transformación o degradación del sustrato por las condiciones del proceso o por el efecto del medio, situación que será discutida en apartados posteriores.

Si bien es cierto que, las condiciones del proceso llevadas a cabo, permitieron favorecer el proceso de biotransformación de los dos sustratos en comparación con las condiciones aplicadas en un primer momento. Al realizar la cuantificación, tanto el sustrato recuperado como de los demás

compuestos estuvieron del orden de 10^{-2} y 10^{-4} . Por lo que se decidió iniciar con la búsqueda de alternativas en sistemas cerrados que evitasen la pérdida del sustrato aplicado, y de los compuestos producidos por la biotransformación y a su vez un mecanismo que permitiese controlar de alguna manera la cantidad de microorganismo inoculado.

Por esta razón en el siguiente ensayo se optó por el empleo de reactores de 50 mL de capacidad y se siguió el protocolo descrito en el numeral 3.2.5.1.2.2 del apartado de métodos. Estos reactores permitieron que durante el proceso no se presentasen pérdidas y se logró mantener la disponibilidad de oxígeno suficiente para los microorganismos. Adicionalmente y con el fin de controlar que la cantidad de microorganismo inoculado fuese la misma en cada proceso, se recurrió al método de inoculación por conteo de esporas (Demyttenaere 2001). En este caso se realizó únicamente la biotransformación del sustrato limoneno y las cepas empleadas fueron *A. niger* (M3) y *A. flavus* (LE2) y se empleó no solo el medio de cultivo convencional, sino el medio de cultivo elaborado con residuos de alcachofa.

Durante este procedimiento se cuantificaron los compuestos identificados en cada una de los extractos provenientes de la biotransformación y de las muestras control. Con lo cual se pudo dar un indicio de la recuperación del sustrato en los blancos, de los compuestos biotransformados por los microorganismos y de aquellos compuestos producto de la posible transformación del sustrato y de los demás compuestos presentes junto a este por el medio y las condiciones propias del proceso.

En la **figura 4.26**, se muestran aquellos compuestos que resultaron relevantes y que se consideraron producto de la biotransformación del sustrato o de la producción propia del microorganismo de acuerdo con las condiciones del proceso. En el **Anexo V (tabla A5.1)** se pueden encontrar referenciados el resto de compuestos identificados en cada uno de los extractos, incluidas las muestras control.

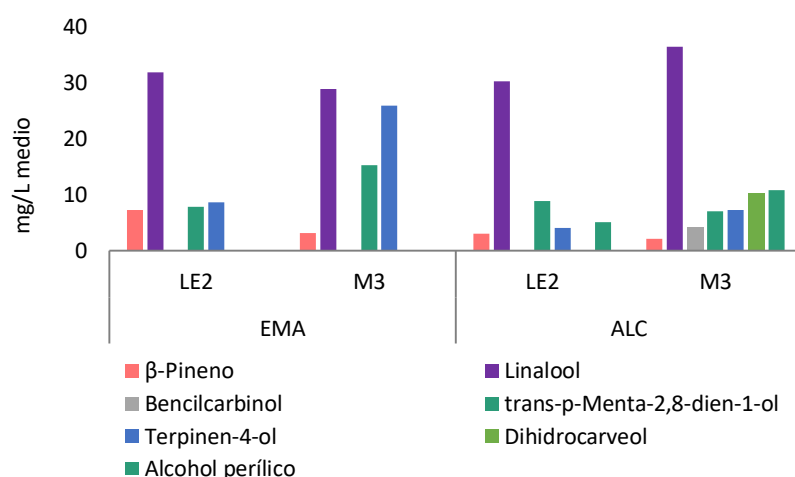


Figura 4.26. Compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de biotransformación de limoneno en reactores de 50 mL de capacidad (sistema cerrado), por las cepas *A. niger* (M3) y *A. flavus* (LE2) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L).

De forma general se observa que las dos cepas evaluadas y cultivadas en los dos tipos de medio de cultivo, presentaron un alto potencial para biotransformar el limoneno principalmente en compuestos tales como *trans-p*-menta-2,8-dien-ol, terpinen-4-ol y linalool, especialmente en este último, donde las cantidades obtenidas de este terpeno fueron superiores en comparación con los demás compuestos, siendo mucho mayor la cantidad obtenida en la cepa M3 cultivada en el medio convencional. Adicionalmente se identificó alcohol perílico en la muestra de la cepa M3 cultivada en los residuos de alcachofa, lo que resulto interesante, ya que es un compuesto típico en la biotransformación de este sustrato, tal y como se detallará en apartados posteriores.

Con esta información y con la cuantificación del limoneno recuperado en cada muestra, tal y como se muestra en la **tabla 4.36**, se observó que al emplear un sistema cerrado la cantidad de terpenos presentes en los extractos de las muestras tras el proceso de biotransformación fue mayor, en comparación con las cantidades que rondaban del orden de 10^{-2} y 10^{-4} en el sistema convencional.

Tabla 4.36. Cantidad de limoneno recuperado y estimación del limoneno residual en las muestras control de medio de cultivo (BM) y sustrato y por los microorganismos *A. flavus* y *A. niger* en la biotransformación del sustrato limoneno, utilizando como medios de cultivo, extracto de malta (EMA) y residuos de alcachofa (ALC) en reactores de 50 mL de capacidad (Sistema cerrado).

Medio	Muestra	mg/L	% Limoneno recuperado	% Limoneno residual ¹
EMA	BM-EMA	7,70E-03	0,10	-
	<i>A. flavus</i> (LE2)	5,28	70,47	29,53
	<i>A. niger</i> (M3)	5,20	69,40	30,60
ALC	BM-ALC	3,28	43,60	-
	<i>A. flavus</i> (LE2)	5,20	69,35	30,65
	<i>A. niger</i> (M3)	5,02	66,93	33,07

¹Este porcentaje corresponde al total del limoneno que pudo ser biotransformado, degradado y/o retenido por el medio de cultivo. Por lo tanto no corresponde necesariamente al limoneno total biotransformado por los microorganismos.

De los resultados obtenidos en este estudio, cabe resaltar la baja recuperación de sustrato en las muestras control, especialmente en aquella que fue elaborada con medio de cultivo convencional, situación que pudo deberse a la posible retención del sustrato por parte del medio o a la transformación del mismo dadas las condiciones del proceso y del medio como tal. Por esta razón se planteó realizar para los ensayos posteriores dos extracciones consecutivas, empleando la misma cantidad de disolvente en cada una de estas.

En cuanto a los porcentajes de limoneno residual fueron muy similares en las dos cepas cultivadas en ambos medios de cultivo evaluados.

Teniendo las condiciones optimizadas del proceso, incluyendo el uso del medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa, se procedió a evaluar el potencial de biotransformación de los sustratos por los microorganismos seleccionados.

4.4.2. Biotransformación de sustratos

Para evaluar el potencial de biotransformación para la obtención de aromas por parte de los microorganismos seleccionados, se emplearon tres sustratos: limoneno comercial, limoneno contenido en el aceite esencial extraído de los residuos y se realizaron algunos ensayos con β -pineno comercial. Inicialmente se llevaron a cabo estudios a pequeña escala y posteriormente algunos de estos fueron llevados a escala pre-piloto.

A continuación, se indicarán los resultados obtenidos para el limoneno comercial a escala laboratorio y pre-piloto, posteriormente se indicarán los resultados obtenidos tras la extracción del limoneno contenido en el aceite extraído de los residuos y finalmente se indicarán los resultados de los ensayos llevados a cabo en escala laboratorio y pre-piloto de la biotransformación del con β -pineno comercial.

4.4.2.1. Biotransformación del limoneno estándar

El primer sustrato evaluado fue el limoneno comercial (**figura 4.27**). Con este sustrato, se realizaron ensayos a pequeña escala y en escalada pre-piloto.

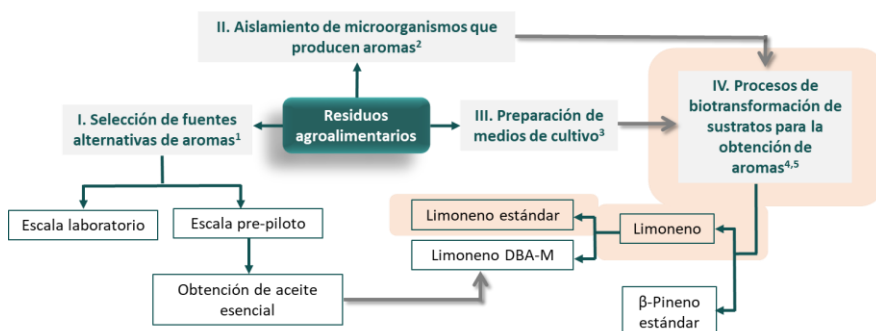


Figura 4.27. Esquema general del proyecto de investigación. Se indican los cuatro ejes que relacionan el uso directo o indirecto de residuos y se incluyen las citas de los apartados correspondientes a los métodos aplicados en cada etapa. En el esquema se resalta la parte que corresponde a los resultados y discusión de los procesos de biotransformación del limoneno estándar para la obtención de aromas a escala laboratorio. ¹3.2.2 **Figura 3.1**; ² 3.2.3; ³ 3.2.4; ⁴ 3.2.5.1; ⁵ 3.2.5.2 **Figura 3.9**.

4.4.2.1.1 Escala laboratorio

Se realizaron dos ensayos de biotransformación de este sustrato a pequeña escala. Por un lado, la biotransformación con las condiciones optimizadas y, por otro lado, un seguimiento del proceso de biotransformación durante un periodo de 8 horas.

4.4.2.1.1.1 Biotransformación bajo condiciones optimizadas En este primer ensayo se evaluó la capacidad de biotransformación de las cepas correspondientes a las especies *A. flavus* (LE2), *A. niger* (M3), *A. nidulans* (F1)

y *G. citri-aurantii* (M4), siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 3.2.5.2.1.1.1.

De los resultados obtenidos, cabe resaltar que en las muestras control conformadas únicamente por los medios de cultivo respectivos, en ausencia de microorganismo y sustrato no se encontraron compuestos de interés, por esta razón no se menciona dentro de los análisis.

No obstante, en las muestras control del medio convencional y de residuo de alcachofa, en presencia de sustrato y ausencia de microorganismo, al igual que como ocurrió con las muestras control en los ensayos de optimización, se identificó un grupo de compuestos distintos al limoneno. Esta situación obligó a realizar de forma paralela un análisis del perfil de una muestra del limoneno estándar con una concentración de 500 ppm, con el objetivo de identificar si el origen de la presencia de estos otros terpenos estaba dado por la degradación u oxidación propia del limoneno o por la acción de factores como la temperatura, la agitación o el tipo de medio sobre éste. Los resultados obtenidos se indican en la **tabla 4.37**.

Tabla 4.37. Porcentaje relativo de los compuestos identificados el patrón de 500 ppm de limoneno estándar comercial (LIM-STD) empleados en los procesos de biotransformación.

Compuesto	LIM-STD
α -Pino	0.34
Sabineno	0.41
β -Mirceno	1.81
3-Careno	0.43
Limoneno	96.06
Linalool	0.31
1 <i>R</i> ,4 <i>R</i> - <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0.25
D-carvona	0.38

Se identificaron además del limoneno: sabineno, 3-careno, α -pino, linalool, 1*R*,4*R*-*p*-menta-2,8-dien-1-ol, D-carvona y β -mirceno en concentraciones relativas muy pequeñas que sumadas entre sí correspondían al 4%. Por lo que su aparición en los extractos de las muestras control de medio y sustrato resulta lógica. Al parecer estos compuestos se van formando durante el almacenamiento del limoneno y resulta inevitable no obtenerlos. Sin embargo, la presencia de: β -pino y γ -terpino, *cis*-*p*-

menta-2,8-dien-1-ol, *cis*-carveol, carveol, α -terpineol y β -ocimeno, identificados especialmente en la muestra control de medio de residuos de alcachofa probablemente sí sería el resultado de la transformación o degradación del limoneno por factores propios del procedimiento. De hecho, en algunos de los estudios consultados, se encontró un reporte de situaciones similares, en las que se menciona la aparición de compuestos distintos al limoneno en muestras control de medio y sustrato en ausencia de microorganismo, que, aunque no especifican exactamente los tipos de compuestos identificados, si dejan el precedente de que es algo que puede ocurrir (Demytttenaere 2001; Maróstica 2007).

Teniendo claridad en los compuestos identificados, así como su concentración (mg/L de medio) en los blancos de medio de cultivo tanto de extracto de malta (BM-EMA) como de residuos de alcachofa (BM-ALC) y sustrato, fue posible identificar aquellos compuestos que realmente estuviesen siendo producto de la acción del microorganismo.

De forma que, se identificaron tres grupos de compuestos. Por un lado, los relacionados directamente con la biotransformación del limoneno, por otro lado, aquellos relacionados con la biotrasnformación de los otros compuestos presentes en el sustrato y finalmente los compuestos resultantes del metabolismo o de la actividad de los microorganismos y que no se relacionan directamente con ninguno de los dos grupos anteriores.

Los resultados para cada muestra se encuentran detallados en el **Anexo VI A6.1**, donde se indican los tiempos de retención para cada compuesto, así como los índices de retención teóricos y experimentales que permitieron sus respectivas identificaciones.

A continuación, se detallan los resultados para cada microorganismo evaluado.

Aspergillus niger:

Como se observa en la **figura 4.28**, se obtuvieron perfiles distintos en cuanto a los metabolitos resultantes de la acción del microorganismo *A. niger*.

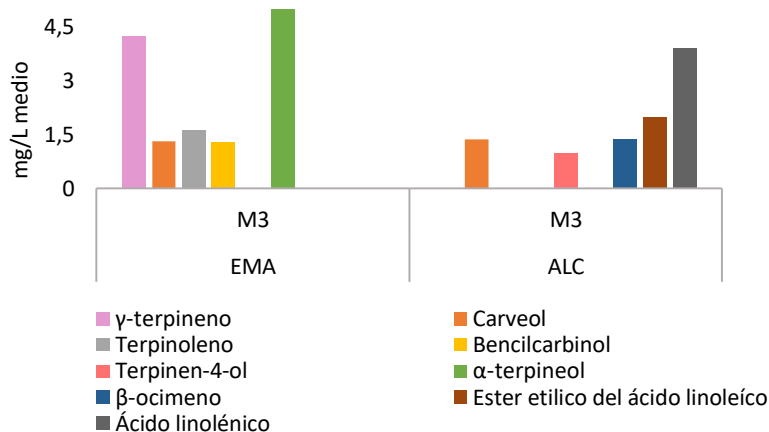


Figura 4.28. Cantidades absolutas (mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de biotransformación de limoneno estándar en reactores de 100 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *A. niger* (M3) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y el medio de residuos de alcachofa (ALC).

Dentro de los compuestos provenientes de la biotransformación directa del limoneno se identificaron, por un lado, en el medio de cultivo convencional, γ -terpineno (4,25 mg/L), carveol (1,31 mg/L), terpinoleno (1,62 mg/L), bencilcarbinol (1,29 mg/L) y α -terpineol (5 mg /L) y en el medio de cultivo elaborado con residuos de alcachofa carveol (1,37 mg/L) y terpinen-4-ol (0,98 mg/L).

Como se evidencia, los perfiles obtenidos en cada medio fueron distintos, lo que resulta interesante ya que puede verse como el tipo medio puede tener un efecto sobre el potencial de biotransformación del sustrato por parte del microorganismo, en este caso favoreciendo la aparición de un grupo de compuestos u otro. Por otro lado, todos estos compuestos mencionados forman parte del grupo de metabolitos que ya se han reportado en la bibliografía como productos de procesos de biotransformación del limoneno en distintas especies de hongos y bacterias que han demostrado su capacidad para transformar este sustrato o isomerizarlo (Maróstica 2007; Demytttenaere 2001; Bicas 2008; Prieto 2014; Adams 2003; Sales 2018), por lo que su identificación en los respectivos extractos resulta lógica. De hecho, un grupo de estos metabolitos, especialmente γ -terpineno, α -terpineol y terpinen-4-ol ya han sido reportados como resultado de la

biotransformación de limoneno para otras cepas de esta especie en particular (Pashikov, 2014).

Todo lo anterior les daría un peso importante a los resultados obtenidos en este caso, ya que se estaría demostrando cómo esta cepa de *Aspergillus niger* es capaz de transformar el limoneno en diferentes productos, dependiendo del medio de cultivo, lo que haría selectivo el proceso dependiendo del perfil que se desase obtener, convirtiendo adicionalmente a los residuos de alcachofa en una alternativa sostenible como medio de cultivo agregando un valor a estos materiales.

Por otro lado, dentro de los terpenos relacionados con la biotransformación de los otros compuestos presentes en el sustrato y que representó interés, gracias a su aroma floral fue β -ocimeno (1,37 mg/L). Identificado únicamente en los extractos en los se empleó el medio elaborado con residuos de alcachofa. Teniendo en cuenta la composición del sustrato (**tabla 4.37**), una posible explicación a la presencia de este metabolito, resultaría de la biotransformación del mirceno. Cabe resaltar que este último se encontró como uno de los compuestos mayoritarios (1,81%) a parte del limoneno en el sustrato. Lo anterior coincide con lo reportado por algunos autores, que han evidenciado que especies de diferentes microorganismos como, por ejemplo: *A. niger* y *P. putida*, han presentado un alto potencial para realizar la biotransformación de mirceno en β -ocimeno (Pashikov 2014; Esmaeili 2011; Noma 2010).

En cuanto a los compuestos que no presentaron una relación directa con la biotransformación del limoneno u otros de los compuestos presentes junto a este, se destaca inicialmente la presencia de bencilcarbinol (de gran interés gracias a su aroma de rosas frescas). Identificado únicamente en los extractos provenientes de los medios de cultivo elaborados con extracto de malta (1,29 mg/L). Este compuesto, ya se había identificado en los ensayos correspondientes a la evaluación de la actividad metabólica (apartado 4.2.2), para la cepa de este microorganismo (**Fig. 4.18**, día 5). Por lo que su presencia, indica que esta cepa produce este compuesto a partir de fuentes de carbono e hidrogeno distintas al limoneno y/o los demás compuestos presentes junto con él en el sustrato, probablemente gracias a las condiciones propias del sistema y/o del medio de cultivo. De hecho, es una situación que coincide con algunos autores que reportan para algunas cepas de la especie *A. niger* y del genero *Candida* la producción de este metabolito en ausencia de un sustrato específico (Ting-Li 2013; Wani 2010). De manera

que, si fuese posible escalar este proceso, se obtendría un extracto con un aroma interesante desde el punto de vista comercial.

Otros de los compuestos destacados fueron éster etílico del ácido linoleico y ácido linolénico. Identificados únicamente en medios elaborados con el residuo de alcachofa. Curiosamente estos dos metabolitos han sido identificados, dentro de los componentes de las hojas de alcachofa (Claus 2015), lo que hace suponer que son liberados por la acción del *A. niger* en el medio. Este aspecto resulta interesante, ya que, si el escalado de proceso resultase viable, además de obtenerse extractos con aromas aplicables a productos comerciales, podría suponer una aplicación incluso en tópicos para la piel. Ya que además suministrar aroma al producto, podría aportar beneficios adicionales, como por ejemplo en el tratamiento de quemaduras u otras lesiones dermatológicas, donde ya se han reportado beneficios al usar estos dos compuestos (Benaiges 2007; Ando 2017).

Con todo lo mencionado anteriormente, queda claro que esta cepa demuestra gran actividad y potencial para la obtención de compuestos de interés en el campo de los aromas.

Aspergillus flavus:

En la **figura 4.29**, se observan los compuestos identificados tras el proceso de biotransformación del limoneno por parte del microorganismo *A. flavus* para los dos medios de cultivo evaluados.

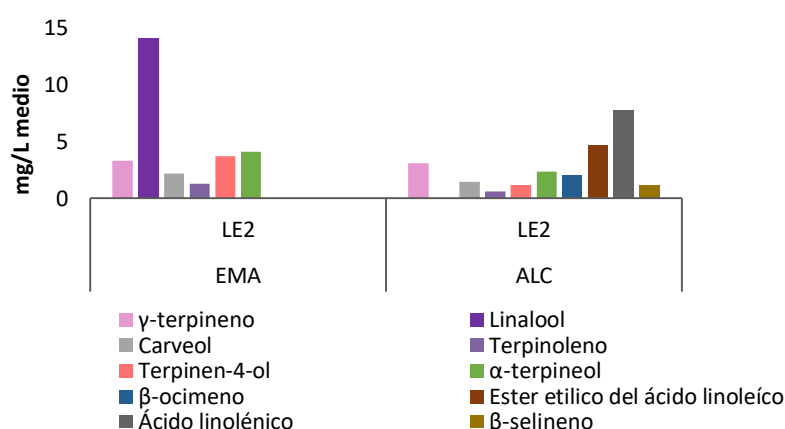


Figura 4.29. Cantidades absolutas (mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de biotransformación de limoneno estándar en reactores de 100 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *A. flavus* (LE2) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y el medio de residuos de alcachofa (ALC).

Dentro de los compuestos provenientes de la biotransformación directa del limoneno se identificaron en los dos medios de cultivo (EMA y ALC): γ -terpineno (4,25 y 3,10 mg/L), carveol (2,18 y 1,44 mg/L), terpinoleno (1,31 y 0,61 mg/L), terpinen-4-ol (3,69 y 1,15 mg/L) y finalmente α -terpineol (4,12 y 2,38 mg /L). Como se observa, las cantidades obtenidas fueron mayores en el medio de cultivo convencional para cada uno de los compuestos, indicando que, para este microorganismo, este medio de cultivo sería más favorable para la conversión del sustrato en estos metabolitos, que como se ha mencionado anteriormente han sido descritos dentro de las rutas metabólicas que puede seguir el limoneno (**figura 1.10**). Adicionalmente se identificó linalool únicamente en las muestras donde se empleó el medio de cultivo convencional (EMA). De modo que, resulta importante resaltar que, pese a que este metabolito fue identificado en las muestras control de extracto de malta y sustrato (10,5 mg/L) y en el patrón de limoneno estándar (**tabla 4.37**), la cantidad obtenida tras la biotransformación con *A. flavus* fue mayor (14,09 mg/L), lo que indicaría el potencial de esta cepa para biotransformar el limoneno en este terpeno, coincidiendo con lo que algunos autores han reportado para microorganismos de este género (García 2014). Hay que decir que, se hace énfasis en el linalool, ya que su aroma floral con toques mentolados lo hace de gran interés en el campo de los aromas.

La identificación de β -ocimeno (2,09 mg/L) en las muestras de los extractos provenientes de la biotransformación en el medio de cultivo de alcachofa coincidió con lo observado en las muestras de *A. niger*, siendo mayor la cantidad obtenida en este caso, lo que confirmaría que las condiciones del medio de residuos de alcachofa podrían favorecer la biotransformación del mirceno en β -ocimeno.

Finalmente se identificaron los compuestos: éster etílico del ácido linoleico (4,66 mg/L) y ácido linolénico (7,78 mg/L) en los extractos provenientes de la biotransformación en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa, al igual que con la cepa *A. niger*, pero en una mayor concentración confirmando que la presencia de estos microorganismos favorece la liberación de estos compuestos del medio elaborado con los residuos de alcachofa. Adicionalmente se identificó β -selineno otro compuesto que también forma parte de los principales componentes de este alimento por lo que la acción de esta cepa de *A. flavus* para liberar estos componentes del medio sería mayor.

Con todo lo expuesto anteriormente, queda claro el potencial que presenta *A. flavus* para obtener aromas y otros compuestos, mediante procesos de biotransformación.

Geotrichum citri-aurantii:

Este microorganismo presento un potencial de biotransformación relativamente similar en los dos medios de cultivo empleados como se observa en la **figura 4.30**.

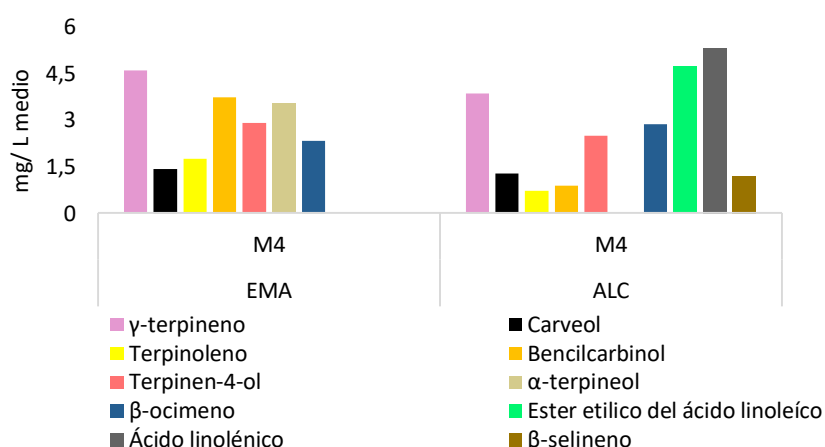


Figura 4.30. Cantidades absolutas (mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de biotransformación de limoneno estándar en reactores de 100 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *G. citri-aurantii* (M4) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y el medio de residuos de alcachofa (ALC).

Tal y como se ha realizado con las cepas anteriores, inicialmente se identificaron los compuestos relacionados directamente con la biotransformación del limoneno en los dos medios de cultivo (EMA y ALC). Estos compuestos fueron: γ -terpineno (4,59 y 3,86 mg/L), carveol (2,18 y 1,44 mg/L), terpinen-4-ol (2,90 y 2,50 mg/L) y terpinoleno (1,42 y 1,27 mg/L). Como se observa, las concentraciones obtenidas para estos metabolitos fueron relativamente similares en los dos medios, por lo que no se refleja ningún efecto del medio sobre la biotransformación en el caso de esta cepa a diferencia de lo observado con las especies anteriores.

Sin embargo, en el caso del compuesto α -terpineol, se observó una situación bastante particular, ya que se obtuvo como resultado de la biotransformación del sustrato únicamente en las muestras donde se empleó el medio de cultivo convencional, la concentración obtenida fue de 3,53 mg/L, por lo que, para este metabolito, el tipo de medio empleado en el proceso sí sería determinante al momento de ser obtenido por la acción del microorganismo.

Cabe destacar la importancia de los resultados obtenidos para esta cepa, ya que en primer lugar para este microorganismo no hay referencias relacionadas con procesos de biotransformación de este tipo de sustratos. La

mayoría de estudios están relacionados con la patología de este hongo, ya que es uno de los causantes principales de la enfermedad cítrica conocida como “*Sour rot*”, esta enfermedad es potencialmente devastadora y lleva consigo grandes pérdidas (Duan 2016; Feng 2011; Karim 2016). Lo curioso es que los estudios recientes se han enfocado en el empleo de aceites esenciales para controlar esta enfermedad y combatir el crecimiento de este microorganismo en las frutas cítricas almacenadas postcosecha ya que muchos de los fungicidas que se encuentran en el mercado no la combaten (Liu 2009). Sin embargo, uno de los compuestos que han resultado eficientes para controlar el crecimiento de este microorganismo ha sido el α -terpineol (Zhou 2014; Regnier et al, 2014; Talibi 2014), ya que al exponer al microorganismo a ciertas cantidades de este compuesto, se inhibe el crecimiento micelial y la germinación de las esporas (Naz 2013), por lo que en este estudio resulta sorprendente la capacidad de este microorganismo para biotransformar el limoneno en α -terpineol pese a lo expuesto anteriormente.

Por otro lado, la identificación del compuesto β -ocimeno, tanto en el medio de cultivo elaborado con extracto de malta, como en el medio elaborado con residuos de alcachofa (2,33 y 2,86 mg/L respectivamente), resultó ser mayor que en las cepas analizadas anteriormente. Así mismo demostró que este proceso no se vio afectado por el tipo de medio como sí se evidenció en los resultados de las cepas del genero *Aspergillus*, discutidos anteriormente.

Para esta cepa, también se identificó el compuesto bencilcarbinol en los dos medios de cultivo empleados, siendo mayor en el medio de cultivo convencional (3,73 mg/L), que en el medio elaborado con los residuos (0,88 mg/L), lo que demostraría al igual que con las afirmaciones del párrafo anterior, que esta cepa no se ve afectada por el tipo de medio empleado. A su vez, demostraría que es capaz de emplear fuentes de carbono e hidrogeno distintas al limoneno y los demás compuestos identificados junto con este en el sustrato, y producir bencilcarbinol. Metabolito que, por cierto, ya había sido identificado en los ensayos de la actividad metabólica (apartado 4.2.2, **Fig. 4.18**, día 3) para esta cepa.

Finalmente se identificaron los compuestos: éster etílico del ácido linoleico (4,71 mg/L), ácido linolénico (5,31 mg/L) y β -selineno (1,19 mg/L) al igual que con las cepas analizadas anteriormente, en medio de cultivo de alcachofa demostrando la capacidad de este microorganismo para liberar estos metabolitos del medio de cultivo.

Con todo lo anterior se demuestra el potencial del *G. citri-aurantii*, en la obtención de aromas y otros compuestos, mediante los procesos de biotransformación.

Aspergillus nidulans:

Como se observa en la **figura 4.31**, los compuestos identificados tras el proceso de biotransformación para esta cepa en los dos medios de cultivo, fueron distintos.

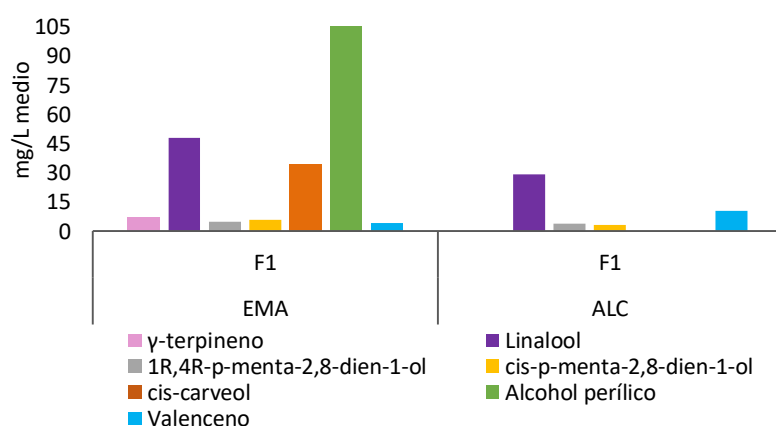


Figura 4.31. Cantidades absolutas (mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de biotransformación de limoneno estándar en reactores de 100 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *A. nidulans* (F1) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y el medio de residuos de alcachofa (ALC).

Para esta cepa, los compuestos que resultaron como producto de la biotransformación del limoneno, tanto en el proceso llevado a cabo en el medio de cultivo convencional, como en el medio elaborado con los residuos fueron: 1R,4R-p-menta-2,8-dien-1-ol (4,92 y 4,07 mg/L), cis-p-menta-2,8-dien-1-ol (5,85 y 3,41 mg/L) y linalool (48,02 y 29,18 mg/L). Coincidiendo con los metabolitos reportados en la bibliografía para otras especies de microorganismos, que han realizado la biotransformación del limoneno (**figura 1.10**).

De este grupo de compuestos, merece la pena destacar el linalool, ya que, tanto en el medio de cultivo convencional como en el medio elaborado con los residuos, alcanza concentraciones, hasta el momento mayores, en comparación con el linalool cuantificado en las demás cepas. Esto indica el

potencial que tiene este microorganismo para transformar el limoneno, independientemente del tipo de medio, coincidiendo con algunos autores que han reportado este potencial en otras especies del mismo género (García 2014).

Otros de los compuestos relacionados con la biotransformación directa del limoneno, que se identificaron fueron: *cis*-carveol (34,49 mg/L) y alcohol perílico (105,15 mg/L), únicamente en las muestras en las que se empleó el medio de cultivo convencional. La identificación de este último compuesto llama bastante la atención dado que, hasta el momento en las cepas evaluadas no se había evidenciado y además la concentración obtenida para este metabolito resultó ser la mayor en comparación con todos los demás metabolitos identificados. Por lo que, teniendo en cuenta que es un compuesto apreciado por su aroma floral y por ende utilizado en industria de los aromas y las fragancias, esta cepa resultaría ser una alternativa para su obtención. Cabe resaltar que el alcohol perílico ha sido reportado como uno de los metabolitos de la biotransformación del limoneno, en diferentes microorganismos (Demyttenaere 2001; Bicas 2008; Sales 2018; Maróstica 2007) por lo que resultaría coherente también dicha transformación para esta cepa.

Dentro de los compuestos que no se relacionaron directamente con la biotransformación del limoneno o de los demás compuestos presentes junto con este, se encontró el valenceno. Identificado tanto en el medio de cultivo convencional como en el elaborado con los residuos (4,11 y 10,61 mg/L respectivamente). La aparición de este compuesto posiblemente es el resultado de la ruta del farnesil pirofosfato que realizan algunas plantas y algunos microorganismos para dar lugar a la formación de sesquiterpenos relacionados con algunos aromas, como lo es el valenceno, sin embargo, no ha sido posible confirmar esta premisa, ya que no se encontró información al respecto para esta especie. De la que, por cierto, existe muy poca información relacionada con la biotransformación para la obtención de aromas. no obstante, si hay información en la que especies como *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli* que han biotransformado el valenceno para dar lugar a la nootkatona (Sowden 2005). Un compuesto de alto valor y de gran interés en la industria de aromas, sabores y fragancias, gracias a su agradable aroma a toronja. Este compuesto se encuentra únicamente en los pomelos, en cantidades muy bajas. Lo que lo hace muy costoso (4000 €/Kg), motivo por el cual, su obtención mediante medios sostenibles y rentables está siendo investigada, incluso se ha hecho uso de

herramientas moleculares e ingeniería genética mediante las cuales se han modificado algunas vías metabólicas en microorganismos con el fin de obtener dicho compuesto (Chappell 2004; Sharon-Asa 2003). De modo que, al observar que esta especie es capaz de producir valenceno bajo estas condiciones, sería interesante evaluar su potencial para biotransformarlo.

Finalmente, en este caso no se identificaron los compuestos éster etílico del ácido linoleico, ácido linolénico ni β -selineno, lo que indica que esta cepa no favorecería a diferencia de las demás, la liberación de estos compuestos de los residuos de la alcachofa.

Para cerrar el análisis de la biotransformación del sustrato limoneno estándar se evaluó también la recuperación del exceso de sustrato residual en las muestras, tanto en las muestras control como en las muestras provenientes de la biotransformación por parte de los microorganismos. Los resultados obtenidos se indican en la **tabla 4.38**.

Tabla 4.38. Cantidad de limoneno estándar (en mg/L) recuperada del medio de cultivo en cada una de las muestras provenientes del proceso de biotransformación por parte de las cepas *A. niger*, *A. flavus*, *G. citri-aurantii* y *A. nidulans*, tanto en el medio de cultivo convencional (EMA) como en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa (ALC) así como de las respectivas muestras control. Se incluyen los valores correspondientes al porcentaje de recuperación y de limoneno residual en cada caso.

Medio	Muestra	mg/L	% de limoneno recuperado	% de limoneno residual ¹
EMA	BS-EMA	318,32 ± 0,04	31,83	-
	<i>A. niger</i>	556,83 ± 2,29	55,68	44,32
	<i>A. flavus</i>	576,54 ± 2,58	57,65	42,35
	<i>G. citri-aurantii</i>	591,20 ± 4,77	59,12	40,88
	<i>A. nidulans</i>	166,45 ± 0,01	16,65	83,35
ALC	BS-ALC	961,32 ± 0,55	96,13	-
	<i>A. niger</i>	613,14 ± 5,59	61,31	38,69
	<i>A. flavus</i>	671,33 ± 0,32	67,13	32,87
	<i>G. citri-aurantii</i>	933,64 ± 1,24	93,36	6,64
	<i>A. nidulans</i>	679,99 ± 0,41	68,00	32,00

¹Este porcentaje corresponde al total del limoneno que pudo ser biotransformado, degradado y/o retenido por el medio de cultivo. Por lo tanto no corresponde necesariamente al limoneno total biotransformado por los microorganismos.

Al observar la cantidad de sustrato recuperado en las muestras control de cada medio evaluado, se evidencia que en el blanco elaborado con extracto de malta la cantidad de limoneno extraída es mucho menor (318,32 mg/L)

que la cantidad extraída en el blanco del medio elaborado con los residuos de alcachofa (961,32 mg/L), pues en este último se extrajo casi la totalidad del sustrato adicionado durante el proceso ($\approx 1000,2$ mg/L). Lo que estaría demostrando el efecto del medio sobre el sustrato y confirmando un par de premisas expuestas en los análisis realizados sobre los resultados obtenidos en el ensayo de optimización en el sistema cerrado (4.4.1). Relacionadas por un lado con una posible retención del limoneno en el medio convencional o con la degradación del sustrato en este mismo medio para dar compuestos que no se pudieron identificar mediante las técnicas empleadas. Lo que queda claro, es que estos efectos no se evidenciaron en la muestra control de los residuos de alcachofa.

Al comparar los porcentajes de sustrato recuperado, se pudo establecer el porcentaje de limoneno residual que pudo ser biotransformado, degradado y/o retenido por el medio de cultivo. De forma que este valor, pese a no corresponder necesariamente al limoneno total biotransformado por los microorganismos, si es un valor que permitió conocer aquellas especies que tendrían una mayor actividad o efecto frente al mismo. Dicho esto, la similitud entre los porcentajes de las especies *A. flavus* y *A. niger* en los dos medios de cultivo evaluados (44,32% y 42,35% en el medio de cultivo convencional y 38,69% y 32,87% en el medio elaborado con los residuos), demostrarían un efecto similar sobre el sustrato limoneno. La diferencia radicaría principalmente en el tipo de perfil obtenido en cada muestra. Pues cabe recordar que, en cada uno de los casos se identificaron diferentes grupos de compuestos relacionados directamente con la biotransformación del limoneno. Por lo que resultaría lógico que gran parte del porcentaje obtenido pudiese corresponder a la fracción de limoneno biotransformado por los microorganismos.

En cuanto a la cepa *G. citri-aurantii*, los porcentajes obtenidos de sustrato residual, fueron bastante diferentes en los dos medios de cultivo evaluados. Siendo mayor en el medio de cultivo convencional (40,88%) que en el medio elaborado con los residuos (6,64%). De forma que, al comparar estos resultados con los perfiles obtenidos en cada caso, específicamente al comparar los compuestos relacionados directamente con la biotransformación del limoneno (**figura 4.30**), se evidencia ligeramente una mayor actividad de la cepa en el medio de cultivo convencional. Sin embargo, no lo suficiente para relacionar la diferencia en los porcentajes obtenidos. De forma que, en este caso, parte del limoneno podría haberse quedado retenido o haber sido degradado (en compuestos que no se identificaron con

las técnicas empleadas) en el medio de cultivo convencional. Una situación que no se estaría presentando en el medio de cultivo elaborado con los residuos.

En el caso del microorganismo *A. nidulans* se observó que el mayor porcentaje obtenido de limoneno residual se dio en el medio de cultivo convencional (83,35%), siendo de hecho de los más altos registrados durante todo este ensayo. Cabe recordar que para este microorganismo se registró una de las cantidades más altas extraídas del compuesto linalool, claramente proveniente de la biotransformación de sustrato. Adicionalmente, dentro del perfil obtenido para esta misma muestra se identificó la presencia del alcohol perílico, otro de los metabolitos formados a partir del sustrato y cuya concentración fue la más alta en comparación con los demás compuestos identificados (**figura 4.31**), demostrando así una mayor actividad. Sin embargo, no se puede afirmar que el total del porcentaje obtenido corresponda al limoneno biotransformado. Ya que, como se ha evidenciado con otras cepas, este medio de cultivo convencional muestra tendencia a retener parte del sustrato.

En resumen, de este primer ensayo a escala laboratorio, se observó que, en cuanto a los blancos de sustrato y medio de cultivo, la retención, o degradación del limoneno es mayor en el medio de cultivo convencional, situación que disminuye con la presencia de microorganismos, que impedirían de alguna manera este efecto del medio sobre el limoneno. Así mismo, se evidenció que la biotransformación del sustrato por parte de los microorganismos se vio afectada por el tipo de medio y dados los resultados no es posible afirmar cuál de los dos medios fue mejor, ya que podría emplearse según el perfil que se desee obtener.

Otro aspecto interesante sobre el cual se podría enfatizar es que al comparar la cantidad total de limoneno adicionado y parte del biotransformado por los microorganismos con las cantidades de los metabolitos obtenidos únicamente del proceso de biotransformación, no se evidencia una relación directa, es decir la cantidad de limoneno biotransformado no corresponde a la cantidad de metabolitos obtenidos, por lo que alguna situación adicional se estaría presentando con el sustrato (retención en el medio, degradación etc.). Al revisar la bibliografía, algunos autores mencionan que es posible que, durante el proceso de biotransformación, el limoneno sea metabolizado por la cepa del hongo para producir biomasa o para otros fines, de tal manera que no se estaría evidenciando toda la cantidad de limoneno

biotransformado en los respectivos terpenoides producidos (Dave 2014; Jucoski M., Bianchi A., Soccol R. 2016).

4.4.2.1.1.2 Seguimiento del proceso de biotransformación en el tiempo

Con el fin de conocer el momento en el cual daba comienzo el proceso de biotransformación del limoneno y a su vez identificar el orden de aparición de los distintos grupos de metabolitos (relacionados directamente con la biotransformación del limoneno, relacionados con la biotransformación de los otros compuestos presentes en el sustrato y aquellos producidos sin ninguna relación directa con el limoneno ni los otros compuestos). Se decidió realizar un seguimiento del proceso de biotransformación durante ocho horas. Para ello se siguió el procedimiento descrito en el numeral 3.2.5.2.1.1.2.

Se emplearon las cepas *A. flavus* y *G. citri-aurantii* y utilizó tanto el medio de cultivo convencional, como en el medio de cultivo elaborado con los residuos. Cabe resaltar que el tiempo total que se eligió para realizar el seguimiento del proceso, fue el resultado de una revisión bibliográfica y de la media de tiempo empleada por diferentes autores, quienes han realizado ensayos con el mismo tipo de sustrato (Parshikov, Sutherland, 2014; Molina *et al*, 2015; Jucoski *et al*, 2017).

En el **Anexo VI, tablas A6.2 y A6.3**, se encuentran todos los compuestos obtenidos con sus respectivos tiempos e índices de retención para el microorganismo *A. flavus* y en el **Anexo VI, tablas A6.4 y A6.5** los resultados correspondientes al microorganismo *G. citri-aurantii*. En ambos casos se incluyen los resultados de los blancos de sustrato y medio.

De acuerdo con el procedimiento, los primeros extractos en analizar, fueron los correspondientes al tiempo cero (justamente tras la adición del sustrato), para todas las muestras. En este punto los resultados obtenidos fueron los esperados. Ya que tanto en las muestras control, como en las muestras con presencia de microorganismos, se identificaron además del limoneno, los demás compuestos que se habían encontrado junto con este (**tabla 4.37**).

Sin embargo, pasados los primeros 180 minutos los perfiles identificados especialmente en las muestras control, para ambos medios de cultivo fueron distintos a los identificados en el tiempo cero. De forma que, se pudo comprobar, que en ausencia de microorganismo, las condiciones propias tanto del medio como del procedimiento presentan un efecto sobre el limoneno. Dentro de los compuestos identificados, se encontró carveol,

trans-p-menta-2,8-dien-ol, 1R, 4*R*-*p*-menta-2,8-diel-1-ol y *cis*-carveol. Estos terpenos fueron apareciendo de forma constante y en concentraciones similares durante el tiempo de seguimiento restante.

En cuanto al limoneno cuantificado en las muestras control, se observó un descenso en la cantidad de limoneno en el medio. Esto se vio reflejado en el aumento del porcentaje de limoneno residual (limoneno transformado, degradado y/o retenido en el medio de cultivo) calculado a partir de la diferencia de la cantidad total de limoneno adicionado y la cantidad de limoneno recuperada en cada muestra. En la **figura 4.32**, se indica el porcentaje de limoneno residual en las muestras control de los dos medios de cultivo.

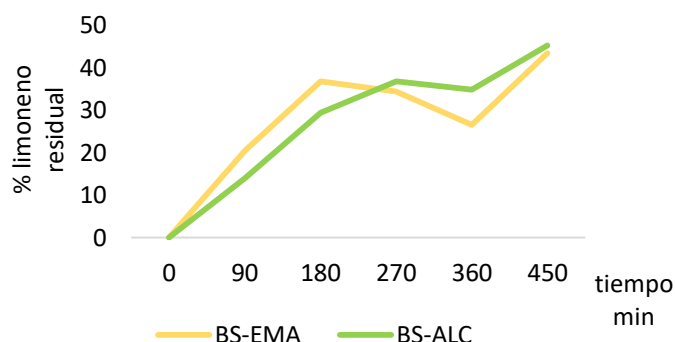


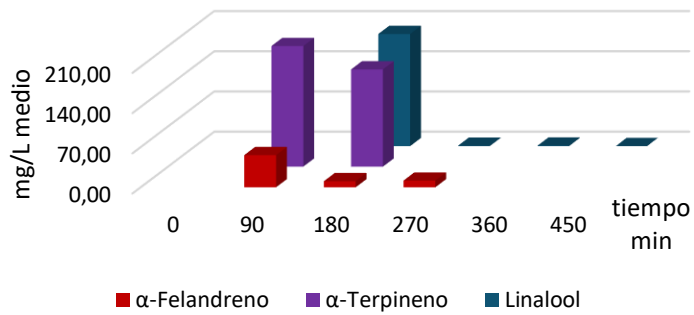
Figura 4.32. Porcentaje de limoneno residual en las muestras control del medio de cultivo y el sustrato en ausencia de microorganismo, para el medio de medio cultivo convencional (BS-EMA) y el medio de cultivo elaborado con los residuos (BS-ALC), durante las ocho horas de seguimiento.

Considerando estos resultados se procedió al análisis de los resultados obtenidos para las cepas evaluadas. De forma que, solo se tuvieron en cuenta aquellos compuestos que presentaron una relación directa con la biotransformación tanto del sustrato como de los demás compuestos presentes con este y de aquellos que no provenían de la degradación propia del limoneno en el medio y no presentaron ninguna relación directa de biotransformación con el limoneno ni los demás compuestos conocidos.

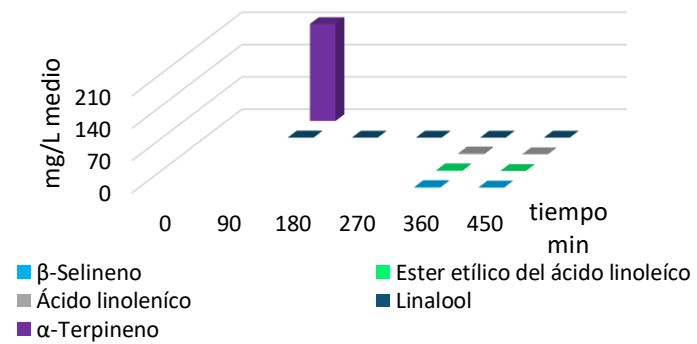
Aspergillus flavus:

A continuación, en la **figura 4.33**, se muestran las concentraciones en mg/L de los compuestos identificados en el seguimiento del proceso de

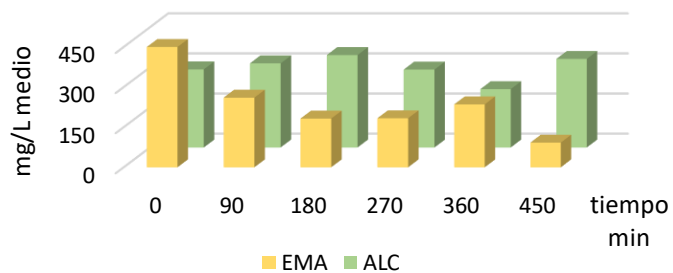
biotransformación por la cepa *A. flavus*, tanto en el medio de cultivo convencional como en el medio elaborado con los residuos. Se incluye además la concentración de limoneno obtenida para cada muestra.



a.



b.



c.

Figura 4.33. Concentración (mg/L) del limoneno y de los compuestos identificados tras el seguimiento del proceso de biotransformación del limoneno estándar por el microorganismo *A. flavus*. a. Biotransformación en

el medio de cultivo convencional. **b.** Biotransformación en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa. **c.** concentración del limoneno en el medio elaborado con extracto de malta (EMA) y con residuos de alcachofa (ALC).

Tal y como se evidencia, el proceso de biotransformación se desarrolló de una forma distinta en cada medio empleado. Dando como resultado la identificación de diferentes metabolitos.

Por un lado, en el medio de cultivo convencional se identificó α -felandreno, α -terpineno y linalool como productos relacionados con la biotransformación directa del limoneno por el microorganismo.

El primero de estos compuestos, ya se había identificado dentro de los metabolitos obtenidos durante los ensayos de optimización del proceso de biotransformación (**tabla 4.34**), por lo que su presencia resulta lógica, además de ser uno de los metabolitos reportados dentro de la biotransformación del limoneno por la acción de algunos hongos y bacterias (Demyttenaere 2001). Dado que es un compuesto con aroma a menta con toques cítricos, tiene aplicaciones y es de interés en el ámbito de los aromas y fragancias. Finalmente resulta interesante ver como la obtención de este compuesto se realiza únicamente durante las primeras 4 horas con una concentración máxima de 55,9 mg/L. Transcurrido este tiempo su concentración disminuye.

Una situación similar se presentó con el metabolito, cuya identificación y mayor concentración (260,51 mg/L) se obtuvo pasados los 90 minutos de adición del sustrato y hasta los 180 minutos. Cabe mencionar que, pese a que este compuesto no se había identificado, uno de sus isómeros γ -terpineno sí. En los ensayos de biotransformación bajo condiciones optimizadas (numeral 4.4.2.1.1.1, **fig 4.29**). Por lo que merece la pena resaltar que al igual que los demás tipos de terpinenos, su particular aroma a pino, hierbas y flores lo convertiría en un blanco de interés.

En cuanto al linalool, este se identificó sobre los 180 minutos después de haber dado inicio al proceso de biotransformación y fue además en este periodo de tiempo cuando se observó una mayor concentración de este metabolito superando los 195 mg/L. La desaparición posterior se explicaría o bien por la degradación del propio compuesto en el medio o por acción del microorganismo.

En cuanto a los resultados obtenidos en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa (**fig. 4.33b**), se obtuvieron dos de los tres

compuestos relacionados directamente con la biotransformación del limoneno por parte del microorganismo, identificados en los resultados obtenidos en el medio e cultivo convencional. En primer lugar, se obtuvo α -terpineno, en una concentración de 317,63 mg/L a los 90 minutos, sin embargo y pese a tener una mayor concentración que en el caso del otro medio, pasado este tiempo, el compuesto no se identificó más. En segundo lugar y a diferencia de lo observado en el medio de cultivo convencional, el compuesto linalool fue identificado a los 90 minutos, y no a los 180, sin embargo, las concentraciones en las que se identificó este compuesto no superaron los 0.30 mg/L lo que indica que las condiciones de este medio no serían favorables para la obtención de este metabolito.

Respecto al resto de compuestos identificados β -selineno, éster etílico del ácido linoleico y ácido linolénico, empezaron a ser detectados en el medio de cultivo sobre el minuto 360.

Finalmente, al observar la variación de la concentración del limoneno en cada una de las muestras analizadas a través del tiempo (**fig. 4.33c**). Se evidenció en el caso del medio de cultivo convencional, que esta fue disminuyendo con el paso del tiempo, obteniéndose la mínima concentración al minuto 450 (92,31 mg/L). Sin embargo, esta disminución no se vio directamente relacionada con la cantidad de metabolitos identificados, sino con una variación entre estos. De manera que, este microorganismo ejercería una mayor actividad relacionada con el limoneno pasados las 8 horas.

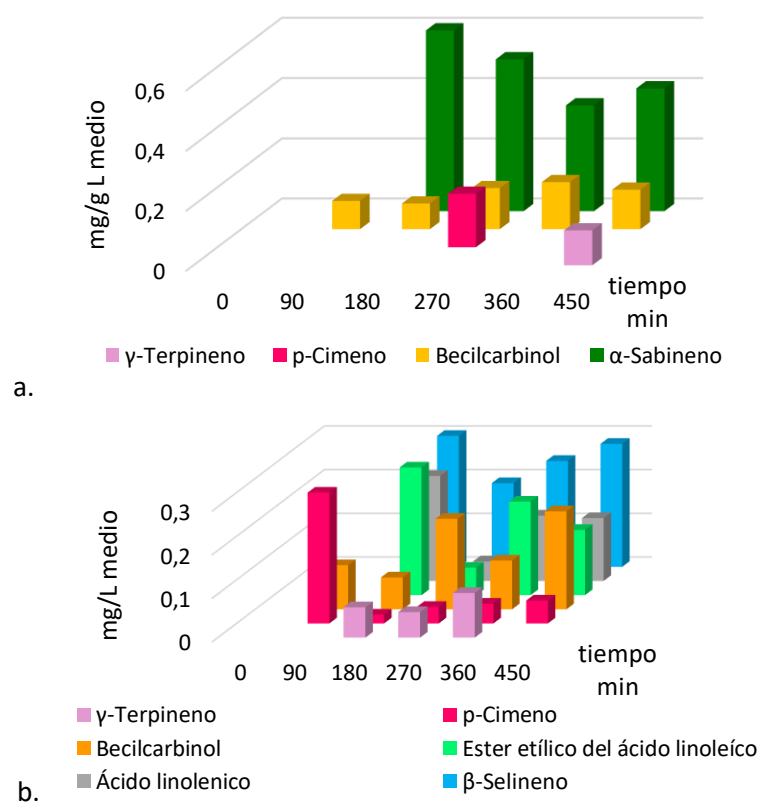
En cuanto al medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa, las mínimas concentraciones de limoneno obtenidas se registraron en el minuto 360 (218,29 mg/L). Una situación que no concuerda con lo observado al minuto 90, que fue el momento en el cual se evidenció una mayor actividad del microorganismo sobre el sustrato reflejada en la identificación de α -terpineol (**fig. 4.33b**). por consiguiente, la disminución de la concentración de limoneno y la ausencia de compuestos relacionados directamente con su biotransformación podría estar relacionada con la premisa que se discutió en apartados anteriores referente a la degradación del limoneno en el medio o al empleo del microorganismo para la producción de biomasa o producción de otros compuestos que no se identificaron por los métodos empleados.

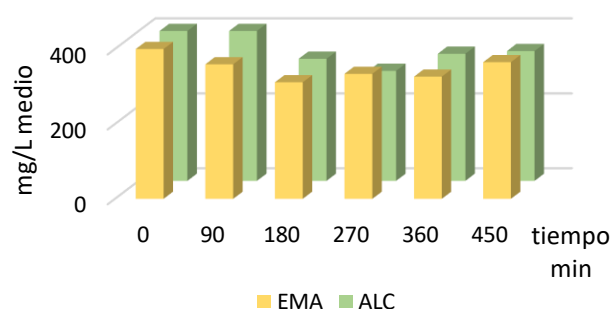
En términos generales se puede afirmar que pese a haber obtenido datos importantes en el seguimiento del proceso de biotransformación para los dos medios, el periodo de tiempo evaluado no fue suficiente para identificar

los grupos de compuestos relacionados directamente o no con la biotransformación del limoneno o de los demás compuestos presentes en el sustrato, que fueron identificados en los ensayos de optimización.

Geotrichum citri-aurantii:

A continuación, en la **figura 4.34**, se muestran las concentraciones en mg/L de los compuestos identificados en el seguimiento del proceso de biotransformación del limoneno estándar por la cepa *G. citri-aurantii*, tanto en el medio de cultivo convencional como en el medio elaborado con los residuos, así como la variación de la concentración del limoneno en los mismos.





c.

Figura 4.34. Concentración (mg/L) del limoneno y de los compuestos identificados tras el seguimiento del proceso de biotransformación del limoneno estándar por el microorganismo *G. citri-aurantii*. **a.** Biotransformación en el medio de cultivo convencional. **b.** Biotransformación en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa. **c.** concentración del limoneno en el medio elaborado con extracto de malta (EMA) y con residuos de alcachofa (ALC).

Como se observa la mayor actividad por parte del microorganismo se evidenció en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa. Ya que se identificaron un mayor número de metabolitos.

Dentro de los compuestos identificados relacionados con la biotransformación directa del limoneno, se encontraron γ -terpineno y *p*-cimeno en los dos medios de cultivo (EMA y ALC). La identificación de estos compuestos ocurrió en tiempo diferentes. Por un lado, se observó que la obtención de *p*-cimeno se vio favorecida en el medio de cultivo elaborado con los residuos, su primera identificación se obtuvo a los 90 minutos (0,41 mg/L) y se sigue identificando a concentraciones menores durante el resto del tiempo. En el medio de cultivo convencional, por el contrario, solo se identificó sobre los 270 minutos, con una concentración bastante inferior a la obtenida en el otro caso (0,18 mg/L). Así mismo ocurrió con el compuesto γ -terpineno, ya que se identificó sobre los 180 minutos en el medio de cultivo elaborado con los residuos y sobre los 450 minutos en el medio de cultivo convencional, sin embargo, las concentraciones identificadas en ambos casos fueron bastante similares y no superaron los 0,10 mg/L.

En lo que respecta al compuesto bencilcarbinol se identificó sobre los 90 minutos en los dos medios de cultivo evaluados. Los rangos de concentración fueron bastante similares, siendo mayor sobre los 450 minutos (0,13 mg/L

en el medio de cultivo convencional y 0,22 mg/L en el medio elaborado con los residuos) lo que indicaría que la composición del medio no afectaría la producción de este compuesto. Cabe recordar que es un metabolito, que se ha ido identificando para esta cepa, desde la evaluación de la actividad metabólica (**fig 4.18**, día 3), en los ensayos de la optimización (**tabla 4.34**) y en la biotransformación realizada con las condiciones optimizadas (figura 4.30).

Al igual que con el microorganismo anterior y en concordancia con los resultados observados en los ensayos de optimización, se identificaron β -selineno, éster etílico del ácido linoleico y ácido linolénico sobre los 180 minutos, en el medio elaborado con los residuos de alcachofa, con lo que se estaría comprobando la capacidad que tiene el microorganismo para liberar estos compuestos al medio y en un intervalo de tiempo más corto que la cepa anterior.

Finalmente, las concentraciones del limoneno (**fig 4.34c**) fueron similares para los dos medios de cultivo empleados (EMA y ALC) en los periodos de tiempo evaluados. Sin embargo, fueron ligeramente inferiores entre los 180 y 360 minutos. Tiempo en el cual se identificó el mayor número de compuestos en sus concentraciones máximas. Se evidenció que para los dos casos fueron ligeramente menores entre los 180 y 360 minutos.

En general, esta cepa demostró potencial para la biotransformación del sustrato y la obtención de otros compuestos, dependiendo del medio de cultivo empleado. A diferencia de la cepa anterior, en el periodo de tiempo evaluado, se pudo identificar que su mayor actividad estuvo entre las 3 y 6 horas.

4.4.2.1.1.3 Escalado pre-piloto

Teniendo en cuenta, que uno de los objetivos del estudio es la posible aplicación de los aromas obtenidos en la industria de las fragancias, se decidió pre-escalar el proceso optimizado de biotransformación del limoneno tal y como se describe en el numeral 3.2.5.3.1, del apartado de métodos. Para esto, se emplearon reactores con volúmenes de capacidad mayores, de 250 mL y 1L de capacidad.

Escalado en reactores de 250 mL de capacidad:

En este proceso de biotransformación del limoneno estándar o comercial, en escala pre-piloto, se emplearon las cepas *G. citri-aurantii* (M4), *A. flavus* (LE2)

y *A. niger* (M3). Se siguió el protocolo descrito en el numeral 3.2.5.3.1.1 del apartado de métodos.

Los resultados obtenidos para cada cepa se describen a continuación. Sin embargo, cabe resaltar que, al igual que, en los ensayos a pequeña escala, solo se indicarán los compuestos que presentaron una relación directa con la biotransformación del limoneno o de los demás compuestos presentes en el sustrato y aquellos metabolitos producto de otras fuentes presentes en el medio. En el **Anexo VI**, tabla **A6.6** se indican los resultados de todos y cada uno de los compuestos identificados, tanto en las muestras control como en las muestras provenientes del proceso de biotransformación en cada medio evaluado, con sus respectivos tiempos de retención, así como los índices teóricos y experimentales que permitieron su confirmación.

Tras el proceso llevado a cabo en este tipo de reactores, se obtuvieron en general los mismos compuestos que se habían identificado en los perfiles obtenidos en los procesos llevados a cabo en escala laboratorio para todas las cepas evaluadas, especialmente en el medio de cultivo convencional. No obstante, se identificaron algunos compuestos que no se habían evidenciado en los ensayos anteriores y variaciones en las concentraciones obtenidas.

Aspergillus niger:

En la figura **4.35** se indican los compuestos obtenidos en los dos medios evaluados tras la biotransformación del sustrato por la cepa del microorganismo *A. niger*.

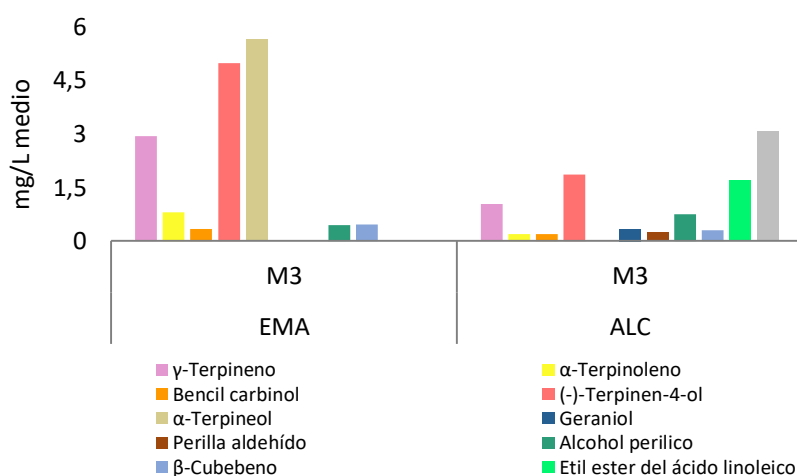


Figura 4.35. Cantidades absolutas (mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de biotransformación de limoneno comercial en reactores de 250 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *A. niger* (M3) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y el medio de residuos de alcachofa (ALC).

Al observar los resultados obtenidos en el medio de cultivo convencional, se destaca inicialmente la presencia de los compuestos directamente relacionados con la biotransformación del limoneno. En general la mayoría de estos fueron los mismos que los que se identificaron en los ensayos anteriores para la misma cepa. Tal es el caso del terpinen-4-ol y α -terpineol, cuyas concentraciones fueron superiores (4,98 y 5,65 mg/L respectivamente) en comparación con los demás metabolitos identificados e incluso superiores a las obtenidas en los ensayos a pequeña escala. Sin embargo, al observar los resultados para compuestos como γ -terpineno y α -terpinoleno las concentraciones obtenidas fueron mucho menores (2,93 y 0,80 mg/L respectivamente). Adicionalmente se identificó alcohol perílico (0,44 mg/L), un metabolito que no se había observado en los ensayos a escala laboratorio, y que está directamente relacionado con la biotransformación del limoneno, de hecho, es uno de los principales metabolitos que reportan algunos autores, pues se obtiene por la vía del mevalonato (figura 1.5) mediante la hidroxilación del limoneno (Van Der Werf 1990, **Fig 1.10**).

En cuanto a los compuestos identificados en las muestras provenientes del medio de cultivo elaborado con los residuos que presentaron una relación directa con la biotransformación del limoneno, se destacó la presencia de γ -

terpineno (1,03 mg/L), terpinen-4-ol (1,87 mg/L), alcohol perílico (0,75 mg/L) y perilla aldehído (0,25 mg/L). Este último llama la atención, pues probablemente es producto de la oxidación del alcohol perílico (Mann 1994, **fig 1.10**), probablemente por la acción del microorganismo o por las mismas condiciones del medio. Estos dos compuestos, tanto el alcohol perílico como su respectivo aldehído, son de gran interés en la industria de los aromas gracias a su aroma mentolado con toques de canela.

En lo que respecta a los demás compuestos identificados, que no presentaron una relación directa con la biotransformación del limoneno, se encontró uno que llamo la atención. Pues no se había identificado en los ensayos a pequeña escala. Este compuesto corresponde al geraniol. Identificado en las muestras en las que se empleó el medio de cultivo elaborado con los residuos. Tras una revisión bibliográfica, su identificación, podría deberse a la biotransformación del linalool (compuesto presente en el sustrato junto con el limoneno, tabla 4.37). Sin embargo, este hecho solo se ha reportado en medios ácidos o en condiciones muy específicas (Semikolenov 2003; Ghosh 2013; Mirata 2008; Elsharif 2015;), por lo que en este estudio obtener este terpeno, resultaría además de novedoso, muy beneficioso, teniendo en cuenta el interés sobre este, gracias a su aroma floral característico, además de su bajo umbral olfativo, que permitiría percibirlo a la concentración obtenida 0,33 mg/L.

Por otra parte, dentro de este mismo grupo de compuestos, se identificaron en los dos medios de cultivo empleados (EMA y ALC) bencilcarbinol (0,33 y 0,19 mg/L) y β -cubebeno (0,46 y 0,31mg/L). En cuanto al primero, se tenía referencia, puesto que fue identificado en los ensayos a pequeña escala (únicamente en el medio de cultivo convencional), en lo que respecta al segundo, no se tenía referencia previa.

Finalmente se identificaron en concentraciones inferiores, los compuestos éster etílico del ácido linoleico y el ácido linolénico (1,70 y 3,06 mg/L respectivamente) liberados al medio de residuos de alcachofa por la acción del microorganismo, tal y como se había evidenciado en los ensayos a escala laboratorio.

Con toda esta información y relacionando los resultados obtenidos tanto a escala laboratorio como a escala pre-piloto en cuanto a los perfiles, es posible afirmar, que la cantidad de sustrato adicionada, que en este caso fue mayor, así como las condiciones propias de ensayo en estas dimensiones,

favorecieron el potencial del microorganismo en el medio de cultivo elaborado con los residuos y se potencializó la formación de los principales productos de interés en el medio de cultivo convencional.

Aspergillus flavus:

En la **figura 4.36** se indican los compuestos obtenidos en los dos medios evaluados tras la biotransformación del sustrato por la cepa del microorganismo *A. flavus*.

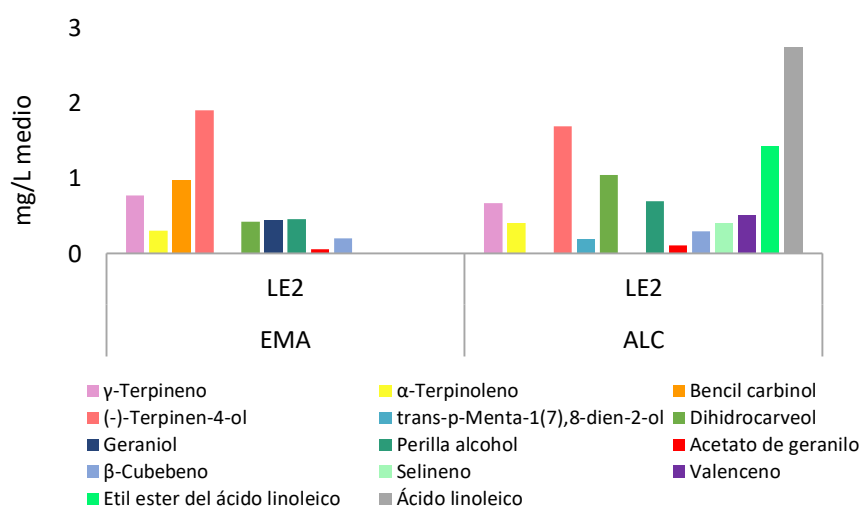


Figura 4.36. Cantidades absolutas (mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de biotransformación de limoneno comercial en reactores de 250 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *A. flavus* (LE2) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y el medio de residuos de alcachofa (ALC).

De los compuestos identificados que se relacionaron directamente con la biotransformación del limoneno, se obtuvieron en su gran mayoría los mismos que los identificados en los ensayos a escala laboratorio. Sin embargo, al comparar las concentraciones obtenidas con las concentraciones en los ensayos a escala laboratorio (**fig. 4.29**), se observó que para algunos compuestos fueron inferiores. Tal es el caso de γ -terpineno (0,77 y 0,67 mg/L), α -terpinoleno (0,30 y 0,40 mg/L) en los dos medios de cultivo empleados (EMA y ALC) y de γ -terpinen-4-ol (1,90 mg/L) en el medio de cultivo convencional. Pese a esto, se evidenció la presencia de dihidrocarveol en las muestras provenientes del medio elaborado con el

residuo de alcachofa, lo que resulto interesante teniendo en cuenta que no se había evidenciado este metabolito en los ensayos a menor escala, y es un compuesto que ha sido reportado por algunos autores tras la biotransformación del limoneno (Adams 2003).

Por otro lado, y al igual que lo observado con la cepa anterior, en este caso se identificaron compuestos como geraniol en el medio de cultivo convencional, peril aldehído y acetato de geranilo en ambos medios, indicando una mayor actividad del hongo bajo estas condiciones, dando lugar a un perfil llamativo teniendo en cuenta los toques aromáticos que podrían dar estos compuestos, tal y como se comentó en el análisis del microorganismo *A. niger*.

Dentro de los compuestos que no se relacionaron directamente con la biotransformación del limoneno o de los demás compuestos presentes en el sustrato, se destacó la presencia de bencilcarbinol (0,97 mg/L) y β -copaeno, identificados en el medio de cultivo convencional y de β -cubebeno identificado en los dos medios de cultivo.

Finalmente se identificaron éster etílico del ácido linoleico, ácido linolénico y β -selineno, en cantidades inferiores a las obtenidas a escala laboratorio.

De forma general se podría decir que, pese a la obtención de concentraciones inferiores, el microorganismo demostró una actividad muy similar a la observada a escala laboratorio. En cuanto a los perfiles obtenidos en cada medio y con la presencia de compuestos de gran valor en el objetivo de este estudio.

Geotrichum citri-aurantii:

En la **figura 4.37** se indican los compuestos obtenidos en los dos medios evaluados tras la biotransformación del sustrato por la cepa del microorganismo *G. citri-aurantii*.

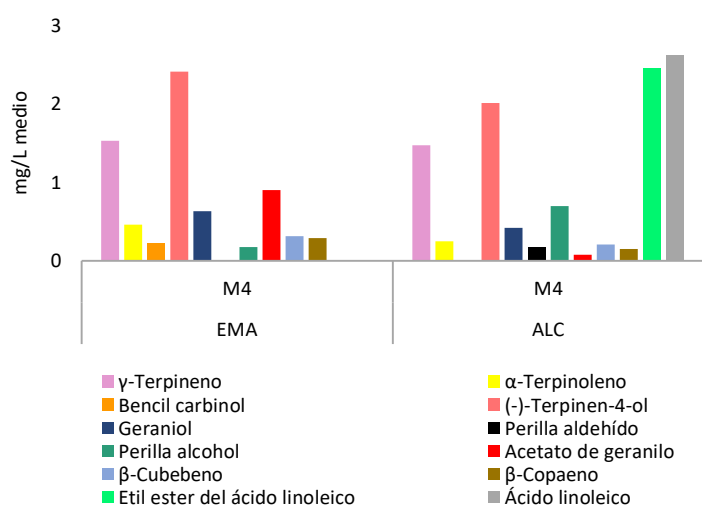


Figura 4.37. Cantidades absolutas (mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de biotransformación de limoneno comercial en reactores de 250 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *G. citri-aurantii* (M4) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y el medio de residuos de alcachofa (ALC).

De los compuestos identificados que se relacionaron directamente con la biotransformación del limoneno, se obtuvieron en su gran mayoría los mismos que en los ensayos a escala laboratorio tal y como ha ocurrido con las cepas anteriores. Sin embargo, las concentraciones en este caso fueron menores que en los ensayos a pequeña escala (figura 4.30). Tal es el caso de compuestos como: γ -terpineno (1,53 mg/L EMA y 1,47 mg/L ALC), α -terpinoleno (0,46 mg/L EMA y 0,24 mg/L ALC) y terpinen-4-ol (2,41 mg/L EMA y 2,01 mg/L ALC). A pesar de esto, identificó alcohol perílico en las muestras de los dos medios de cultivo empleados (0,17 mg/L EMA y 0,70 mg/L ALC), lo que resulta interesante teniendo en cuenta que no se había evidenciado este metabolito para esta cepa en los ensayos a menor escala.

Por otro lado, y al igual que lo observado con las cepas anteriores, se identificaron en los dos medios de cultivo (ALC y EMA) compuestos como geraniol (0,63 y 0,41 mg/L) y acetato de geraniol (0,90 y 0,08 mg/L). En el caso de perilla aldehído (0,17 mg/L) solo se identificó en las muestras en las que se empleó el medio de cultivo elaborado con los residuos, indicando que las condiciones del escalado favorecerían la producción de estos compuestos

que, como se dijo anteriormente, resultarían de interés dada la aplicación de estos metabolitos en la elaboración de algunas fragancias.

En cuanto al compuesto bencilcarbinol (0,22 mg/L) la concentración fue menor que la obtenida en los ensayos a una escala menor en el medio de cultivo convencional (**Fig.4.30**). Así mismo se identificaron dos compuestos en ambos medios de cultivo (EMA y ALC) que no se habían identificado en los ensayos a pequeña escala. Estos compuestos corresponden a β -copaeno (0,29 y 0,15 mg/L) y β -cubebeno (0,31 y 0,21 mg/L).

Adicionalmente, se comprobó el potencial de liberación de los compuestos éster etílico del ácido linoleico (2,45 mg/L) y ácido linolénico (2,62 mg/L) por la acción del microorganismo sobre el medio elaborado con los residuos de alcachofa, tal y como se ha evidenciado en todos los demás ensayos a pequeña y gran escala.

Con todo esto, se pudo ver que al igual que con las otras cepas, la actividad del microorganismo queda más que confirmada, así como su potencial para producir otros compuestos directa o indirectamente relacionados con el limoneno o los demás compuestos presentes en el sustrato o en el medio.

En lo relacionado con la cantidad de limoneno recuperado y el porcentaje de limoneno residual (limoneno biotransformado, degradado y/o retenido en el medio de cultivo) en las muestras de todas las cepas estudiadas, se observó que se presentó una disminución en cuanto al sustrato biotransformado tal y como se muestra en la **tabla 4.39**.

Tabla 4.39. Cantidad de limoneno estándar (en mg/L) recuperada del medio de cultivo en cada una de las muestras provenientes del proceso de biotransformación a escala pre-piloto en reactores de 250 mL de capacidad, por parte de las cepas *A. niger*, *A. flavus* y *G. citri-aurantii*, tanto en el medio de cultivo convencional (EMA) como en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa (ALC) y en las respectivas muestras control, con sus porcentajes de recuperación y limoneno residual en cada caso.

Medio	Muestra	mg/L	% limoneno recuperado	% de limoneno residual
EMA	BS-EMA	875,61±0,02	87,56	-
	<i>A. niger</i>	825,55±3,44	82,55	17,45
	<i>A. flavus</i>	447,39±2,00	44,74	55,26
	<i>G. citri-aurantii</i>	525,81±0,86	52,58	47,42
ALC	BS-ALC	995,06±4,80	99,51	-
	<i>A. niger</i>	821,16±2,62	82,12	17,88
	<i>A. flavus</i>	748,82±1,54	74,88	25,12
	<i>G. citri-aurantii</i>	555,25±1,83	55,52	44,48

¹Este porcentaje corresponde al total del limoneno que pudo ser biotransformado, degradado y/o retenido por el medio de cultivo. Por lo tanto, no corresponde necesariamente al limoneno total biotransformado por los microorganismos.

Al comparar estos resultados, con los obtenidos en los ensayos a escala laboratorio (**tabla 4.38**). Se evidenció una mayor recuperación de limoneno del blanco de sustrato y medio elaborado con extracto de malta (87%) en este escalado que en los ensayos a pequeña escala (31%). De forma que probablemente las condiciones del proceso pudieron disminuir el efecto de retención del limoneno en el medio que se había estado evidenciando en los ensayos a escala laboratorio.

En cuanto al porcentaje de limoneno residual obtenido, resulta interesante observar como este valor fue inferior para la cepa *A. niger* en los dos medios de cultivo evaluados (17,45% EMA y 17,88% ALC) que en los ensayos a pequeña escala (44,32% EMA y 38,69% ALC). Teniendo en cuenta que este valor no representa el porcentaje real de limoneno empleado por el microorganismo sino el limoneno que o bien ha empleado el microorganismo para biotransformarlo, o como fuente de carbono e hidrógeno, o que se ha degradado en el medio etc., No es posible afirmar que la actividad de esta cepa fuese mayor o no en este escalado. Lo que si se evidencia es que hay una actividad, que se ve reflejada en la identificación de los compuestos.

Por otro lado, los valores de limoneno residual para la cepa *A. flavus* fueron similares a los obtenidos en los ensayos a pequeña escala (**tabla 4.38**) en los dos medios de cultivo empleados.

Finalmente, se observó un mayor porcentaje de limoneno residual en la cepa *G. citri-aurantii* en las muestras con el medio de cultivo elaborado con residuos (44,48%) que en los ensayos a pequeña escala (6,64%) para el mismo medio. Sin embargo, aunque estos valores no corresponden al limoneno empleado totalmente por el microorganismo para la producción de ciertos metabolitos, si son valores que estarían reflejando en este caso una mayor actividad de esta cepa ya que también se identificaron más compuestos que en los ensayos a pequeña escala.

En general, el proceso de escalado permitió obtener nuevos perfiles que serían de interés en el ámbito de los aromas y las fragancias, dada la aparición de nuevos compuestos y del aumento de la concentración de aquellos que tendrían algún interés particular.

Escalado en reactores de 1L de capacidad:

Para el escalado en los reactores de 1 L de capacidad, se emplearon las cepas *A. flavus* (LE2) y *G. citri-aurantii* (M4). Se siguió el protocolo descrito en el numeral 3.2.5.3.1.2 del apartado de métodos.

En general se identificaron los mismos perfiles que los obtenidos en el escalado anterior. Cabe recordar que en el anexo A6.7 se encuentran las cantidades absolutas de cada uno de los compuestos identificados en las muestras de las dos cepas, en los dos medios de cultivo evaluados, incluidos también los resultados de las muestras control de medio y sustrato para cada caso, así como los tiempos de retención y los índices que permitieron la confirmación de los compuestos.

A pesar de las similitudes en los perfiles, las concentraciones de todos o de la gran mayoría de compuestos provenientes de la biotransformación del sustrato, fueron menores y en muy pocos casos ligeramente similares a las obtenidas en el ensayo anterior y por lo tanto inferiores a las obtenidas a escala laboratorio.

Teniendo en cuenta que la cantidad adicionada de limoneno fue mucho mayor en este ensayo (cuatro veces superior a la cantidad que se añadió en el escalado con un reactor de 250 mL), las cantidades obtenidas de los

distintos compuestos cuantificados en este escalado, apenas llegaron a ser entre 2 y 3 veces mayores que las obtenidas con el reactor de 250 mL y en algunos casos menores.

Este fue el caso de los compuestos: γ -terpineno, terpinoleno y terpinen-4-ol para las dos especies en los dos medios de cultivo. Por otro lado, en cuanto al alcohol perílico, identificado en las muestras de los dos medios de cultivo evaluados en el ensayo anterior, solo se identificó en las muestras en las que se empleó el medio de cultivo elaborado con los residuos, eso sí en una concentración menor. Una situación similar ocurrió con el geraniol, identificado únicamente en las muestras de la cepa *G. citri-aurantii*.

En cuanto a los compuestos que no se relacionaron directamente con la biotransformación del limoneno o de los demás compuestos presentes en el sustrato, sorprendió, por un lado, la ausencia de bencilcarbinol en las muestras de la cepa *A. flavus* en los dos medios de cultivo y, por otro lado, la baja concentración de este mismo compuesto en las muestras de la cepa *G. citri-aurantii* en el medio elaborado con los residuos. Así mismo cabe destacar la presencia de compuestos como: copaeno y β -cubebeno (identificados en el pre-escalado anterior) lo que confirmó que las condiciones de escalado favorecerían la aparición de este tipo de compuestos y la presencia de acetato de nerilo en los dos medios de cultivo para la cepa *G. citri-aurantii*, ya que no se había identificado en los otros ensayos. Demostrando que este microorganismo tiene capacidad para transformar el limoneno en nerol (un isómero geométrico del geraniol, cuyo aroma tiene toques florales y frutales) bajo las condiciones del escalado realizado.

Finalmente se identificó el éster etílico de ácido linoleico y el ácido linolénico liberados del medio de los residuos de alcachofa por el microorganismo, sin embargo, en una menor concentración al escalado anterior.

En base a los resultados obtenidos, se pudo determinar que las condiciones físicas en la etapa de extracción no permitieron que los metabolitos producidos durante el proceso, se liberasen del sistema y por lo tanto la cantidad cuantificada no correspondiese a lo producido realmente. Explicando las bajas concentraciones y posiblemente la ausencia de algunos compuestos que se habían identificado en otros ensayos. Por lo que teniendo en cuenta que los perfiles obtenidos de aromas en las muestras fueron similares a los obtenidos en los ensayos a pequeña escala e incluso la

aparición de nuevos compuestos de interés de acuerdo con el objetivo del estudio, la optimización en la fase de extracción del proceso, podría convertir este escalado en una alternativa para obtención de compuestos de interés que pudiesen aplicarse en la industria de aromas.

4.4.2.2. Biotransformación del limoneno contenido en el aceite extraído de los residuos (DBA-M)

Tal y como se indicó al inicio del numeral 4.4.2, dentro de los sustratos evaluados, se incluyó el limoneno contenido en el aceite extraído de los residuos de mandarina (fig. 4.38).

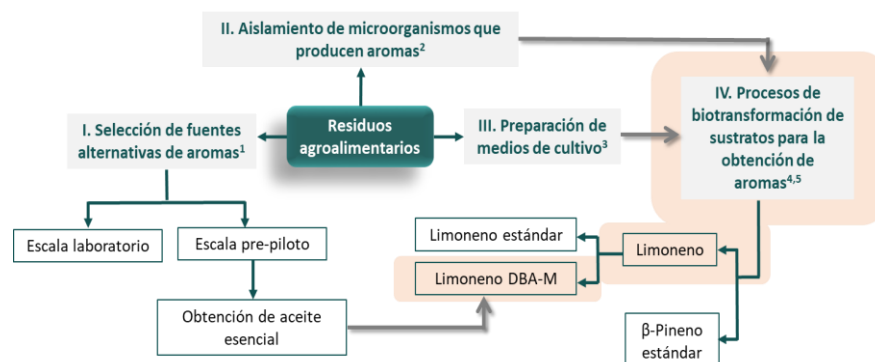


Figura 4.38. Esquema general del proyecto de investigación. Se indican los cuatro ejes que relacionan el uso directo o indirecto de residuos y se incluyen las citas de los apartados correspondientes a los métodos aplicados en cada etapa. En el esquema se resalta la parte que corresponde a los resultados y discusión de los procesos de biotransformación del limoneno contenido en el aceite esencial extraído de los residuos de mandarina, para la obtención de aromas a escala laboratorio. ¹3.2.2 **Figura 3.1**; ²3.2.3; ³3.2.4; ⁴3.2.5.1; ⁵3.2.5.2 **Figura 3.9**.

Con el fin de dar un uso total a los residuos en todo el proceso, de tal manera que se englobara su empleo en el objetivo de este trabajo, se decidió evaluar la biotransformación del limoneno contenido en el aceite, previamente extraído de los residuos de mandarina, tras el proceso de escalado (4.1.3).

Tal y como se caracterizó el aceite en el apartado 4.1.3.3, para dar inicio al proceso de biotransformación de este sustrato, se tuvo en cuenta la presencia de los demás compuestos presentes en el aceite, de tal manera que se pudiesen identificar posteriormente, en los extractos resultantes del

proceso, los compuestos relacionados directamente con la biotransformación del limoneno, o de los demás compuestos presentes en el aceite y aquellos que no presentasen una relación directa, pero sí que fuesen resultado de la actividad del hongo.

Teniendo en cuenta que el sustrato empleado, contenía un mayor número de compuestos diferentes al limoneno (pese a que este se encontraba en una mayor concentración), se realizó un seguimiento de los perfiles obtenidos en las muestras control en cada uno de los medios evaluados, tras la culminación de todo el proceso. En la **figura 4.39** se indican los compuestos identificados en cada caso.

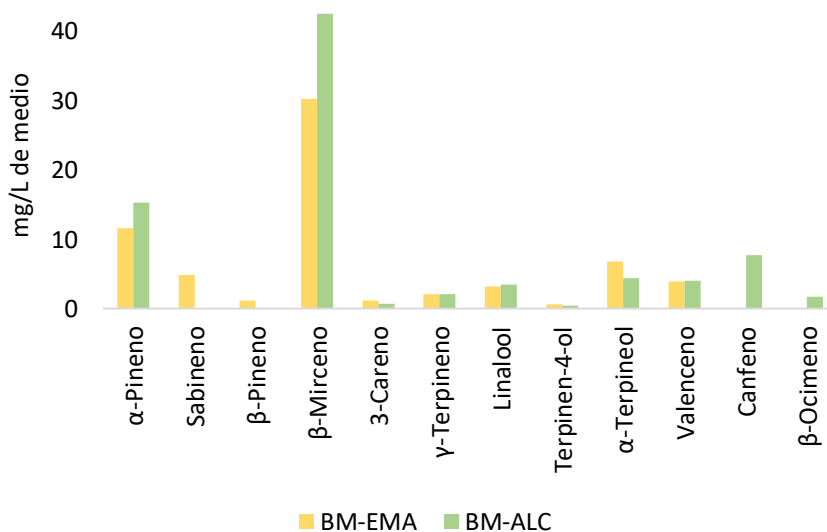


Figura 4.39. Compuestos identificados en las muestras control (medio + sustrato), en el medio de cultivo elaborado con extracto de malta (BM-EMA) y el medio elaborado con los residuos de alcachofa (BS-ALC) expresados en mg/L de medio. Como sustrato, se empleó limoneno contenido en el aceite extraído de los residuos de mandarina.

Los compuestos identificados en las muestras control, no mostraron compuestos que sugiriesen la degradación o transformación del limoneno o de los demás compuestos en el medio de cultivo. A diferencia de lo que se había observado en los ensayos de biotransformación, en los que se empleó limoneno comercial como sustrato. Este efecto se vio reflejado en los dos medios de cultivo evaluados, ya que todos los compuestos identificados, estaban presentes en el aceite caracterizado. Probablemente esto pudo

deberse a que en este caso la cantidad de sustrato adicionado fue mucho menor y por otro lado a que la presencia de otros compuestos propios del aceite, tales como algunos ácidos grasos, ésteres de los mismos, limonoides etc., no permitiesen la transformación del limoneno o de los otros terpenos vulnerables a ser transformados por las condiciones del proceso. En la **tabla 4.26**, se encuentran indicados los principales compuestos identificados junto con el limoneno en el aceite esencial, empleado como sustrato.

Adicionalmente se evidenció una posible retención en los medios de cultivo a cierto grupo de compuestos al momento de la extracción. Tal es el caso de sabineno y β -pineno aparentemente retenidos en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa y de canfeno y β -ocimeno por el medio de cultivo convencional.

En cuanto a los demás compuestos identificados tanto en un medio de cultivo como en el otro, las cantidades fueron similares y por ende la extracción de los mismos. Indicando que para este grupo de compuestos el medio no tiene ningún efecto de retención que impida que sean identificados.

Con todo lo anterior se procedió a realizar el análisis del potencial de biotransformación de las cepas *A. niger*, *A. flavus* y *G. citri-aurantii*. En el **Anexo VI, tabla A6.8**, se encuentran todos los compuestos identificados en cada una de las muestras, se incluyen las muestras control de sustrato y medio, con sus respectivos tiempos de retención e índices que permitieron comprobar su identidad y así mismo la concentración expresada en mg/L de medio.

Aspergillus niger:

Los resultados obtenidos para esta cepa, se encuentran recogidos en la **figura 4.40**. Los perfiles obtenidos para los extractos resultantes del proceso de biotransformación en cada uno de los medios, resulto ser distinta tal y como se evidenció en la evaluación de la biotransformación con el sustrato limoneno estándar.

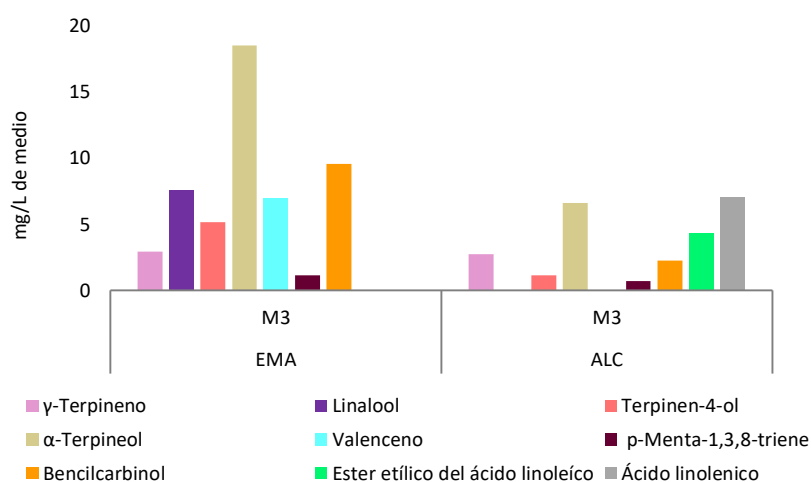


Figura 4.40. Cantidades absolutas (en mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, tras el proceso de biotransformación del limoneno contenido en el aceite esencial extraído de los residuos de mandarina realizado en reactores de 50 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *A. niger* (M3) en medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) o en medio de residuos de alcachofa (ALC).

Al observar detalladamente los resultados, se pudo evidenciar que el comportamiento de este microorganismo frente al sustrato empleado fue distinto al observado cuando se empleó limoneno comercial bajo las mismas condiciones (**fig. 4.28**).

A pesar de esto, cabe hacer énfasis inicialmente en aquellos compuestos relacionados directamente con la biotransformación del limoneno, que coincidieron con los resultados obtenidos en el proceso en el cual se empleó limoneno estándar como sustrato. Dentro de estos se destacan γ -terpineno (2,89 mg/L) y α -terpineol (18,49 mg/L) en el medio de cultivo convencional y terpinen-4-ol (1,14 mg/L) en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa, no obstante, en cantidades inferiores a las obtenidas con el otro sustrato.

Sin embargo, se observó una situación bastante interesante, ya que, por un lado, se identificaron algunos compuestos nuevos para esta cepa en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa, que no se habían identificado en los diferentes ensayos de biotransformación del limoneno llevados a cabo anteriormente. Este es el caso del γ -terpineno (2,72 mg/L) y

α -terpineol (6,59 mg/L), estos metabolitos están reportados dentro de los productos de la biotransformación del limoneno en distintas especies de microorganismos incluida *A. flavus* (Kang 2014; Vespermann 2017, figura 1.10). Una situación similar se presentó al analizar las muestras provenientes del medio de cultivo convencional, ya que compuestos como terpinen-4-ol (5,16 mg/L) y *p*-menta-1,3,8 trieno (1,13 mg/L) se identificaron sorpresivamente en este medio y no se habían identificado en los ensayos anteriores. Especialmente este último metabolito, cuya identificación fue totalmente nueva y puede ser el resultado de la isomerización del sustrato limoneno por este microorganismo.

Otro de los compuestos que resultó bastante llamativo fue el linalool, identificado en las muestras del medio de cultivo convencional, con una concentración en el medio de 7,51 mg/L. Cabe recordar que, pese a que este compuesto fue descrito como metabolito resultante del proceso de biotransformación en los ensayos anteriores, no se había identificado dentro de los productos de esta cepa.

Dentro de los compuestos identificados, que no se relacionaron con la biotransformación directa del limoneno ni de los demás compuestos presentes en el sustrato, se encontró, el compuesto bencilcarbinol (2,22 mg/L) en las muestras que procedían del medio de cultivo elaborado con residuos de alcachofa, tal y como se había observado en los ensayos en los que se había empleado limoneno comercial como sustrato. Sin embargo, resultó interesante identificarlo adicionalmente en las muestras provenientes del otro medio de cultivo, con una concentración de 9,54 mg/L, de tal manera que se deduce que no solo el tipo de medio sino la naturaleza, origen o tipo de sustrato tendrían un efecto sobre los productos obtenidos como metabolitos de la biotransformación.

En cuanto a la identificación del compuesto valenceno en las muestras en las que se empleó el medio de cultivo convencional, solo restaría decir que no podía provenir de la biotransformación del sustrato dada su estructura y naturaleza, y su presencia se puede relacionar con la isomerización del compuesto eremofileno extraído de los residuos y presente en el aceite empleado como sustrato. De hecho, algunos estudios han demostrado la producción de valenceno por diferentes tipos de microorganismos tal y como se describió en el análisis correspondiente a la biotransformación del limoneno estándar por la cepa *A. nidulans*.

Compuestos como éster etílico del ácido linoleico y el ácido linolénico, también se identificaron, tal y como se había observado en el ensayo de biotransformación del sustrato estándar. Sin embargo, en este caso, las concentraciones obtenidas de estos compuestos fueron mayores 4,26 y 6,98 mg/L respectivamente.

Aspergillus flavus:

Los resultados obtenidos para esta cepa en cuanto a los perfiles de los principales compuestos, se muestran en la **figura 4.41**.

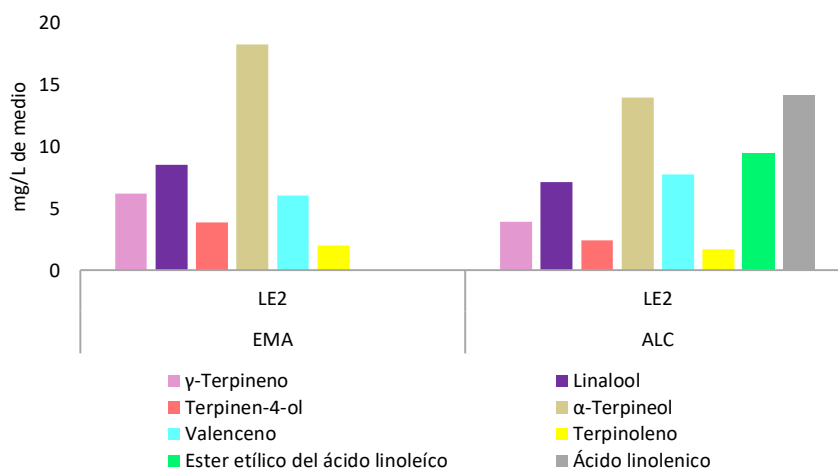


Figura 4.41. Cantidades absolutas (en mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, tras el proceso de biotransformación del limoneno contenido en el aceite esencial extraído de los residuos de mandarina realizado en reactores de 50 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *A. flavus* (LE2) en medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) o en medio de residuos de alcachofa (ALC).

Esta cepa presentó un comportamiento bastante similar a lo obtenido en el proceso de biotransformación del limoneno estándar tanto en el medio convencional, como en el medio elaborado con los residuos de alcachofa.

En cuanto a los compuestos que se relacionaron directamente con la biotransformación del limoneno en ambos medios de cultivo (EMA y ALC) se identificaron: γ -terpineno (6,22 y 3,90 mg/L), terpinen-4-ol (3,87 y 2,40 mg/L), α -terpineol (18,24 y 13,95 mg/L) y terpinoleno (2,03 y 1,73 mg/L). No obstante, en el caso del γ -terpineno y α -terpineol se obtuvo una concentración mucho mayor que la obtenida en los ensayos anteriores.

Otro de los compuestos, relacionados con la biotransformación del limoneno que se identificó fue el linalool en los dos medios de cultivo (8,54 mg/L EMA y 7,14 mg/L ALC). Cabe recordar que este compuesto se había identificado únicamente en las muestras del medio de cultivo convencional en los ensayos de biotransformación de limoneno comercial para esta misma cepa.

En lo que respecta a los compuestos que no presentaron una relación directa con la biotransformación del limoneno ni de los otros compuestos presentes en el sustrato, se identificó el valenceno. Tanto en el medio de cultivo convencional, como en el medio de cultivo elaborado con los residuos (6,07 y 7,78 mg/L respectivamente). Lo que resulta interesante, ya que solo se había identificado en los ensayos de biotransformación del limoneno comercial, en ambos medios de cultivo para la cepa *A. nidulans* (**fig. 4.31**). Este compuesto podría ser el resultado de la acción del microorganismo por las condiciones propias del medio y del proceso o por la isomerización del Eremofileno presente en un 0,27% en el aceite esencial extraído de los residuos (**tabla 4.26**). Así mismo se identificaron los compuestos éster etílico del ácido linoleico y el ácido linolénico en las muestras obtenidas del medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa y en concentraciones mayores respecto a las obtenidas en los ensayos de biotransformación del limoneno estándar (9,52 y 14,19 mg/L respectivamente).

Con todo lo anterior resulta importante resaltar que esta cepa presenta un fuerte potencial de biotransformación en los dos medios de cultivo independientemente del sustrato empleado.

Geotrichum citri-aurantii:

En la **figura 4.42**, se indican los perfiles de los principales compuestos obtenidos tras el proceso de biotransformación del limoneno contenido en el aceite de residuos de mandarina.

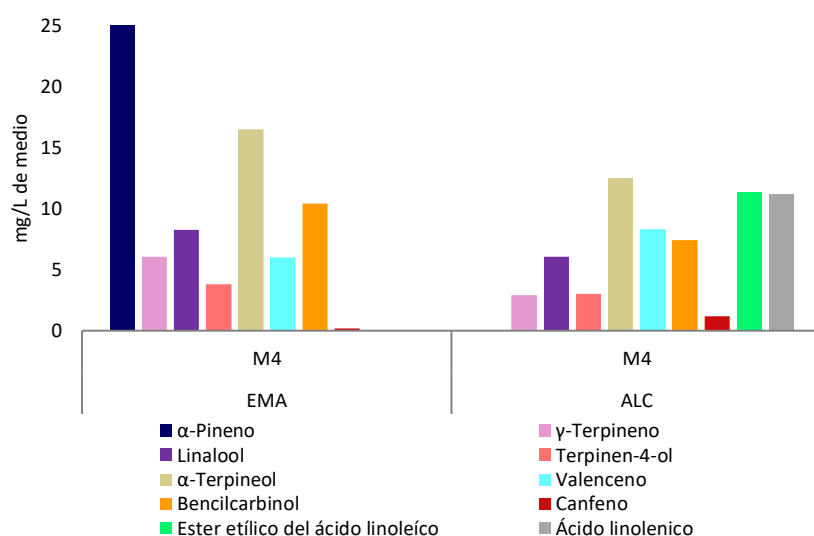


Figura 4.42. Cantidades absolutas (en mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, tras el proceso de biotransformación del limoneno contenido en el aceite esencial extraído de los residuos de mandarina realizado en reactores de 50 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *G. citri-aurantii* (M4) en medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) o en medio de residuos de alcachofa (ALC).

Dentro de los compuestos relacionados directamente con la biotransformación del limoneno, se identificaron en los dos medios de cultivo empleados (EMA y ALC) γ -terpineno (6,06 y 2,90 mg/L) y terpinen-4-ol (3,82 y 3,03 mg/L). Tal y como se evidenció en los ensayos en los que se empleó esta cepa y como sustrato el limoneno estándar (**Fig. 4.30**). Las concentraciones obtenidas en los dos casos fueron similares. Otro de los compuestos identificados dentro de este grupo, fue el α -terpineol, en este caso en los dos medios de cultivo empleados (16,51 mg/L EMA y 12,50 mg/L ALC) con una concentración mayor que en los ensayos llevados a cabo con el limoneno comercial (3,53 mg/L). Cabe recordar que este compuesto en estos ensayos, se había identificado únicamente en las muestras cuyo medio de cultivo fue elaborado con extracto de malta.

Se destaca así mismo la identificación de linalool en una concentración de 8,27 mg/L, en las muestras del medio de cultivo convencional, hecho que resulta interesante ya que no se había identificado en los ensayos de biotransformación del limoneno estándar.

Con todo lo anterior, el potencial para producir estos metabolitos a partir del limoneno para esta cepa queda confirmado.

En cuanto al compuesto valenceno tal y como se explicó para la cepa analizada anteriormente, podría ser el resultado de la isomerización del eremofileno, presente en el aceite o por la acción del microorganismo. De modo que, su identificación, además de ser interesante, aporta información para esta cepa que no presenta mucha información a nivel bibliográfico tal y como se detalló en el análisis de la biotransformación del limoneno comercial.

Finalmente se identificaron los compuestos éster etílico del ácido linoleico y el ácido linolénico en coherencia con los ensayos de biotransformación del limoneno comercial, cuyas concentraciones fueron de 11,31 y 11, 12 mg/L respectivamente.

Para cerrar el análisis de la biotransformación del sustrato del limoneno contenido en el aceite extraído de los residuos, también se evaluó la recuperación del exceso de limoneno que no se biotransformó en las muestras con presencia de microorganismo y en las muestras control. Los resultados obtenidos se indican en la **tabla 4.40**.

Tabla 4.40. Cantidad de limoneno estándar (en mg/L) recuperada del medio de cultivo en cada una de las muestras provenientes del proceso de biotransformación a escala pre-piloto en reactores de 250 mL de capacidad, por parte de las cepas *A. niger*, *A. flavus* y *G. citri-aurantii*, tanto en el medio de cultivo convencional (EMA) como en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa (ALC) y en las respectivas muestras control, con sus porcentajes de recuperación y limoneno residual.

Medio	Muestra	mg/L	% de limoneno recuperado	% de limoneno residual ¹
EMA	BS-EMA	83,84±0,02	46,58	-
	<i>A. niger</i>	24,64±2,03	13,69	86,31
	<i>A. flavus</i>	57,04±2,07	31,69	68,31
	<i>G. citri-aurantii</i>	93,25±1,05	51,80	48,20
ALC	BS-ALC	172,07±0,05	95,59	-
	<i>A. niger</i>	84,64±3,08	47,02	52,98
	<i>A. flavus</i>	85,42±0,24	47,45	52,55
	<i>G. citri-aurantii</i>	37,57±1,03	20,87	79,13

¹Este porcentaje corresponde al total del limoneno que pudo ser biotransformado, degradado y/o retenido por el medio de cultivo. Por lo tanto, no corresponde necesariamente al limoneno total biotransformado por los microorganismos.

El porcentaje de recuperación del sustrato en el medio de cultivo convencional fue del 46.58 % frente a un 95.59% en el medio de cultivo elaborado con residuos de alcachofa. Teniendo en cuenta que la cantidad total de limoneno adicionada fue de 180 mg/L y que lo recuperado en el medio de cultivo convencional fue 83,84 mg/L y 172,07 mg/L en el medio elaborado con los residuos, se pudo apreciar que probablemente el medio de cultivo elaborado con extracto de malta retiene o degrada el sustrato en compuestos que no son identificados con las técnicas empleadas. Tal y como se había venido observando en los ensayos de biotransformación anteriores. Ahora bien, está claro que esta retención o degradación se ve disminuida con la presencia de microorganismos.

Al observar los valores de limoneno residual se evidencia una mayor actividad por parte de los microorganismos del género *Aspergillus* en el medio de cultivo convencional (68,31% para *A. flavus* y 86.31% para *A. niger*) frente a la presentada por los mismos microorganismos cultivados en el medio de cultivo elaborado con residuos de alcachofa, (52.55% para *A. flavus* y 52.98% para *A. niger*) y contrario a lo que se observó en el microorganismo

G. citri-aurantii, con una mayor actividad en el medio de cultivo elaborado con residuos de alcachofa (79.13%) que en el medio de cultivo convencional (48.20%). Pues, pese a que este valor no representa el total de limoneno biotransformado por los microorganismos si presenta una relación con la actividad de cada cepa, de acuerdo con los perfiles identificados. Siendo mayor este valor, en aquellos casos en los que se evidenció un mayor número de compuestos relacionados directamente con la biotransformación del limoneno o una mayor concentración de algunos de estos.

Finalmente se pudo observar que el aceite esencial de mandarina extraído de los residuos, puede ser una alternativa de sustrato en los procesos de biotransformación. La elección del medio y del microorganismo dependerá del perfil, de los rendimientos o de las cantidades de metabolitos que se deseen obtener. También en este caso las concentraciones de los principales metabolitos superaron los umbrales olfativos mínimos de detección y por tanto interesante para la industria de aromas y fragancias.

4.4.2.3. Biotransformación del β -pineno estándar

Tras realizar la biotransformación del limoneno (comercial o estándar y el contenido en el aceite extraído de los residuos de mandarina), se decidió evaluar β -pineno comercial o estándar (fig. 4.43) bajo condiciones optimizadas.

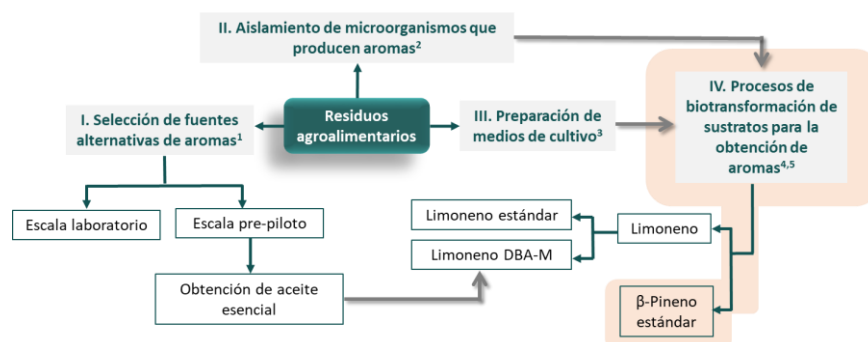


Figura 4.43. Esquema general del proyecto de investigación. Se indican los cuatro ejes que relacionan el uso directo o indirecto de residuos y se incluyen las citas de los apartados correspondientes a los métodos aplicados en cada etapa. En el esquema se resalta la parte que corresponde a los resultados y discusión de los procesos de biotransformación del β -pineno estándar, para la obtención de aromas a escala laboratorio. ¹3.2.2 **Figura 3.1**; ² 3.2.3; ³ 3.2.4; ⁴ 3.2.5.1; ⁵ 3.2.5.2 **Figura 3.9**.

Para la evaluación del potencial de biotransformación de los microorganismos de este sustrato, se realizaron dos ensayos, uno a escala laboratorio y otro en escala pre-piloto. En ambos se empleó la cepa *A. niger* (M3), dados los resultados obtenidos en los ensayos de optimización (**tabla 4.35**).

El primero de ellos consistió en un seguimiento en el tiempo como se realizó con el limoneno comercial, tal y como se describe en el numeral 3.2.5.2.2.1 del apartado de métodos. En el segundo ensayo, se realizó un escalado pre-piloto siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 3.2.5.2.2.2.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos en cada ensayo.

4.4.2.2.1 Seguimiento del proceso de biotransformación en el tiempo

Con el fin de conocer el momento en el cual daba comienzo el proceso de biotransformación del β -pineno y a su vez identificar el orden de aparición de los distintos grupos de metabolitos (relacionados directamente con la biotransformación del β -pineno, relacionados con la biotransformación de los otros compuestos presentes en el sustrato y aquellos producidos sin ninguna relación directa con el β -pineno ni los otros compuestos). Se realizó el seguimiento del proceso de biotransformación durante ocho horas.

Para esto, fue necesario conocer previamente los compuestos que se encontraban presentes junto con el β -pineno en el sustrato. De forma que, al igual que se realizó con el limoneno estándar en este caso se analizó el perfil de una muestra del β -pineno estándar con una concentración de 500 ppm. Los resultados obtenidos se indican en la **tabla 4.41**.

Tabla 4.41. Porcentaje relativo de los compuestos identificados el patrón de 500 ppm de β -pineno estándar comercial empleados en los procesos de biotransformación.

Compuesto	β -pineno
α -Pineno	0,31
Canfeno	0,05
β -Pineno	97,29
Mirceno	0,37
α -Felandreno	0,21
Limoneno	1,02
Pinocarveol	0,18
Pinocarvona	0,04
Mirtenol	0,28
β -Selineno	0,25

De acuerdo con el procedimiento, los primeros extractos en analizar, fueron los correspondientes al tiempo cero (justamente tras la adición del sustrato), para todas las muestras. En este punto los resultados obtenidos fueron los esperados. Ya que tanto en las muestras control, como en las muestras con presencia de microorganismos, se identificaron además de β -pineno, los demás compuestos que se habían encontrado junto con este (tabla 4.41).

Dentro de los compuestos identificados en las muestras correspondientes al tiempo cero, no se identificaron compuestos ajenos a los ya presentes en el patrón del sustrato. Estos fueron α -pineno, canfeno, mirceno, α -felandreno, limoneno y pinocarvona que fueron apareciendo de forma constante y en concentraciones similares durante el tiempo de seguimiento restante.

En cuanto al β -pineno cuantificado en las muestras control, se observó un descenso en la cantidad de este compuesto en el medio. Esto se vio reflejado en el aumento del porcentaje de β -pineno residual (transformado, degradado y/o retenido en el medio de cultivo). En la **figura 4.44**, se indica el porcentaje de al β -pineno residual en las muestras control de los dos medios de cultivo.

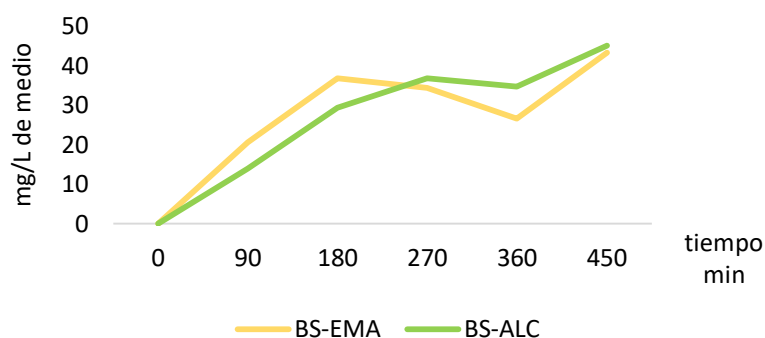
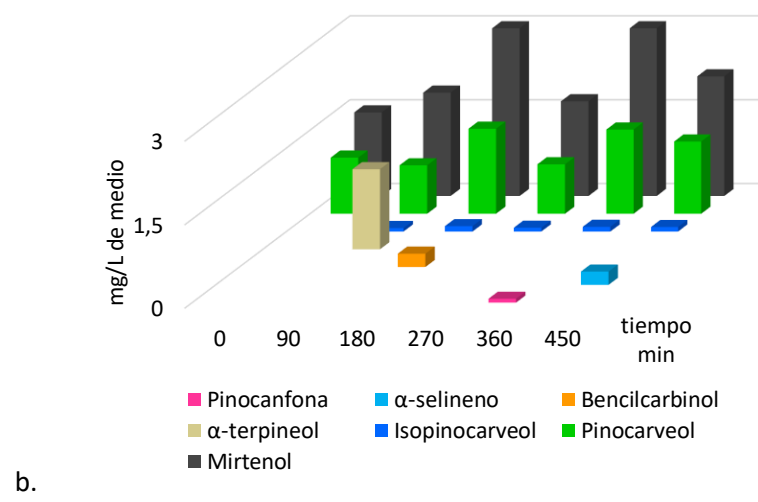
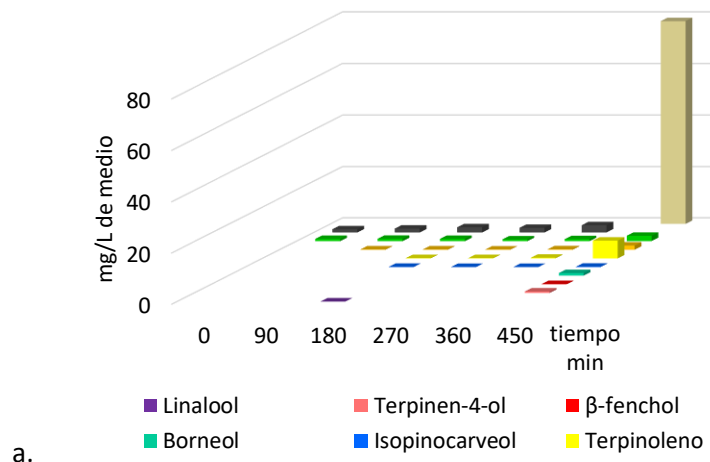


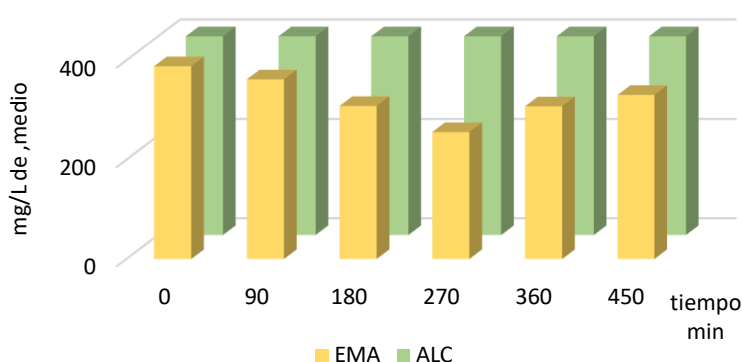
Figura 4.44. Porcentaje de β -pineno residual en las muestras control del medio de cultivo y el sustrato en ausencia de microorganismo, para el medio de cultivo convencional (BS-EMA) y el medio de cultivo elaborado con los residuos (BS-ALC), durante las ocho horas de seguimiento.

Considerando estos resultados se procedió al análisis de los resultados obtenidos para la cepa evaluada. De forma que, solo se tuvieron en cuenta aquellos compuestos que presentaron una relación directa con la biotransformación tanto del sustrato como de los demás compuestos presentes con este (**tabla 4.41**) y de aquellos que no provenían de la degradación propia del β -pineno en el medio y no presentaron ninguna relación directa de biotransformación con el β -pineno ni los demás compuestos conocidos.

Aspergillus niger:

A continuación, en la **figura 4.45**, se muestran las concentraciones en mg/L de los compuestos identificados en el seguimiento del proceso de biotransformación por la cepa *A. niger*, tanto en el medio de cultivo convencional como en el medio elaborado con los residuos. Se incluye además la concentración de β -pineno obtenida para cada muestra. En el **Anexo VI, tablas A6.9 y A6.10** se encuentran todos los compuestos identificados en cada una de las muestras, se incluyen las muestras control de sustrato y medio, con sus respectivos tiempos de retención e índices que permitieron comprobar su identidad y así mismo la concentración expresada en mg/L de medio.





C.

Figura 4.45. Concentración (mg/L) del β -pineno y de los compuestos identificados tras el seguimiento del proceso de biotransformación del limoneno estándar por el microorganismo *A. niger*. **a.** Biotransformación en el medio de cultivo convencional. **b.** Biotransformación en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa. **c.** concentración del β -pineno en el medio elaborado con extracto de malta (EMA) y con residuos de alcachofa (ALC)

Los perfiles obtenidos en cada caso fueron distintos, demostrando en este caso el efecto del medio de cultivo sobre la biotransformación del sustrato y de otros posibles compuestos presentes con él.

Dentro de los compuestos relacionados directamente con la biotransformación del β -pineno se identificaron pinocarveol y mirtenol tanto en el medio de cultivo convencional como en el medio elaborado con los residuos de alcachofa. Pese a ser compuestos que no representan un mayor interés en la industria de aromas y fragancias, su presencia permitió demostrar la capacidad oxidativa de esta cepa sobre el β -pineno. Este hecho se vio claramente reflejado en el aumento de las concentraciones de estos metabolitos en el transcurso del tiempo, llegando a niveles superiores a los obtenidos en las muestras control en donde ya se habían identificado, siendo por un lado de 2,08 mg/L en el caso del pinocarveol y de 2,82 mg/L en el caso del mirtenol en el medio de cultivo convencional y de 1,52 mg/L y 3,11 mg/L respectivamente, en el otro medio de cultivo. Estos resultados de hecho coincidieron con lo reportado por algunos autores, que indican que sustratos de esta naturaleza son fácilmente oxidados no solo por entrar en contacto con el aire sino por la acción propia de algunas bacterias o microorganismo

como algunas cepas de la especie *A. niger* (Van Dick 1998; Bicas 2001; Savithiry 1998; Vespermann 2017).

Por otro lado, pese a los efectos oxidativos sobre el sustrato, también se pudo observar el poder de biotransformación del β -pineno en α -terpineol, tanto en el medio de cultivo convencional como en el medio elaborado con los residuos. Siendo mayor en el primero, pues la concentración máxima obtenida fue 78,78 mg/L (450 minutos) frente a 1,44 mg/L (90 minutos) obtenida en el segundo. De modo que, las condiciones del proceso y especialmente del medio en este caso (EMA) demostraron favorecer la obtención de este compuesto. Incluso se han encontrado reportes de algunos autores, que relacionan el potencial de algunas cepas de esta especie para α -terpineol a partir del β -pineno (Toniazzo 2005; Rozenbaum 2006; Parshikov 2014).

En cuanto a los demás compuestos, cabe mencionar que algunos de ellos, como el terpinoleno identificado en las muestras del medio de cultivo convencional, probablemente fue el resultado de la biotransformación de limoneno o α -pineno presente en el sustrato. Lo mismo podría decirse del terpinen-4-ol identificado también en este medio de cultivo. Sin embargo, los compuestos fenchol y borneol identificados en las muestras del medio de cultivo convencional e isopinocarveol, identificado en los dos medios de cultivo, podrían relacionarse con la biotransformación del α -pineno. Esto se pudo evidenciar al no haber sido identificados en las muestras control y al realizar una comparación con la bibliografía, en donde se resalta la acción de algunas cepas de microorganismos de esta especie con potencial para su producción (Schrader 2007; Linares 2009; Liu 2008; Lee 2015).

Con respecto a los compuestos bencilcarbinol identificado en los dos medios de cultivo (a partir de los 90 y 180 minutos respectivamente) y α -selineno identificado en el medio elaborado con los residuos de alcachofa (únicamente pasados los 450 minutos), tal y como se observó para esta misma especie en los otros ensayos de biotransformación, podrían ser el resultado de la acción del microorganismo sobre fuentes distintas al β -pineno o de los demás compuestos presentes en el sustrato.

Para finalizar se analizó el comportamiento del β -pineno en las muestras, para ello se obtuvo la concentración de este compuesto en cada una de ellas, para cada medio de cultivo empleado (**fig.4.45c**). Con estos resultados se pudo relacionar que la mayor actividad del microorganismo en el medio de

cultivo convencional estuvo dada entre los minutos 180 y 270 periodo en el cual fueron identificados un mayor número de metabolitos relacionados directamente con la biotransformación del β -pineno, pues fue el periodo de tiempo en el cual, las concentraciones fueron más bajas (308,28 y 255,76 mg/L respectivamente). Por otro lado, sobre los 450 minutos, tiempo en el cual se identificó una concentración importante de α -terpineol, la concentración del β -pineno fue de 330,46 mg/L, un valor también menor, teniendo en cuenta la concentración obtenida al minuto cero. Demostrando que si bien es cierto no todo el β -pineno se estaría biotransformado, si una parte de este.

En cuanto a los resultados obtenidos en el medio de los residuos de alcachofa, tal y como se evidencio en la **figura 4.45b**, la actividad fue menor, esto se reflejó no solo en menor número de compuestos identificados a una menor concentración en comparación con el otro medio, sino también en valores mayores de concentración del β -pineno. Por lo que, probablemente en este medio no se estaría favoreciendo el potencial de esta cepa para biotransformar el sustrato y por lo tanto no sería una buena alternativa de medio de cultivo para la obtención de un producto que se quisiese aplicar en el campo de los aromas y las fragancias.

4.4.2.2.2 Escalado pre-piloto

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a escala laboratorio en el seguimiento del proceso de biotransformación en el tiempo discutidos anteriormente y dada la similitud en las actividades de los microorganismos en escala laboratorio como en escala pre-piloto observadas en los ensayos de biotransformación del limoneno comercial. Se decidió escalar el proceso de biotransformación del β -pineno empleando reactores de 250 mL de capacidad.

En la **figura 4.46** se describen las cantidades absolutas de los principales compuestos identificados en el proceso. En esta figura se incluyen los compuestos que resultaron relacionados con la biotransformación directa del β -pineno o de los demás compuestos presentes en el sustrato y aquellos que, pese a no estar relacionados con dichas biotransformaciones podían ser de interés en el estudio.

En el **Anexo VI, tabla A6.11** se indican todos los compuestos identificados, incluyendo las muestras control de cada medio, con sus respectivos tiempos e índices de retención teóricos y experimentales, que permitieron su confirmación.

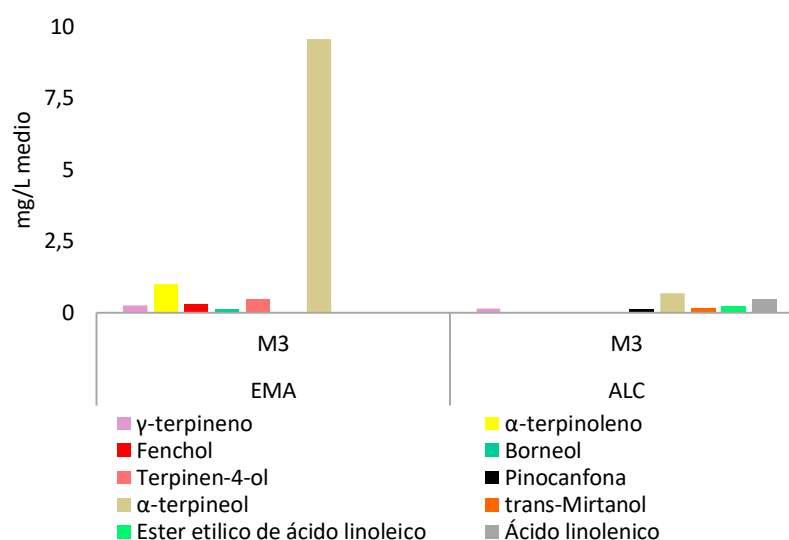


Figura 4.46. Cantidades absolutas (mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de biotransformación de β -pineno comercial en reactores de 250 mL de capacidad (sistema cerrado), por la cepa *A. niger* (M3) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y el medio de residuos de alcachofa (ALC).

Es importante resaltar que la mayor actividad de biotransformación, tal y como se evidencio en el ensayo del seguimiento del proceso en el tiempo, se observó en el medio de cultivo convencional, dejando claro que la otra alternativa de medio no favorece este proceso para esta cepa. Sin embargo, en cuanto al otro medio de cultivo se obtuvieron resultados de bastante interés, ya que dentro de los principales compuestos y con una concentración de 9,57 mg/l se identificó el α -terpineol que tal y como se había mencionado anteriormente es uno de los principales metabolitos reportados en la biotransformación de este sustrato y en particular para esta especie. Una situación similar se observó con los compuestos fenchol y borneol, identificados únicamente en el medio de cultivo convencional y que se relacionan con la biotransformación directa del β -pineno (**fig.1.11**).

No obstante, se identificó como novedad el compuesto *trans*-mirtanol en las muestras del medio de cultivo elaborado con residuos de alcachofa en una concentración de 0,16 mg/L. Se menciona este hecho ya que es un compuesto que no había sido identificado anteriormente y, pese a que no presenta un mayor interés en el objetivo del estudio, podría ser interesante

dejar el precedente de que esta cepa podría convertir el sustrato en este metabolito que ya ha sido previamente reportado por algunos autores, para este género y otros microorganismos (Savithiry N, *et al.* 1998).

Por otro lado, se identificaron un grupo de compuestos dentro de los cuales presentan interés de acuerdo con el objetivo del estudio: α -terpinoleno, linalool y terpinen-4-ol en las muestras del medio de cultivo convencional y γ -terpineno y alcohol perilico en los dos medios evaluados, este último en concentraciones muy bajas ($\leq 0,20$ mg/L).

Finalmente se identificó éster etílico del ácido linoleico y ácido linolénico en las muestras del medio de cultivo elaborado con los residuos, tal y como se ha observado en el transcurso del estudio.

A pesar de todas estas observaciones y resultados interesantes, las cantidades de sustrato en exceso recuperados tras la finalización del proceso de biotransformación, así como la cuantificación respectiva de los metabolitos, no fue del todo exitosa dado el inconveniente de la extracción con los medios físicos con los que se contaba. En la **tabla 4.42** se indica la concentración del sustrato recuperado y el porcentaje de β -pineno residual.

Tabla 4.42. Cantidad de β -pineno estándar (en mg/L) recuperada del medio de cultivo en cada una de las muestras provenientes del proceso de biotransformación a escala pre-piloto en reactores de 250 mL de capacidad, por parte de la cepa *A. niger* (M3), tanto en el medio de cultivo convencional (EMA) como en el medio de cultivo elaborado con los residuos de alcachofa (ALC) y en las respectivas muestras control, con sus porcentajes de recuperación y β -pineno residual en cada caso.

Medio	Muestra	mg/L	% de β -pineno recuperado	% de β -pineno residual ¹
EMA	BS-EMA	504,31 \pm 48,42	50.43	-
	<i>A. niger</i>	363,35 \pm 10,83	36.33	63.66
ALC	BS-ALC	447,94 \pm 57,59	44.79	-
	<i>A. niger</i>	533,87 \pm 9,41	53.38	46.61

¹Este porcentaje corresponde al total del limoneno que pudo ser biotransformado, degradado y/o retenido por el medio de cultivo. Por lo tanto, no corresponde necesariamente al limoneno total biotransformado por los microorganismos.

De acuerdo con estos valores, teóricamente y teniendo en cuenta que no representan toda la cantidad que hubiese podido ser extraída, la mayor

actividad se obtuvo en el medio de cultivo convencional, ya que fue el medio en donde se identificaron un mayor número de compuestos relacionados directamente con la biotransformación del β -pineno y un mayor porcentaje de β -pineno residual (63,66%), que pese a no ser un valor que represente la totalidad del β -pineno biotransformado si es un indicio de la acción del microorganismo.



¿Qué obtuvimos en este eje?

1. Se optimizaron las condiciones del proceso de biotransformación de los sustratos, resultando ser el procedimiento más adecuado el llevado a cabo en un sistema cerrado, controlando la cantidad de micelio inoculado en el medio líquido (esporas o discos) y la adición del sustrato en una disolución al 20% de etanol.

2. Se realizó la biotransformación del limoneno estándar, obteniendo en todos los casos compuestos con potencial para la industria de aromas y fragancias. Los perfiles de los compuestos obtenidos fueron distintos dependiendo del tipo de medio usado. De esta forma, los residuos de alcachofa podrían ser un medio de cultivo muy interesante para obtener ciertos perfiles terpénicos. En la **figura 4.47** se indica un gráfico comparativo de las concentraciones obtenidas de los principales compuestos obtenidos tras la biotransformación del sustrato con el porcentaje del mismo sin reaccionar entre cepas.

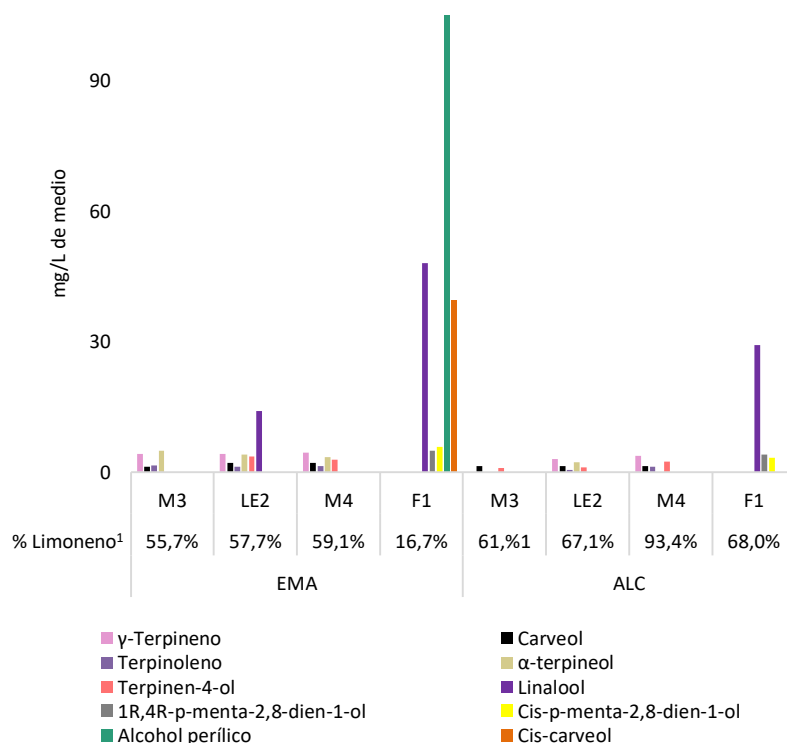


Figura 4.47. Cantidades absolutas (en mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, tras el proceso de biotransformación del limoneno estándar en reactores de 50 mL de capacidad (sistema cerrado), por las cepas: *A. niger* (M3), *A. flavus* (LE2), *G. citri-aurantii* (M4), *A. nidulans* (F1) en medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) o en medio de residuos de alcachofa (ALC). ¹Porcentaje de limoneno recuperado sin reaccionar.

De las cepas evaluadas se destaca la actividad de *A. nidulans* en los dos medios de cultivo empleados, siendo mayor en el medio de cultivo convencional. Lo cual resulta de interés, teniendo en cuenta que la información referente a esta cepa es escasa. De modo que estos resultados aportan conocimiento valioso a su actividad y posible aplicación en procesos de biotransformación para obtener compuestos como linalool, alcohol perillol o perilla alcohol y *cis*-carveol.

3. El aceite previamente extraído de residuos de mandarinas, rico en limoneno (90,09%), se utilizó como sustrato en el proceso de biotransformación dando como resultado diferencias en los perfiles de compuestos terpénicos obtenidos en función de los microorganismos utilizados y del medio de cultivo. Estos factores afectan el proceso de transformación del limoneno y de los otros compuestos presentes en el aceite favoreciendo la obtención de diferentes grupos de metabolitos y en distintas cantidades, revelando este sustrato como una buena alternativa para los procesos de biotransformación. Los resultados conseguidos fueron distintos parcialmente a los observados al emplear el limoneno estándar. Dentro de los principales metabolitos observados como producto de la biotransformación por parte de las cepas *A. niger*, *A. flavus* y *G. citri-aurantii* se obtuvo α -terpineol en los dos medios de cultivo evaluados. Demostrando que estas cepas tienen un potencial biotransformado del limoneno contenido en el aceite en este terpeno que representa gran interés en la industria de aromas y fragancias. Así mismo se resalta la capacidad de las tres cepas mencionadas en producir linalool en el medio de cultivo convencional y de la cepa *A. flavus* en el medio de cultivo elaborado con los residuos, en la **figura 4.48** se indica un gráfico comparativo de las concentraciones obtenidas de los principales compuestos obtenidos tras la biotransformación del sustrato con el porcentaje del mismo sin reaccionar entre cepas.

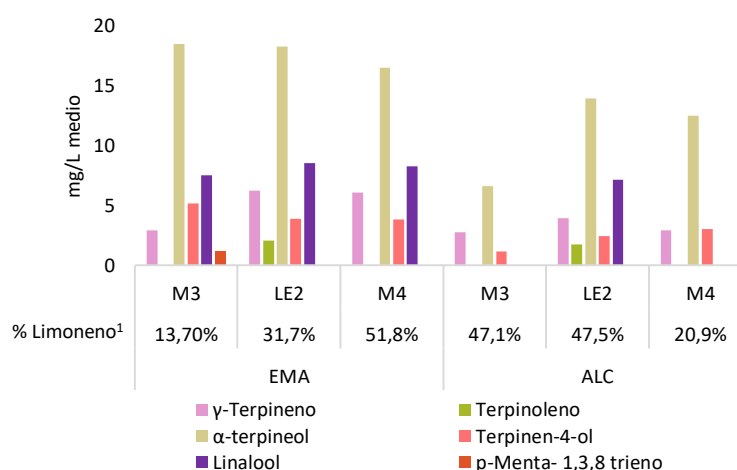


Figura 4.48. Cantidades absolutas (en mg/L) de los principales compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, tras el proceso de biotransformación del limoneno contenido en el aceite esencial de mandarina extraído de los residuos (sistema cerrado), por las cepas: *A. niger* (M3), *A. flavus* (LE2) y *G. citri-aurantii* (M4) en medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) o en medio de residuos de alcachofa (ALC). ¹Porcentaje de limoneno recuperado sin reaccionar.

4. Se realizó un seguimiento en el tiempo por un periodo corto de ocho horas del proceso de biotransformación del limoneno comercial usando los dos medios de cultivo y dos cepas distintas. Por un lado, la cepa *A. flavus* evidenció una mayor actividad en el medio de cultivo convencional, sin embargo, el periodo de tiempo seleccionado no fue suficiente para identificar los diferentes grupos de compuestos que ya se habían identificado en los procesos de biotransformación bajo condiciones optimizadas. Por el otro lado, usando la cepa *G. citri-aurantii* se lograron identificar todos los metabolitos identificados en los ensayos bajo condiciones optimizadas de modo que se evidenció el potencial de esta cepa para la producir distintos perfiles terpénicos, dependiendo del tipo de medio empleado.

5. Se siguió el proceso de biotransformación del β -pineno comercial en la cepa *A. niger* por un periodo de ocho horas en los dos tipos de medio de cultivo. La mayor actividad se registró en el medio de cultivo convencional, en donde esta cepa mostró tener potencial para biotransformar el sustrato, especialmente en α -terpineol, llegando a obtenerse una concentración de 78,80 mg/L. Una situación contraria a lo observado en el medio de cultivo de alcachofa, donde quedó confirmado que este tipo de medio tiene un efecto negativo sobre el potencial de biotransformación para este microorganismo.

6. De todas las biotransformaciones realizadas en el medio de alcachofa, se identificó ácido linolénico y el éster etílico del ácido linoleico en las biotransformaciones hechas con *A. niger*, *A. flavus* y *G. citri-aurantii*. Este hecho confirma que dichos compuestos provienen de los residuos de alcachofa y son liberados del medio en presencia de ciertos microorganismos.

7. Se escaló el proceso de biotransformación de los sustratos limoneno (reactores de 250 mL y 1L) y β -pineno (reactor de 250 mL) evaluando como medios el extracto de malta y el residuo de alcachofa. Los perfiles de terpenos de las muestras extraídas no variaron respecto a los ensayos a escala laboratorio.

4.5. Respuesta sensorial de los aromas obtenidos

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de este proyecto era la obtención de aromas a partir del empleo de los residuos en diferentes procesos, que pudiesen ser de interés en la industria de las fragancias, se decidió consultar los umbrales olfativos de detección de los principales compuestos de interés identificados (tanto en los ensayos de extracción, como en los ensayos de biotransformación a escala laboratorio y pre-piloto). De forma que, se les diese un mayor valor a los resultados obtenidos.

De modo que, e pudo determinar que las concentraciones obtenidas en la mayoría de los casos sobrepasaron el valor mínimo de detección. Así que, teniendo en cuenta la definición oficial registrada en la nota técnica de prevención 358, correspondiente a olores del ministerio de trabajo y asuntos sociales de España, se podría afirmar que el grupo de compuestos identificados, serían capaces de producir respuestas sensoriales en los receptores olfativos de una población dada.

Dentro de los compuestos identificados cabe resaltar aquellos que podrían ser de uso potencial en la industria de aromas y fragancias ya que podrían ser una alternativa novedosa en el momento de formular algún producto con un aroma o fragancia en específico. Estos terpenos son: geraniol, acetato de geranilo, linalool, alcohol perílico, bencilcarbinol, α -terpineol, terpinoleno y γ -terpineno.

En síntesis, y teniendo en cuenta todos los análisis realizados hasta el momento, se puede observar como los residuos agroalimentarios se lograron revalorizar en procesos que permitieron la obtención o extracción de aromas.

Así, los microorganismos empleados fueron aislados inicialmente de residuos agroalimentarios, de los cuales se extrajo el sustrato adicionado para ser biotransformado y adicionalmente como medio de cultivo se pudo emplear tanto en medio líquido como sólido uno de estos residuos, lo que sin duda daría lugar al cumplimiento del objetivo inicial.

5. Conclusiones

Según los resultados obtenidos se concluye que:

1. De los residuos evaluados, los que presentaron mayor potencial para ser revalorizados en procesos de obtención y/o extracción de aromas correspondieron a los residuos húmedos de mandarina tanto a escala laboratorio como a escala pre-piloto.
2. En cuanto a los procedimientos empleados en la extracción de compuestos aromáticos de residuos húmedos de mandarina, se obtuvo una mayor cantidad de compuestos cuando se empleó como disolvente una mezcla de hexano/dietil éter 9:1 junto con una combinación de pre-tratamientos físicos (trituración mecánica) y enzimáticos (celulasa y pectinasa) de los residuos a escala laboratorio, siendo el limoneno el compuesto de interés mayoritariamente extraído, con un rendimiento de 3,4%. Estas condiciones de extracción no se pudieron utilizar en un escalado pre-piloto debido a limitaciones físicas.
3. La aplicación de fluidos supercríticos, empleando CO₂ como disolvente, no demostró ser una buena alternativa para la extracción de aromas de los residuos de mandarina. No obstante, el porcentaje de aceite extraído resultó mayor que el reportado en la bibliografía.
4. El escalado pre-piloto del proceso de extracción del aceite esencial de mandarina a partir de los residuos húmedos triturados se realizó con un reactor de 2L de capacidad y el uso de una mezcla de hexano/dietil éter 9:1. Se logró obtener un aceite con un alto contenido de limoneno (90,09 %), en comparación con un aceite comercial utilizado como referencia (78.22%), adicionalmente se duplico el rendimiento de extracción (6,7 ‰) en comparación con el rendimiento obtenido a escala laboratorio (3,4‰).
5. De los microorganismos aislados de los residuos, aquellos que representaron un mayor potencial para la producción de aromas como: limoneno, α -pineno y β -pineno, resultaron ser *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus nidulans* y *Geotrichum citri-aurantii*. De este grupo cabe resaltar los dos últimos, ya que la información obtenida durante el estudio resulta ser novedosa, puesto que de estas cepas no se han reportado estudios que las relacionen en procesos de producción de aromas.
6. Los residuos de alcachofa secos, resultaron ser una buena alternativa para la preparación de medios de cultivo sólidos y líquidos, tanto

para el crecimiento de las cepas empleadas en este estudio, como en los procesos de biotransformación.

7. Las condiciones optimizadas en los procesos de biotransformación de los sustratos por las cepas seleccionadas, demostraron mejores resultados cuando se emplearon sistemas cerrados, un control de micelio inoculado y la adición de sustrato en una disolución al 20% de etanol, tanto a escala laboratorio, como en el escalado pre-piloto. Sin embargo, la extracción de los metabolitos de la biotransformación a escala pre-piloto dio lugar a un menor % extraído de compuestos comparado con el mismo proceso a escala laboratorio.
8. Los perfiles de aromas obtenidos tras la biotransformación de limoneno (a partir de limoneno estándar y el limoneno contenido en el aceite esencial obtenido a partir de los residuos) por las cepas empleadas (*A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans* y *G. citri-aurantii*) en los dos medios de cultivo (medio convencional y medio con base de residuo de alcachofa), fueron distintos. La naturaleza del sustrato demostró tener efecto sobre la actividad de los microorganismos, favoreciendo según el caso la producción de uno o varios compuestos de interés.
9. Del seguimiento del proceso de biotransformación en el tiempo (8 horas), se pudo comprobar el potencial de cada una de las cepas para biotransformar los sustratos empleados en el estudio, así como el orden de aparición de los distintos compuestos. No obstante, para la cepa *A. flavus*, el intervalo de tiempo empleado en el seguimiento no fue suficiente para identificar todos los metabolitos.
10. Se revalorizaron los residuos de mandarina, ya que fue posible su empleo como fuente de microorganismos capaces de biotransformar distintos sustratos, entre ellos el limoneno obtenido a partir de residuos de mandarina. Además, se han revalorizado residuos de alcachofa utilizándolos como medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos en el proceso de biotransformación, logrando llevar a cabo un proceso circular que integró de forma directa o indirecta los residuos en cada fase.

6. Referencias

- Abu-Reidah I., Arráez-Román D., Warad I., Fernandez A., Segura A. 2017. UHPLC/MS2-based approach for the comprehensive metabolite profiling of vean (*Vicia2:107* faba) by-products: A promising source of bioactive constituents. *Food Research International* 93, 87-96.
- Acevedo J., Carrasco R., Basterrenchea M. 2010. Aplicación integrada de diferentes metodologías para la predicción del índice de retención en cromatografía gaseosa. *Revista Cubana de Química* 22 (1), 9-16.
- Adams A., Demyttenaere J., De Kimpe. 2003. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum*— investigation of the culture conditions. *Food Chemistry* 80 (4), 525-534.
- Agocs A., Nagy V., Szabó Z., Márk L., Ohmacht R., Deli J. 2007. Comparative study on the carotenoid composition of the peel and pulp of different citrus species. *Innovate Food Science & Emerging Technologies* 8 (3), 390-394.
- Ahmad I., Pichtel J., Hayat S. 2008. *Plant-bacteria interactions: Strategies and techniques to promoe plant growth*, Jhon Wiley & Sons.
- Akacha B., Gargouri M. 2014. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 675-706.
- Akakabe Y., Kusunoki A., Tanaka R., and Kanetsune Y. 2010, A comparison of volatile components of Setomi with its parent cultivars. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 659–662.
- Albrecht K., Ettling S. 2014. Biotechnology strategies across the globe. *Rural 21 The International Journal for Rural Development* 48 (3), 10-13.
- Alonso J., Chan R., Batth T., Adams P., Keasling J., Petzold C., Lee T. 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. *Metabolic Engineering*, 19, 33–41.
- Amudan R., Kamat D., Kamat S. 2011. Enzyme-assisted extraction of essential oils from *Syzygium aromaticum*. *South Asian Journal of Experimental Biology* 1 (6), 248-254.
- Anklam E., Berg H., Mathiasson L., Sharman M., Ulberth F. 1998. Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review. *Food Additives and Contaminants*, 15(6), 729–750.
- Anon., s.f. Búsqueda de Datos de Especies por el Número de Registro CAS.

Arctander S. 1960. Perfume and Flavor Materials of Natural Origin. Published by the author.

Arnáiz E., Bernal J. 2011. Supercritical fluid extraction of lipids from broccoli leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113 (4) 479-486.

Azorín M., Urbán C., Cerón J., Tecles F., Allende A., Tomás F., Espín J. 2009. Effect of low inulin doses with different polymerization degree on lipid metabolism, mineral absorption, and intestinal microbiota in rats with fat supplement diet. *Food Chemistry* 113, 1058-1065.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Iadomar M., 2007. Biological effects of essential oils – A review. *Elsiever Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.

Barreca D., Gattuso G., Bellocco E., Calderaro A., Trombetta D., A. Smeriglio A., Laganà G., Daglia. M., Meneghini S., Nabavi S. 2017. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties *Biofactors* 43, 495-506.

Barros H., Ferreira T., Genovese M. 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134, 1892-1898.

Bauer K., Garbe D., Surburg H. 2001. Common fragrance and flavour materials: Preparation, properties and uses. Wiley-VCH, 293.

Bayón B., Rivero I., Gagneten A., Castro G. 2018. Biopolymers from Wastes to High-Value Products in Biomedicine. *Waste of Wealth*.

Becker L., Bergferld W., Belsito D., Hill R., Klaassen C., Marks J., Shank R., Slaga J., Snyder P., Andersen F. 2010. Final Report of the amended safety assessment of myristic acid and its salts and esters as used in cosmetics. *International Journal Of toxicology*, 29 162s-186s.

Behrendorff J., Vickers C., Chrysanthopoulos P., Nielsen L. 2013. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as a screening tool for recombinant monoterpene biosynthesis. *Microbial Cell Factories*, 12, 76.

Belin J., Bensoussan M., Serrano L. 1992. Microbial biosynthesis for the production of food flavours. *Trends Food Science Technology* 3, 11-14.

Benelli P., Riehl C., Smânia J., Smânia A., and Ferreira S. 2010, Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L, Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. *The Journal of Supercritical Fluids* 55, 132–141.

- Benthin B., Danz H., Hamburger M. 1999. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography* 837 (1-2), 211-219.
- Berestetskiya A., Poluektovaa E., Sabashuka Y., Pervushina A. 2019. Development of Chromatography Techniques for Analysis and Preparative Isolation of Phytotoxic Metabolites Produced by *Stagonospora cirsi*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 55 (6), 684–690.
- Berger R., Krings U., Zorn H. 2002. Biotechnological flavour generation. A.J. Taylor (ed.), *Food Flavour Technology*. Sheffield Academic Press, 60–104.
- Besbes S., Cheikhrouhou S., Blecker C., Deroanne C., Lognay G., Drira N. 2006. Voies de valorisation des sous produits de dates: valorisation de la pulpe. *Microbiologie Hygiène Alimentaire* 18, 3-7.
- Bhat M.K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355–383.
- Bicas J., Dionisio A., Pastore G. 2009. Bio-oxidation of terpenes: An approach for the flavour industry. *Chemical Reviews* 109 (9), 4518-4531.
- Bicas J., Dionisio A., Silva J., Barros C., Pastore G. 2010. Industrial fermentations: Food process, nutrient sources and production strategies, ed. J. Krause and O. Fleisher, Nova Publishers. 1st Edition, 9, 275-296.
- Bicas J., Fontanille P., Pastore G., Larroche C. 2008. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1991-2001.
- Bicas J., Molina G., Cavalcante F., Pastore G. 2016. Production of Aroma Compounds by With Biotechnology. Chapter 12. Cohelo M., Ribeiro B. *White Biotechnology for Sustainable Chemistry*. Green Chemistry Series, 310-332.
- Blanch G., Tabera J., Herraiz M., Reglero G. 1993. Preconcentration of volatile components of foods: optimization of the steam distillation–solvent extraction at normal pressure. *Journal of Chromatography* 628, 261–268.
- Blanco C., Stashenko E., Combariza M., Martínez J. 1995. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (697), 501-513.

Bousbia N., Abert M., Ferhat M., Meklati B., Chemat F. 2009. A new process for extraction of essential oil from citrus peels: microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering* 90 409-413.

Braddock J. 1995. By-products of citrus fruits. *Food Technology* 49, 74-77.

Braga A., Guerreiro C., Belo I. 2018. Generation of flavors and fragrances through biotransformation and de *novo* synthesis. *Food and Bioprocess Technology* 11 (34), 2217-2228.

Bramorski A., Soccol C., Christen P., Revah S. 1998. Fruity aroma production by *ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Revista de Microbiologia* 29 (3), 208-212.

Brochado A., Matos C., Møller B., Hansen J., Mortensen U., Patil K. 2010. Improved vanillin production in baker's yeast through in silico design. *Microbial Cell Factories*, 9 (84), 1-15.

Busch K., Kroha K. 1985. Tandem mass spectrometry applied to the characterization of flavor compounds. In D.D. Bills and C.J. Mussinan (eds), *Characterization and Measurement of Flavor Compounds*. American Chemical Society, 121–138.

Caccioni D., Guizzardi M., Biondi D., Renda A., Ruberto G. 1998. Relationship between Volatile components of citrus fruit Essential Oils and Antimicrobial Action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Elsevier International Journal of Food Microbiology* 43, 73-79.

Cardoso G., Juarez G., Sosa M., López A. 2013. Microwave-assisted Extraction of Essential Oils from Herbs. *Journal of microwave power and electromagnetic energy: a publication of the International Microwave Power Institute* 47(1), 63-72.

Cardoso L., Karp S., Vendruscolo F., Kanno K., Zoz L., Carvalho J. 2017. *Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products*.

Celinska E., Kubiak P., Bialas W., Dziadas M., Grajek W. 2013. *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenylethanol producer. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 40, 389–392.

Champagne D., Opendor K., Isman M., G.E. Scudder G., Neil G. 1992. Biological activity of limonoids from the rutales. *Phytochemistry*. Vol. 31, No. 2 (1992); p. 377-394.

Chapman A., Cronnan J. 1999. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Biochemical Science* 29 (4), 359-363.

Chatterjee T. 2004. Biotransformation of geraniol by *Rhodococcus* sp. strain GR3. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 39, 303-306.

Chávarri M., Marañón I., Ares R., Ibáñez F., Marzo C., Villarán M. 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology* 142 (1), 185-189.

Cheong M., Loke X., Liu S., Pramudya K., Curran P., and Yu B. 2011, Characterization of volatile compounds and aroma profiles of Malaysian pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) blossom and peel, *J, Essent, Oil* 23, 33–44.

Chidambara K., Jayaprakasha G., Patill B. 2011. Obacunone and obacunone glucoside inhibit human colon cancer (SW480) cells by the induction of apoptosis. *Food and Chemical Toxicology* 49 (7), 1616-1625.

Chin N. Extraction and characterization of pectin from passion fruit peels. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2, 231-236.

Cho B., Che D., Sin J., Kang H., Kim J., Jang S. 2020. Anti-obesity effects of enzyme-treated celery extract in mice fed with high-fat diet. *Journal of Food Biochemistry* 44(1), 1-11.

Christen P., Bramorski A., Revaha S., Soccol C. 2000. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Bioresource Technology* 71 (3), 211-215.

Christen P., Meza J.C., Revah S. 1997. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: Influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycological Research* 101 (8), 911-919.

Cinar I. 2005. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. *Process Biochemistry* 40, 945-949.

Coll M., Coll L., Laencina J., Tomás F. 1998. Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 206 (6), 404-407.

Converti A., Aliakbarian B., Domínguez J., Bustos G., Perego P. 2010. Microbial production of biovanillin. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 519-530.

Cornell John A. 1984. *How to apply Response Surface Methodology*, American Society for Quality Control, Milwaukee, WI.

Czech., Zarycka E., Dmytro Yanovych D., Zasadna Z., Grzegorz I., Kłys S. 2020. Mineral Content of the Pulp and Peel of Various Citrus Fruit Cultivars. *Biological Trace Element Research* 193, 555-563.

Da Costa N., Sanja E. 2004. Identification of aroma chemicals. Chapter 2. Rowe D. *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. CRC Press, 169-197.

Dabhi B., Vyas R., Shelat H. 2014. Use of banana waste for the production of cellulytic enzymes under solid substrate fermentation using bacterial consortium. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 3 (1), 337-346.

Damasceno S., Cereda M., Pastore G., Oliveira. 2003. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragans* using cassava wastewater as substrate. *Process Biochemistry* 39,411-414.

Davies F., Work V., Beliaev A., Posewitz M. 2014. Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2, 1–11.

De la Torre I., Ladero M., Santos V. 2018. Production of D-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange peel waste: techno-economical assessment of nitrogen sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (24), 10511-10521.

Demyttenaere J. C., Vanoverschelde J. De Kimpe N. 2004-a. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography A* 1027, 137-146.

Demyttenaere J., Belleghem K., De Kimpe N. 2001. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry* 57, 199-208.

Di Gioia D., Sciubba L., Setti L., Luziatelli F., Ruzzi M., Zanichelli D., Fava F. 2007. Production of biovanillin from wheat bran. *Enzyme and Microbial Technology* 41 (4), 498-505.

Dinis M., Bezerra R., Nunes F., Dias A., Guedes C., Ferreira L., Cone J., Marques G., Barros A., Rodrigues M. 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 100, 4829-4835.

Djas M., Henczka M., Potocka K., Wawer J. 2016. Reactive extraction of citric acid using supercritical CO₂ and trioctylamine. *Challenges of Modern Technology* 6 27-30.

Dong Z., Shao Y., and Liang R. 2014, Isolation and characterization of essential oil extracted from tangerine peel, *Asian J, Chem*, 26, 4975–4978.

Dugo P., Mondello L., Favoino O., Cicero L., Rodriguez N, Dugo G. 2005. Characterization of cold pressed Mexican dancy tangerine oils. *Flavour and Fragrances Jorunal* 20, 60-66.

El-Bendary M., Moharam M, Foda M. 2008. Efficient mosquitocidal toxin production by *Bacillus sphaericus* using cheese whey permeate under both submerged and solid state fermentations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 46-53.

Eri S., Khoo B., Lech J. Hartman T. 2000. Direct thermal desorption-gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils in support of varietal characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1140–1149.

Eurostat. 2017. Producción agrícola-cultivos; en Estadísticas de agricultura, silvicultura y pesca-edición 2017.

FAO. 2011. Global food losses and food waste – Extent causes and prevention. Rome.

FAO. 2013 Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. RAP publication (2013/04). <http://www.fao.org/3/i3273e/i3273e00.htm>

Farin D., Ikan., Gross J. 1983. The carotenoid pigments in the juice and flavedo of a mandarin hybrid (*Citrus reticulata*) cv michal during ripening. *Phytochemistry* 22 (2), 403-408.

Fenaroli G. 1971. Fenaroli's handbook of flavour ingredients; The chemical rubber Co, 803.

Ferhat M., Meklati B., Smadja J., Chemat F. 2006. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A* 1112 121-126.

Ferrara M., Almeida D., Siani A., Lucchetti L., Lacerda P., Freitas A., Tappin M., Bon E. Bioconversion of R-(+)-limonene to perillic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Brazilian Journal of Microbiology* 10 (44), 1075-1080.

Fisher K., Phillips C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology* 19 (3), 156-64.

Flamini G., Tebano M, Cioni P. 2007. Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of Citrus limon. *Analytica Chimica Acta* 589 (1), 120-24.

Francisco M., Lago S., Soto A., Arce A. 2010. Essential oil determination by solvent extraction using 1-ethyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxyethoxy) ethylsulfate ionic liquid. *Fluid Phase Equilibria* 296(2), 149-153.

Fundación para la economía circular. 2017. http://economiecircular.org/wp/?page_id=62

Gao X., Xu N., Li S., Liu L. 2014. Metabolic engineering of *Candida glabrata* for diacetyl production. *PLoS One*, 9.

Gershenzon J., Dudareva N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3, 408-414.

Gilbert J. 1987. *Applications of Mass Spectrometry in Food Science*. Elsevier Applied Science.

Giri A., Dhingra V., Giri C., Singh A., Ward O., Narasu M. 2001. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances Journal* 19(3), 175-99.

Giuffrida D., Cacciola F., Mapelli P., Stinco C., Dugo P., Oteri M., Mondello L., Meléndez-Martínez A. 2019. Free carotenoids and carotenoids esters composition in Spanish orange and mandarin juices from diverse varieties. *Food Chemistry* 300, 125-139.

Gorinstein S., Martin-Belloso O., Park Y., Haruenkit R., Lojek A., Ciz M., Caspi A., Libman I., Trakhtenberg S. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74 (3), 309-315.

Guimarães L., Somera A., Terenzi H., Polizeli M., Jorge J. 2009. Production of b-fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. *Process Biochemistry*, 44, 237-241.

Guo T., Kong J., Zhang L., Zhang C., Hu, S. 2012. Fine tuning of the lactate and diacetyl production through promoter engineering in *Lactococcus lactis*. *PLoS One*, 7.

Gupta N., Kushwaha H. 2011. Date palm as source of bioethanol producing microorganisms. Netherlands, Springer.

Havsteen B., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol and therapeutics* 96, 67-202.

He Q., Xiao K. 2016. The effects of tangerine peel (*Citri reticulatae pericarpium*) essential oils as glazing layer on freshness preservation of bream (*Megalobrama amblycephala*) during superchilling storage. 69, 339-345.

Herres W. 1984. Capillary GC-FTIR analysis of volatiles: HRGC-FTIR. In P. Schreier (ed.), *Analysis of Volatiles: Methods-Applications*. Walter de Gruyter 183–219.

Hosni K., Hassen I., Chaabane H., Jemli M., Dallali S., Sebei H., Casablanca H. 2013. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus L.*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products* 47, 291-299.

Huang C., Zong M., Wu H., Liu Q. 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology*, 100, 4535-4538.

Idstein H., Schreier P. 1985. High-resolution gas Chromatography-Fourier transform IR spectroscopy in flavor analysis; limits and perspectives. In D.D. Bills and C.J. Mussinan (eds), *Characterization and Measurement of Flavor Compounds*. American Chemical Society, 109–201.

Ivanov D., Colovic R., Bera O., Levic J., Sredanovic S. 2011. Supercritical fluid extraction as a method for a content determination and preparative technique for fatty acid analysis in mesh feed for pigs. *European Food Research and Technology* 233 (2) 343-350.

Izquierdo L., Sendra J. 2003. Citrus fruits composition and characterization. In B. Caballero, L. Trugo, & P. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Oxford: Academic Press, 1335-1341.

Janssens L., Vandamme E. 1992. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry* 27(4), 195-215.

Jerome M., Zhang M., Thiruvengadam M. 2018. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-ESI-MS/MS, and MALDI-TOF MS in *Fusarium* species-infected sugarcane. *Microbial Pathogenesis* 123, 98-110.

Jiang J. 1993. Identification of flavour volatile compounds produced by *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Techniques*, 7, 863–866.

Jiang M., Yang L., Zhu L., Piao J., and Jiang J. 2011, Comparative GC/MS analysis of essential oils extracted by three methods from the bud of *Citrus aurantium* L, var, amara Engl, J, *Food Sci*, 76, 1219–1225.

Jozala A., Geraldés D., Tundisi L. 2016. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 51-63.

Jukoski M., Bianchi A., Soccol C. 2017. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media. *Fungal Biology* 121 (2), 137-144.

Kademi H., Garba U. 2017. Citrus peel essential oils: a review on composition and antimicrobial activities. *International Journal of Food Safety, Nutrition, Public Health and Technology* 9 (5), 38-44.

Kagliwal L., Survase S., Singhal, R. 2009. A novel medium for the production of cephamycin C by *Nocardia lactamdurans* using solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100, 2600-2606.

Kang Z., Zhang C., Du G., Chen J. 2014. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-phenylethanol from renewable glucose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2012–2021.

Keville K., Green M. 1995. *Aromatherapy: A Complete Guide to the Healing Art*, Crossing Press, USA, p. 2.

Khajeh M. 2011. Optimisation of supercritical fluid extraction of essential oil components of *Diplotaenia cachrydifolia*: Box-Behnken design. *Natural Product Research* 26 (20), 1926-1930.

Khan J., Abulnaja K., Kumosani T., Abou A. 1995. Utilization of saudi date sugars in production of baker's yeast. *Bioresource Technology* 53 (1), 63-66.

Kim T., Lee S., Oh, M. 2014. Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microbiology Technology*, 61–62, 44–47.

King J.W. 2002. Supercritical fluid extraction: present status and prospects. *Grasas y Aceites*, 53 (1), 8–21.

King M., Bott T. 1993. *Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents*. Blackie Academic & Professional 1st edn, 140-183.

Kloepper J. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria. Okon Y. dir: *Azospirillum/Plant Association*. Boca Ratón. CRC Press, 137-166.

Kratchanova M., Pavlova E., Panchev I. 2004. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. En: *Carbohydrate Polymers* 56 (2), 181-185.

Kubeczka K., Formacek V. 1984. Application of direct carbon-13 NMR spectroscopy in the analysis of volatiles. In P. Schreier (ed.), *Analysis of Volatiles: Methods-Applications*. Walter de Gruyter, 219–233.

Kumar D., Yada K., Muthukuma R. Garg. 2013. Production and characterization of alpha-amylase from mango kernel by fusarium solani NAIMCC-F-02956 using submerged fermentation. *Journal of Environmental Biology* 36 (4), 1053-1058.

Kunjapur A., Tarasova Y., Prather K. L. J. (2014). Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of *Escherichia coli*. *Journal American Chemical Society*, 136, 11644–11654.

Lattè K., Appel K., Lampen A. 2011. Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. *Food and Chemical Toxicology* 49, 3287-3309.

Laufenberg G., Kunz B., Nystroem M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology* 87 (2), 167-198.

Lee M., Kim J., Paik J., Kim HY. 2002. Therapeutic effect of topical application of linoleic acid and lincomycin in combination with betamethasone valerate in melasma patients. *Journal of Korean Medical Science*, 17 (4) 518-523.

Lee S., Kim S., Hong C., Park s., Choi I. 2015a. Biotransformation of (-)- α -pinene and geraniol to α -terpineol and p-menthane-3,8-diol by the white rot fungus, *Polyporus brumalis*. *Journal of Microbiology* 53, 462–467.

Lee S., Kim S., Hong C., Kim H., Ryu S., Choi I. 2015b. Biotransformation of (-)- α -pinene by whole cells of white rot fungi, *Ceriporia sp.* ZLY-2010 and *Stereum hirsutum*. *Mycobiology* 43 (3) 2015, 297-302.

Lesage-Meessen L., Lomascolo A., Bonnin E., Thibault J., Buleon A., Roller M., Asther M., Record E., Ceccaldi B., Asther M. 2002. A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103 (1-6), 141-153.

Leuenberger H. 1990. Interrelations of chemistry and biotechnology - I. Biotransformation - a useful tool in organic chemistry. *Pure and Applied Chemistry* 62 (4) 753-768.

Lewandowski I. 2018. Processing of biobased resources. Lewandowski I. ed. *Bioeconomy*. Springer, Champ 75-94.

Li Y., Fabiano-Tixier A., Chemat F. 2014. *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. Springer International Publishing 1, 71-78.

Ling W., Jones P. 1995. Dietary Phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects, *Life Sci* 57:195-206.

Liotta L., Randazzo C., Russo N., Zumbo A., Di Rosa A., Caggia C., Chiofalo V. 2019. Effect of molasses and dried orange pulp as sheep dietary supplementation on physico-chemical, microbiological and fatty acid profile of comisana ewe's milk and cheese. *Frontiers in Nutrition* 6. Article 1.

Liu Y., Heying E., Tanumihardjo S. 2012. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11 (6), 530-545.

Liu Y., Shi J., Langrish T. 2006. Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering Journal* 120 (3), 203-209.

Londoño J., Sierra J., Álvarez R., Restrepo A., Pássaro C. 2012, *Citrus: Growing, Postharvest and Industrialization*, Chapter 12. The use of citrus' sub products, *Lasallian Research and Science Series* 343-366.

Longo M., Sanromán M. 2006. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technology and Biotechnology* 44 (3), 335-353.

Looko Y., Heijde M., Schebesta K. 2018. Biotechnology and the bioeconomy – Towards inclusive and sustainable industrial development. *New Biotechnology* 40 A, 5-10.

López M. 2004. Los aceites esenciales. *Offarm* 23 (7), 88-91.

López M., Suárez L., Moreno J. 2018. Los microorganismos como elementos clave de la bioeconomía. *Bioeconomía y desarrollo sostenible. Mediterráneo Económico. Colección de estudios socioeconómicos. Cajamar.*

Luque de Castro, M., Valcárcel, M., Tena, M., 1993. *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*, Reverté, Barcelona.

Lux P., Carle R., Zacarias L., Rodrigo M., Schweiggert R., Steingass C. 2019. Genuine Carotenoid Profiles in Sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Navel] Peel and Pulp at Different Maturity Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (47), 13164-13175.

Ma G., Zhang L., Iida K., Madono Y., Yungyuen W., Yahata M., Yamawaki K., Kato M. 2017. Identification and quantitative analysis of β -cryptoxanthin and β -citraurin esters in Satsuma mandarin fruit during the ripening process. *Food Chemistry* 234, 356-364.

Mahanta N., Gupta A., Khare S.K. 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*, 99, 1729-1735.

Mahato N., Sharma K., Koteswararao R., Shina M., Baral E., Cho M. 2017. Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59 (4), 1-15.

- Makkar R., Cameotra S. 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 428-434.
- Malko W., Wróblewska A. 2016. The importance of R- (+)-limonene as the raw material for organic syntheses and for organic industry. *CHEMIK* 70, 4, 193–202.
- Maluenda M. 2019. Record mundial en el sector de cítricos. Campaña 2018/19. Agrodigital. <https://www.agrodigital.com/wp-content/uploads/2019/09/citricosp192c.pdf>
- Mank V., Polonska T. 2016. Use of natural oils as bioactive ingredients of cosmetic products. *Ukrainian Food Journal*, 5 (2) 281-289.
- Mann J., Hobbs J., Banthorpe D., Harborne J. 1994. *Natural products: their chemistry and biological significance*. Harlow, Essex. Longman Scientific & Technical, 308–309.
- Manners G. 2007. Citrus Limonoids: Analysis, Bioactivity, and Biomedical Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (21), 3709-3714.
- Manners G., Breksa A., Schoch T., Hidalgo M. 2003. Analysis of Bitter Limonoids in Citrus Juices by Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (13), 3709-3714.
- Maoka T. 2020. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* 74 (1), 1-16.
- Margetts J. 2004. *Aroma and chemicals V: Natural Aroma Chemicals*. Chapter 8. Rowe D. *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. CRC Press, 169-197.
- Maróstica M., Pastore G. 2006. Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26 (3), 690-696.
- Maróstica M., Pastore G. 2007a. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Quim Nova* 30, 382–387.
- Maróstica M., Pastore G. 2007b. Production of R- (+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Chemistry* 101 (1), 345-350.

Martínez-Jávega J., Cuquerella M. 2000. Investigaciones actuales en tecnología poscosecha en frutos cítricos. Levante Agrícola. Especial de poscosecha 352, 216-220.

Martins S., Mussatto S., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C., Teixeira J.A. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. Biotechnology Advances 29, 365-373.

Mcgraw G., Hemingway R., Ingram L., Canady C., Mcgraw W. 1999. Thermal Degradation of Terpenes: Camphene, Δ^3 -Carene, Limonene, and r-Terpinene. Environ. Sci. Technol. 33, 4029-4033.

McHugh M., Krukonis V. 1986. Supercritical fluid extraction: Principles and practice. Butterworth Publishers, 507.

Medeiros A., Pandey A., Christen P., Fontoura P., Freitas R., Soccol R. 2000. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. Biochemical Engineering Journal 6 (1), 33-39.

Mercy N., Nithyalakshami B., Aadhithiya L. 2015. Extraction of orange oil by improved steam distillation and its characterization Studies. International Journal of Engineering Technology, Management and Applied Sciences 3(2), 2349-4476.

Merle H., Moron M., Blazquez M., Boira H. 2004. Taxonomical contribution of essential oils in mandarin's cultivars. Biochemical Systematics and Ecology 32 491-497.

Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. 2017. Informe Anual de Indicadores de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Análisis y prospectiva.

Mohanty S.K., Behera S., Swain M.R., Ray R. 2009. Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. Applied Energy, 86, 640-644.

Mohiuddin M., Kumar B., Haque S., 2017. Biopolymer Composites in Photovoltaics and Photodetectors. Chapter 17. Biopolymer Composites in Electronics 459-486.

Molina G., Bution M., Bicas J., Dolder M., Pastore M. 2015. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. Food Chemistry 174, 606-613.

Molina G., Pessôa M., Bicas J., Fontanille P., Larroche C., Pastorea G. 2019. Optimization of limonene biotransformation for the production of bulk amounts of α -terpineol. *Bioresource Technology* 204, 122180.

Mortier N., Velghe F., Verstichel S. 2016. Organic recycling of agricultural waste today: Composting and anaerobic digestion. Chapter 4. Palmiro Poltronieri, P y Fernando D'urso, O., dir: *Biotransformation of Agricultural Waste and By-products – The food, feed, fibre, fuel (4F) Economy* 69-124.

Mrudula S., Shyam N. 2012. Immobilization of *Bacillus megaterium* MTCC 2444 by Ca-alginate entrapment method for enhanced alkaline protease production. *Brazilian Achieves of Biology and Technology* 55, 135-144.

Mudaliyar S., Sharma i., Kulkarni C. 2012. Food waste management-lactic acid production by *Lctobacillus* species. *International journal of advanced research in biological sciences* 1, 34-38.

Muhoho S., Koaze H., Mwaniki M., Tu M., Sawamura M. 2004. Essential oils of kenyan Citrus fruits: volatile components of two varieties of mandarines (*Citrus reticulata*) and tangelo (*C. paradisi* x *C. tangerina*) *Flavour and Fragrances Journal* 20 74-79.

Mussato Solange., Ballesteros L., Martins S. Teixeira J. 2012. Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. *Industrial Waste. Intech*, 121-140.

Mussinán C. 1993. Instrumental analysis in the flavor industry. In T.E. Acree and R. Teranishi (eds), *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*. American Chemical Society, 169–225.

Mustafa A, Turner C. 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review. *Analytica Chimica Acta* 703(1), 8–18.

Nadal I., Rico J., Pérez-Martínez G., Yebra M., Monedero V. 2009. Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei*. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 36, 1233–1237.

Narushima H, Omori T, Minoda Y. 1982. Microbial transformation of α -pinene. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 16, 174–178.

Navarrete C., Gil J., Durango D., García C. 2010. Extraction and characterization of mandarin essential oil obtained from agro-industrial residues. *Dyna*, año 77, 162 85-92.

Negro V., Mancini G., Ruggeria B., Fino D. 2016. Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: Review on limonene case study and energy valorization.

Ni J., Tao F., Du H., Xu P. 2015. Mimicking a natural pathway for de novo biosynthesis: natural vanillin production from accessible carbon sources. *Scientific Reports*, 5, 13670. *Bioresource Technology* 214, 806-815.

Niranjan R., Lavanya S., Sudisha J., Shekar H. 2010 Applications of biopolymers in agriculture with special reference to role of plant derived biopolymers in crop protection. Kalia S, Avérous L (eds) *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*. Wiley, Hoboken, NJ, 461–481.

Nollet L. 1996. *Handbook of food analysis*. M. Dekker, New York 1996.

Noma Y., Asakawa Y. 2010. Biotransformation of Monoterpenoids. Volume 3.18. *Comprehensive Natural Products II. Chemistry and Biology*. Editors-in-Chief. Liu H., Mander L. 669-801.

Norsalawani T., Borulaini N. 2012. Utilization of lignocellulosic wastes a carbon source for the production of bacterial cellulases under solid state fermentation. *International Journal of Developmental Science* 3 (2), 136-140.

O'Callaghan K. 2016. Technologies for the utilisation of biogenic waste in the bioeconomy. *Food Chemistry* 198, 2-11.

Obidi O., Adelowotan A., Ayoola G., Johnson O., Hassan M., Nwachukwu S. Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. *The international Journal of Biotechnology* 3 (6), 113-122.

Oliveira L., Oliveira A., Bicas J., 2017. Bioaromas – Perspectives for sustainable development. *Trends in Food Science & Technology* 62, 141-153.

Orozco A., Pérez M., Guevara O., Rodríguez J., Hernández M., González-Vila F., Polvillo O., Arias M. 2008. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py–GC/MS analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 8, 247-252.

Orzua M., Mussatto S., Contreras J., Rodriguez R., De la Garza H., Teixeira J., Aguilar C. 2009. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 30,24-27.

Oyeleke S., Oyewole O., Egwim E. 2011. Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using *Parkia biglobosa* (Africa Locust Beans) as substrate in solid state fermentation. *Advances in life sciences* 1 (2), 49-53.

Ozel M., Kaymaz H. 2004. Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379 (7-8), 1127-1133.

Panda S., Mishra S., Kayitesi E., Ray R. 2016. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and Organic acids: Biotechnology and scopes. *Environmental Research* 146, 161-172.

Pandey A., Soccol C., Nigam P., Soccol V., Vandenberghe P., Mohan R. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Biotechnology* 74, 81-87.

Parlamento Europeo. 2018. Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 19 de noviembre de 2008 sobre los residuos y por la que se derogan determinadas directivas.

Parliment T. 1997. Solvent extraction and distillation techniques. R. Marsili (ed.) *Techniques for Analyzing Food Aroma*. Marcel Dekker, Inc 1–27.

Parshikov I., Sutherland J. 2014. The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoides. *Process Biochemistry* 49(12), 2086-2100.

Patel A., Singhanian R., Pandey A. 2017. Production, purification, and application of microbial enzymes. Goutam B. Ed. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press. Chapter 2, 13-41.

Pavia D., Lampman G., Kriz G., Engel R. 2005. *Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Small-Scale Approach*; Thomson Brooks/Coles.

Pazouki L., Niinemets Ü. 2016. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. *Frontiers in Plant Science* 7, article 1019.

- Petkowicz C., Vriesmann L., Williams P. 2017. Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin. *Food Hydrocolloids* 65, 57-67.
- Prabha M., Rangaiah G. 2014. Citric acid production using *Ananas comosus* and its waste with the effect of alcohols. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3 (5), 747-754.
- Prieto G., Perea Y., Ortiz C. 2014. Biocatalytic Production of Perillyl Alcohol Using Whole Cells of *Aspergillus niger* Dsm 821. *Revista Bioagro – UCLA. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 12 (1), 36-46.
- Prommajak T., Leksawasdi N., Rattanapanone N. 2014. Biotechnological valorization of cashew apple: a review. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* 13(2), 159-182.
- Rafiq S., Kaul R., Sofi S., Bashir N., Nazir F., Ahmad G. 2018. Citrus peel as a source of functional ingredient: a review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17, 351–358.
- Rashmi, Sapna Bhardwaj & P.K. Gupta. 2017. A Comparative Study of *Cymbopogon citratus* Volatile Oil by Conventional Method Versus Enzyme Pre-Treatment, *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 20 (3) 744-751.
- Reglamento (UE) 2017/1432 de la Comisión, de 7 de agosto de 2017, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios.
- Retajczyk M., Wróblewska A. 2017. The Isomerization of Limonene over the Ti-SBA-15 Catalyst—The Influence of Reaction Time, Temperature, and Catalyst Content. *Catalysts* 7(9) 273.
- Rhada S., Sridevi A., Himakiranbabu R., Nithya V., Prasad N., Narasimha G. 2012. Medium optimization for acid protease production from *Aspergillus* sp. under solid state fermentation and mathematical modelling of protease activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2(1), 6-16.
- Ricke S. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science* 82, 632-639.
- Rosa A., Benedetta E., Masala C., Nieddu M., Scano P., Fais A., Porcedda S., Piras A. 2019. Supercritical CO₂ Extraction of Waste Citrus Seeds: Chemical Composition, Nutritional and Biological Properties of Edible Fixed Oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 121, 1800502.

Rossi S., Vandenberghe L., Pereira B., Gago J., Rizzolo J., Pandey A., Soccol C., Medeiros A. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Research International* 42 (4), 484-486.

Rozenbaum H., Patitucci M., Antunes O., Pereira N. 2006. Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 23, 273–279.

Saidani M., Dhifi W., Marzouk B. 2004. Lipid evaluation of some Tunisian citrus seeds. *Journal of Food Lipids* 11 (3), 242-250.

Sala J., Lafuente T., Cuñat P. 1992. Content and chemical composition of epicuticular wax of 'Navelina' Oranges and 'Satsuma' Mandarins as Related to Rindstaining of Fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59 (4), 489-495.

Salah R., Jaouadi B., Bouaziz A., Chaari K., Blecker C., Berrouane C., Attia H., Besbes S. 2011. Fermentation of date palm juice by curdlan gum production from *Rhizobium radiobacter* ATCC 466: purification, rheological and physico-chemical characterization. *LWT Food Science and Technology* 44, 1026-1034.

Sales A., Paulino B., Pastore G., Bicas J. 2018. Biogenesis of aroma compounds. *Current Opinion in Food Science* 19, 77-84.

Savithiry N, Gage D, Fu W, Oriel P (1998) Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Biodegradation* 9, 337–341.

Scano E., Asquer C., Pistis A., Ortu L., Demontis V., Cocco D. 2014. Biogas from anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. Experimental results on pilot-scale and preliminary performance evaluation of a full-scale power plant. *Energy Conversion and Management* 77, 22-30.

Schieber A., Stintzing F., Carle R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science and Technology* 12 (11), 401-413.

Schomburg G., Husmann H., Podmaniczky L., Weeke F., Rapp A. 1984. Coupled gas chromatographic methods for separation, identification, and quantitative analysis of complex mixtures: MDGC, GC-MS, GC-IR, LC-GC. In P. Schreier (ed.), *Analysis of Volatiles: Methods- Applications*. Walter de Gruyter, 121–151.

Schrader J. 2007. Microbial flavor production. In: Berger RG (ed) *Flavours and Fragrances-chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Heidelberg.

Scragg A. 2007. The production of flavours by plant cell cultures in flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability; Berger, R. G., Ed.; Springer, 599-614.

SECYTA. Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas a fines. Parámetros, retención en cromatografía en columna. 2020. <https://www.secyta.es/es/node/29>

Serra S., Fuganti C., Brenna E. 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. Trends in Biotechnology 23 (4), 193-198.

Shahidi F. 2005. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 6th Ed. John Wiley & Sons 1-6.

Shahravy A., Tbandeh F., Bumbai B., Zamanizadeh H., Mizani M. 2012. Optimization of probiotic *Lactobacillus casei* ATCC 334 production using date powder as carbon source. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly 18, 273-282.

Shakir I., Salih S., 2015. Extraction of essential oils from citrus by-products using microware steam distillation. Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering 16 (3) 11-22.

Shankar S., Mulimani V. 2007. Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. Bioresource Technology, 98, 958-961.

Shibamoto T. 1984. Applications of high-resolution capillary columns on flavor and fragrance analysis. In P. Schreier (ed.), Analysis of Volatiles: Methods-Applications. Walter de Gruyter, 233-251.

Silva J., Cruz R., Fonseca J., Valente E., Maciel M. 2014. Production, characterization of tannase from *Penicillium montanense* URM 6286 under SSF using agroindustrial wastes, and application in the clarification of grape juice (*Vitis vinifera* L.). Scientific World Journal, 1-9.

Singh B., Satyanarayana T. 2008. Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged fermentation due to statistical optimization. Bioresource Technology, 99, 824-830.

Soares M., Christen P., Pandey A., Soccol C. 2000. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. Process Biochemistry, 35, 857-861.

Srivastava N., Srivastava M., P.K. Mishra P., Gupta P., Molina G., Rodriguez S., Manikanta A., Ramteke P. 2018. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 82, 2379-2386.

Stanbury P., Whitaker A., Hall S. 1995. Principles of fermentation technology, Butterworth Heinemann, 2nd ed, 537.

Stark M., Burke Y., McKinzi J., Ayoubi A., Crowell P.L. 1995. Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol *Cancer Lett.*, 96, pp. 15-21.

Sun H., Ni H., Yang Y., Chen F., Cai H., and Xiao A. (2014a), Sensory evaluation and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of the volatile extracts of pummelo (*Citrus maxima*) peel. *Flavour Fragrance Journal* 29, 305–312.

Tai Y., Xu M., Ren J., Dong M., Yang Z., Pan S., Fan G. 2015. Optimisation of α -terpineol production by limonene biotransformation using *Penicillium digitatum* DSM 62840. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96 (3), 954-961.

Takeoka G., Ebeler S., Jennings W. 1985. Capillary gas chromatographic analysis of volatile flavor compounds. In D.D. Bills and C.J. Mussinan (eds), *Characterization and Measurement of Flavor Compounds*. American Chemical Society, 95–109.

Tanaka M., Takamizua A., Hoshino M., Sasakia M., Gotoa M. 2011. Extraction of dietary fiber from Citrus junos peel with subcritical water. *Food and Bioproducts Processing* 90 (2), 180-186.

Tanash A., Sherief A., Nour A. 2012. Optimization the hydrolysis process of tannic acid for gallic acid production by tannase of *Aspergillus awamori* using response surface methodology. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 10, 9-17.

Taniguchi H., Honnda Y. 2009. Amylases. *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Academic Press.

Thibault J., Micard V., Renard C., Asther M., Delattre M., Lesage-Meessen L., Faulds C., Kroon P., Williamson G., Duarte J., Duarte J., Ceccaldi B., Tuohy M., Couteau D., Van Hulle S., Heldt-Hansen H. 1998. Fungal Bioconversion of

Agricultural By-Products to Vanillin. *LWT - Food Science and Technology* 31 (6), 530-536.

Toniazzo G., De Oliveira D., Dariva C., Oestreicher E. Antunes O. 2005. Biotransformation of (-) - β -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121–124, 837–844.

Trytek M., Jędrzejewski K., Fiedurek J. 2014. Bioconversion of α -pinene by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 42 (2), 181-188.

Ulla H. 2017. Ultrasonic-assisted extraction of essential oil from *Botryophora geniculata* using different extracting solvents. Conference: AIP Conference Proceedings 1787At: Malaysia.

Ullah H., Devi C., Shaharun M. 2019. Comparative assessment of various extraction approaches for the isolation of essential oil from *polygonum minus* using ionic liquids. *Journal of King Saud University – Science* 31 (2), 230-239.

Unakal C., Kalur R., Kaliwai B. 2012. Production of amylase using banana waste by *Bacillus subtilis* under solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology* 2(4), 1044-1052.

Uquiche E., Cirano N., Millao S., 2015. Supercritical fluid extraction of essential oil from *Leptocarpha rivularis* using CO₂ *Ind Crops Prods* 77, 307-314.

Ustok F., Tari C., Gogus N. 2007. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal of Biotechnology*, 127, 322-334.

Vaidya A., Annapure U. 2019. Enzymes in Biosensors for Food Quality Assessment. Chapter 38. *Enzymes in Food Biotechnology. Production, Applications, and Future Prospects*. Academic Press 659-674.

Valenzuela V., Ronco A. 2004, Phytosterols and phytostanols: Natural allied for the protection of cardiovascular health, *Rev Chil Nutr* 21 161-169.

Van Der Werf M., Swarts H., De Bont J. 1999. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Applied Environmental Microbiology* 65, 2092–2102.

- Van Dyk MS., Van Rensburg E., Moleleki N. 1998. Hydroxylation of (+) limonene, (-) α -pinene and (-) β -pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnology Letters* 20; 431–436.
- Vandamme E. 2003. Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. *Fungal Diversity* 13, 153-166.
- Verdura J. Esencias y perfumes en dermofarmacia. Barcelona: Pharmacie and Parfums Ibérica, 1998.
- Vespermann K., Paulino B., Barcelos M., Pessoa M., Pastore G., Molina G. 2017. Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 1805–1817
- Villarán M., Chávarry M., Dietrich T., Rodríguez E. 2018. Subproductos hortofrutícolas para una bioeconomía circular. Capítulo 5. Ejemplos de éxito en la bioeconomía. *Bioeconomía y desarrollo sostenible. Mediterráneo Económico*. Colección de estudios socioeconómicos. Cajamar.
- Waseem R., Low K. 2015. Review Article Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 38, 483-501.
- Willrodt C., David C., Cornelissen S., Bühler B., Julsing M., Schmid A. 2014. Engineering the productivity of recombinant *Escherichia coli* for limonene formation from glycerol in minimal media. *Biotechnology Journal*, 9, 1000–1012.
- Wing J. 2018. Citrus and other fruit by products. *CRC Handbook of Nutritional Supplements: Volume II Agricultural Use*, 181-207.
- Wolski E., Menusi E., Remonato D., Vardanega R., Arbter F., Rigo E., Ninow J., Mazutti M., Di Luccio M., Oliveira D., Treichel H. 2009. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 42, 1557-1560.
- Wosiacki G., Nogueira A. 2001. Apple varieties growing in subtropical areas, the situation in Paraná state. *Fruit Processing* 11, 177-82.
- Wright J. 1995. Essential oils. P.R. Ashurst (ed.), *Food Flavourings*, 2nd edn, Chapman & Hall, 25–57.

Yang C., Wang J., Li D., 2013. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: a review. *Analytica Chimica Acta*, 799, 8-22.

Yoo S., Day D. 2002. Bacterial metabolism of α - and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Process Biochemistry* 37, 739–745.

Yu J., Zhang X., Tan T. 2008. Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. *Fuel Processing Technology*, 89, 1056-1059.

Yu M., Zeng G., Chen Y., Yu H., Huang D., Tang L. 2009. Influence of *Phanerochaete chrysosporium* on microbial communities and lignocellulose degradation during solid-state fermentation of rice straw. *Process Biochemistry*, 44, 17-22.

Zaghdoudi K., Framboisier X., Frochot C., Vanderesse R., Barth D., Kalthoum-Cherif J., Blanchard F., Guiavarc'h Y. 2016. Response surface methodology applied to Supercritical Fluid Extraction (SFE) of carotenoids from Persimmon. *Food Chem* 208, 209-219.

Zhang H., Cao M., Jiang X., Zou H., Wang C., Xu X., Xian M. 2014. De-novo synthesis of 2-phenylethanol by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087. *BMC Biotechnology*, 14, 30.

Zhang H., Yang Y., Zhou Z. 2018. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *Journal of Integrative Agriculture* 17 (1), 256-263.

Zhang X., Zhou X, Xi Z., Yan J., Liu H., Xu B. 2019. Surfactant-assisted enzymatic extraction of the flavor compounds from *Zanthoxylum bungeanum*. *Separation Science and Technology*, April.

Zhao L., Bao Y., Wang J., Liu B., An L. 2009. Optimization and mechanism of diacetyl accumulation by *Enterobacter aerogenes* mutant UV-3. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 25, 57–64.

Zheng L., Zheng P., Sun Z., Bai Y., Wang J., Guo X. 2006. Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresource Technology* 98(5), 1115-1119.

Zielinska A., Nowak I. 2014. Fatty acids in vegetable oils and their importance, in cosmetic industry, CHEMIK, 68(2), 103–110.

Zou Z., Xi W., Hu Y., Nie C., Zhou Z., 2016. Antioxidant activity of citrus fruits. Food Chemistry 196, 885-896.

ANEXOS

Anexo I

Compuestos identificados en los diferentes procesos de extracción y biotransformación llevados a cabo, tanto a escala laboratorio como pre-piloto, con sus respectivos tiempos de retención e índices teóricos y experimentales de Van Den Dool.

Tabla A1.1.1. Compuestos identificados mediante la técnica de CG-MS, con sus respectivos tiempos de retención e índices de Van Den Dool experimentales contrastados con los índices teóricos de la librería NIST.

tR	R. I Exp		R. I T		'ACompuesto		tR	R. I Exp		R. I T		Compuesto
6,571	923	923	923	923	α-Tujeno		10,932	1243	1244	1244	1244	Carvona
6,605	925	925	925	925	α-Pineno		11,338	1277	1274	1274	1274	Peril aldehído
6,917	946	946	947	947	Canfeno		11,475	1288	-	-	-	m-Menta-1,8-dieno
7,243	968	968	969	969	Sabineno		12,011	1335	-	-	-	α-Terpineno
7,273	970	970	969	969	α-Sabineno		12,113	1344	-	-	-	2,6-dimetil-2,6-Octadieno
7,276	970	970	968	968	(-)-α-Tujeno		12,123	1345	1343	1343	1343	Limonen-1,2-diol
7,243	968	968	969	969	Sabineno		12,172	1349	1340	1340	1340	Acetato de nerilo
7,292	971	971	975	975	β-pineno		12,404	1370	1379	1379	1379	Acetato de geranilo
7,412	979	979	970	970	Mirceno		12,502	1378	1377	1377	1377	α-Copaeno
7,701	999	999	1001	1001	α-Felandreno		12,645	1391	1391	1391	1391	β-Cubebano
7,853	1009	1009	1008	1008	α-Terpineno		13,025	1426	1427	1427	1427	Cariofileno
7,970	1018	1018	1021	1021	o-Cimeno		13,238	1446	1446	1446	1446	cis-β-farneseno
8,038	1023	1023	1025	1025	Limoneno		13,42	1463	1460	1460	1460	Humuleno
8,292	1041	1041	1040	1040	β-Ocimeno		13,691	1488	1490	1490	1490	β-selineno

8,315	1043	1040	Ocimeno	13,796	1498	1498	Valenceno
8,441	1052	1053	γ -Terpineno	13,295	1451	1453	(E)- β -farneseno
8,827	1080	1080	Terpinoleno	13,801	1499	-	Eremofileno
8,988	1091	1093	Linalool	14,215	1540	1538	Dihidroactinólido
9,365	1120	1118	<i>trans</i> -p-Menta-2,8-dienol	16,221	1748	1750	α -Sinensal
9,542	1133	1133	Oxido de limoneno	18,026	1957	1958	Ácido palmítico
9,546	1134	1138	<i>Cis</i> -p-menta-2,8-dien-1-ol	19,104	2091	2092	Éster metílico del ácido linoleico
9,942	1164	1164	Isoborneol	19,153	2097	-	Éster metílico del ácido 10-octadecanoico
9,698	1145	1146	Citronelal	19,471	2139	2141	Ácido oleico
10,108	1177	1175	(-)-Terpinen-4-ol	19,511	2145	-	Ácido <i>cis</i> -vaccénico
10,134	1179	1179	Terpinen-4-ol	19,624	2160	-	Éster etílico del ácido linoleico
10,309	1193	1192	α -Terpineol	23,773	-	-	Linoleato de isopropilo
10,367	1197	1195	γ -Terpineol	24,187	-	-	Escualeno
10,600	1216	1220	<i>cis</i> -Carveol	27,148	-	-	Campesterol
10,726	1226	1231	2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> -p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	27,367	-	-	Stigmasterol
10,919	1242	1242	D-Carvona	27,990	-	-	γ -Sitosterol

Anexo II

Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de superficie de respuesta, tras la extracción de aromas, mediante fluidos supercríticos, a partir de residuos liofilizados de mandarina de los lotes M-2016 y M-2018.

Tabla A2.1. Efectos estimados para la extracción de limoneno, empleando fluidos supercríticos a partir de residuos de mandarina.

Efecto	Estimación	E. Estd.*	FIV
Promedio	-0,035	0,043	
Temperatura (a)	-0,035	0,046	1,104
Presión (b)	-0,160	0,048	1,111
Tiempo de extracción (c)	0,094	0,046	1,104
a,a	-0,073	0,076	1,063
a,b	0,240	0,062	1,056
a,c	-0,043	0,060	1,107
b,b	0,045	0,066	1,014
b,c	0,050	0,062	1,056
c,c	-0,028	0,076	1,063

*Errores estándar basados en el error total con 5 grados de libertad

Tabla A2.2. Efectos estimados para la extracción de limoneno, empleando fluidos supercríticos a partir de residuos de mandarina.

Efecto	Estimación	E. Estd.*	FIV
Promedio	0,079	0,005	
Temperatura (a)	0,030	0,006	1,104
Presión (b)	0,013	0,006	1,111
Tiempo de extracción (c)	0,0032	0,006	1,104
a,a	-0,055	0,010	1,063
a,b	0,035	0,008	1,055
a,c	-0,0009	0,008	1,106
b,b	-0,048	0,008	1,013
b,c	-0,023	0,008	1,055
c,c	-0,061	0,010	1,063

*Errores estándar basados en el error total con 5 grados de libertad

Tabla A2.3. Efectos estimados para la extracción aceite esencial, empleando fluidos supercríticos a partir de residuos de mandarina.

Efecto	Estimación	E. Estd.*	FIV
Promedio	1,698	0,670	
Temperatura (a)	-5,585	0,714	1,104
Presión (b)	0,501	0,735	1,111
Tiempo de extracción (c)	-5,260	0,714	1,104
a,a	6,117	1,184	1,063
a,b	-6,935	0,961	1,055
a,c	5,370	0,935	1,106
b,b	6,495	1,027	1,014
b,c	-1,244	0,961	1,055
c,c	5,151	1,184	1,063

*Errores estándar basados en el error total con 5 grados de libertad

Tabla A2.4. Resultados del análisis de varianza del modelo de regresión para la respuesta de extracción limoneno, mediante fluidos supercríticos. El software empleado fue STATGRAPHICS Centurion XVIII.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
a:Temperatura	0,049	1	0,049	12,210	0,017
b:Presión	0,016	1	0,016	3,930	0,104
c:Tiempo de extracción	0,010	1	0,010	2,540	0,172
a,a	0,039	1	0,039	9,820	0,026
a,b	0,002	1	0,002	0,470	0,523
a,c	0,002	1	0,002	0,540	0,494
b,b	0,002	1	0,002	0,560	0,488
b,c	0,001	1	0,001	0,200	0,673
c,c	0,005	1	0,005	1,270	0,311
Error total	0,020	5	0,004		
Total (corr.)	0,140	14			

$R^2 = 85.76 \%$

R^2 (ajustado por g.l.) = 60.13 %

Error estándar del est. = 0.063

Error absoluto medio MAE = 0.028

Estadístico Durbin-Watson DW = 2.17 (P=0.405)

Tabla A2.5. Resultados del análisis de varianza del modelo de regresión para la respuesta de extracción α -terpineol, mediante fluidos supercríticos. El software empleado fue STATGRAPHICS Centurion XVIII.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
a:Temperatura	0,002	1	0,002	26,070	0,004
b:Presión	0,00032	1	0,00032	5,010	0,075
c:Tiempo de extracción	0,00002	1	0,00002	0,300	0,605
a,a	0,002	1	0,002	32,410	0,002
a,b	0,001	1	0,001	20,150	0,007
a,c	0,096	1	0,096	0,020	0,907
b,b	0,002	1	0,002	32,890	0,002
b,c	0,001	1	0,001	9,010	0,030
c,c	0,003	1	0,003	40,420	0,001
Error total	0,00032	5	0,0001		
Total (corr.)	0,010	14			

$R^2 = 96.68 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 90.70 %

Error estándar del est. = 0.008

Error absoluto medio MAE = 0.003

Estadístico Durbin-Watson DW = 2.57 (P=0.719)

Tabla A2.6. Resultados del análisis de varianza del modelo de regresión para la respuesta de extracción de aceite esencial, mediante fluidos supercríticos. El software empleado fue STATGRAPHICS Centurion XVIII.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
a:Temperatura	59,414	1	59,414	61,100	0,001
b:Presión	0,453	1	0,453	0,470	0,525
c:tiempo de extracción	52,700	1	52,700	54,190	0,001
a,a	25,961	1	25,961	26,700	0,004
a,b	50,633	1	50,633	52,070	0,001
a,c	32,041	1	32,041	32,950	0,002
b,b	38,850	1	38,850	39,950	0,002
b,c	1,630	1	1,630	1,680	0,252
c,c	18,412	1	18,412	18,930	0,007
Error total	4,862	5	0,972		
Total (corr.)	300,993	14			

$R^2 = 98,38 \%$

R (ajustado por g.l.) = 95,47 %

Error estándar del est. = 0,986

Error absoluto medio MAE = 0,470

Estadístico Durbin-Watson DW= 2,19 (P=0,415)

Anexo III

Cantidad en miligramos de los principales compuestos identificados, para cada extracción consecutiva tras el proceso de extracción en escala pre-piloto, de los residuos de mandarina de los lotes M-2016 y M-2018.

Tabla A3.1. Miligramos de los terpenos cuantificados en cada extracto proveniente de las tres etapas de extracción consecutiva, cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de extracción de los residuos de mandarina de los lotes 2016 y 2018 en la etapa de escalado pre-piloto, empleando un reactor de 2L de capacidad.

Terpeno	RH-16			C-18		
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
α -Pinoeno	11,61	7,37	-	13,46	7,31	-
β -Pinoeno	20,25	20,08	19,99	19,73	19,45	19,34
β -Miraceno	24,26	9,51	7,58	29,86	10,52	7,54
α -Felandreno	9,45	-	-	9,00	8,48	8,35
Limoneno	1548,64	480,12	339,17	1155,15	486,25	340,6
Linalool	5,44	3,99	3,88	8,24	4,57	4,14
α -Terpineol	25,41	-	-	25,82	-	-
TOTAL	1645,06	521,07	370,62	1261,26	536,58	379,97

RS-16: Residuos húmedos de mandarina del lote 2016; C-18: Residuos húmedos triturados mecánicamente del lote M-2018

Anexo V

Resultados obtenidos tras la optimización de las condiciones del sistema/reactor del proceso de biotransformación.

Tabla A5.1. Compuestos identificados por GC-MS y cuantificados por GC-FID, durante el proceso de optimización del proceso de biotransformación de limoneno en reactores de 50 mL de capacidad (sistema cerrado), por las cepas *A. niger* (M3) y *A. flavus* (LE2) en el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y residuos de alcachofa (ALC), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I T	R-I Exp	Compuesto	EMA			ALC		
				BM	LE2	M3	BM	LE2	M3
6,970	950	940	α -Pinoeno	1,04	86,43	41,58	28,13	43,76	31,13
7,468	983	977	Sabineno	-	16,58	12,06	12,94	20,51	7,67
7,533	986	986	β -Pinoeno	-	7,23	3,18	1,26	2,99	2,06
7,650	995	991	β -Mirceeno	-	10,25	10,22	45,73	79,32	57,08
7,952	1017	1016	3-Careno	-	10,53	7,85	4,15	7,13	4,57
9,067	1097	1097	Linalool	18,65	31,88	28,85	11,86	30,19	36,39
9,276	1113	1114	Bencil carbinol	-	-	-	-	-	4,27
9,379	1121	1123	<i>trans</i> -p-Menta-2,8-dien-1-ol	1,66	7,80	15,31	3,53	8,84	7,08
10,123	1178	1177	Terpinen-4-ol	1,13	8,65	25,94	-	4,01	7,23
10,276	1190	1187	α -Terpineol	9,99	10,39	-	2,99	7,12	7,94
10,319	1193	1194	Dihidrocarveol	-	-	-	-	-	10,27
10,612	1217	1219	<i>cis</i> -Carveol	2,11	9,01	-	3,78	10,14	8,91
10,755	1229	1217	Carveol	1,63	-	-	3,83	13,32	9,56
10,934	1244	1242	D-Carvona	4,79	21,25	-	6,80	2,63	-
11,584	1297	1301	Alcohol perílico	-	-	-	-	5,04	10,83

BM: Muestra control, conformada por medio de cultivo, sustrato y ausencia de microorganismo

Anexo VI

Compuestos identificados y cuantificados en los procesos de biotransformación de sustratos (limoneno estándar, limoneno DBA-M y β -pineno), bajo condiciones optimizadas a escala laboratorio y pre-piloto.

Tabla A6.1. Compuestos identificados mediante CG-MS y cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de biotransformación de limoneno estándar, bajo condiciones optimizadas a escala laboratorio. Por las cepas *A. niger* (M3), *A. flavus* (LE2), *G. citri-aurantii* (M4) y *A. nidulans* (F1). En el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y residuos de alcahola (ALC), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I.T	R-I Exp	Compuesto	EMA						ALC					
				BM	M3	LE2	M4	F1	BM	M3	LE2	M4	F1		
6,619	926	927	α -pineno	2,27	3,45	3,58	5,28	21,55	9,06	3,03	5,57	6,71	13,54		
7,217	966	969	Sabineno	3,45	-	2,95	3,83	0,35	15,49	4,23	7,82	5,36	-		
7,296	971	946	β -pineno	39,88	73,12	65,43	97,12	56,20	137,97	56,48	99,75	116,89	129,95		
7,309	972	975	β -mirceno	38,54	64,23	54,63	88,06	47,72	135,73	49,58	86,94	102,82	93,74		
7,429	980	990	3-carene	6,62	8,44	7,04	14,45	-	19,97	7,90	13,45	15,66	-		
7,751	1002	1009	γ -terpineno	1,81	4,25	3,34	4,59	7,27	3,69	1,93	3,10	3,86	-		
8,242	1037	1038	Linalool	10,05	9,50	14,09	9,93	48,02	9,67	7,84	8,86	8,64	29,18		
8,457	1053	1053	1R,4R-p-menta-2,8-dien-1-ol	1,33	0,38	0,35	1,45	4,92	2,00	0,89	1,13	1,02	4,07		
8,842	1081	1080	cis-p-menta-2,8-dien-1-ol	1,88	0,44	0,62	1,07	5,85	2,16	0,97	1,18	0,72	3,41		
8,999	1091	1094	cis-Carveol	1,43	1,36	1,99	1,92	34,48	1,58	1,02	1,10	1,43	1,00		
9,217	1108	1109	Carveol	0,95	1,31	2,18	1,42	-	1,20	1,37	1,44	1,27	1,17		
9,35	1118	1126	D-carvona	4,80	4,94	4,35	3,65	-	4,49	2,15	1,82	4,10	-		

Tabla A6.2. Compuestos identificados mediante CG-MS y cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de biotransformación de limoneno estándar y su seguimiento en el tiempo (min), bajo condiciones optimizadas por la cepa *A. flavus* (LE2). En el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I.T	R-I Exp	Compuesto	BM-EMA					A. flavus						
				0	90	180	270	360	450	0	90	180	270	360	450
6,602	925	925	α-Pineno	17,23	14,69	0,70	1,21	1,56	1,91	30,87	5,91	6,90	0,72	1,23	0,22
7,289	971	975	β-Pineno	1,34	1,03	-	0,30	0,42	0,46	2,28	-	-	0,23	11,40	0,11
7,408	979	970	Mirceno	25,78	20,93	5,19	4,63	20,03	19,34	42,30	9,11	20,34	6,59	202,97	0,62
7,699	999	1001	α-Felandreno	36,78	25,16	353,10	-	-	-	-	55,94	10,63	11,58	-	-
7,854	1010	1008	α-Terpineno	1,42	0,87	-	-	-	-	-	260,51	169,33	-	-	-
7,966	1018	1016	p-Cimeno	1,56	1,27	-	-	-	-	2,54	-	1,06	-	-	-
8,052	1024	1025	Limoneno	269,22	442,71	353,57	365,88	413,82	426,66	470,97	260,51	182,26	183,43	235,44	92,31
8,981	1091	1098	Linalool	-	-	-	0,49	1,61	2,12	-	-	195,19	0,57	0,88	0,07
9,334	1117	1118	trans-p-Menta-2,8-dienol	-	-	-	0,25	0,63	0,57	-	-	-	0,28	-	-
9,529	1132	1123	1R,4R-p-Menta-2,8-dien-1-ol	-	-	0,31	0,19	0,86	0,97	-	-	-	0,30	0,47	-
10,591	1215	1216	cis-Carveol	-	-	-	0,21	0,58	0,79	-	-	-	0,56	0,45	-
10,756	1229	1222	Carveol	-	-	-	0,19	0,49	0,50	-	-	-	0,65	0,48	-

BM-EMA: Muestra control, conformada por medio de cultivo elaborado con extracto de malta, sustrato y ausencia de microorganismo

Tabla A6.4. Compuestos identificados mediante CG-MS y cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de biotransformación de limoneno estándar y su seguimiento en el tiempo (min), bajo condiciones optimizadas por la cepa *G. citri-aurantii* (M4). En el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I.T	R-I Exp	Compuesto	BM-EMA						M4					
				0	90	180	270	360	450	0	90	180	270	360	450
6,602	925	925	α -Pinenos	7,14	0,83	1,32	7,03	0,57	0,53	8,56	1,58	0,56	3,09	0,44	0,54
7,198	965	969	α -Sabineno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,62	0,50	0,35	0,41
7,289	971	975	β -Pinenos	0,51	0,19	0,95	0,75	0,15	0,09	0,62	0,19	0,12	0,27	0,10	0,11
7,408	979	970	Mirceno	15,51	9,02	8,69	14,55	7,33	5,83	19,96	7,84	6,02	8,64	4,67	5,70
7,699	999	1001	α -Felandreno	14,69	0,48	3,08	10,40	-	-	19,16	3,23	-	5,56	-	-
7,854	1010	1008	α -Terpineno	0,51	-	-	-	-	-	0,62	-	-	-	-	-
7,966	1018	1016	p-Cimeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,052	1024	1025	Limoneno	387,40	514,00	444,46	465,29	463,90	398,70	469,89	359,18	311,43	333,80	326,32	364,94
8,44	1052	1053	γ -Terpineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12
8,981	1091	1098	Linalool	0,60	0,70	0,59	0,73	0,55	0,53	0,70	0,40	0,44	0,42	0,43	0,42
9,205	1107	1117	Bencil carbinol	-	-	-	-	-	-	-	0,09	0,09	0,14	0,16	0,13
9,334	1117	1118	trans-p-Menta-2,8-dienol	-	0,31	0,23	0,26	0,20	0,30	-	0,19	0,17	0,17	0,21	0,23
9,529	1132	1123	1R,4R-p-Menta-2,8-dien-1-ol	0,30	0,40	0,32	0,47	0,35	0,40	0,49	0,26	0,20	0,19	0,17	0,22
10,591	1215	1216	Cis-carveol	-	0,73	0,22	0,28	0,16	0,15	-	0,20	0,19	0,20	0,26	0,28
10,756	1229	1222	Carveol	-	-	0,14	0,24	0,12	0,14	-	0,17	0,16	0,17	0,23	0,23

BM-EMA: Muestra control, conformada por medio de cultivo elaborado con extracto de malta, sustrato y ausencia de microorganismo

Tabla A6.6. Compuestos identificados mediante CG-MS y cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de biotransformación de limoneno estándar, bajo condiciones optimizadas en escala pre-piloto (Reactores de 250 mL de capacidad). Por las cepas *A. flavus* (LE2), *A. niger* (M3) y *G. citri-aurantii* (M4). En el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y residuos de alcachofa (ALC), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I.T	R-I Exp	Compuesto	EMA						ALC			
				BM	LE2	M3	M4	BM	LE2	M3	M4		
6,635	927	927	α -Pinenol	43,05	14,94	37,75	29,83	-	41,00	43,15	30,10		
6,866	943	946	Canfeno	0,14	0,11	0,26	0,13	0,18	0,19	0,22	0,15		
7,229	967	969	Sabineno	23,83	6,19	8,01	8,72	26,07	19,96	19,93	8,75		
7,289	971	972	β -Pinenol	52,04	20,47	48,30	34,35	59,35	50,18	52,14	34,97		
7,463	983	988	β -Miraceno	107,84	40,94	96,04	72,81	118,22	102,38	104,18	70,93		
7,766	1003	1008	3-Careno	6,78	2,63	6,11	0,40	7,70	6,21	7,18	4,82		
8,466	1054	1053	γ -Terpineno	-	0,77	2,93	1,53	-	0,67	1,03	1,47		
8,295	1041	1049	Ocimeno	0,42	0,25	0,49	0,31	0,80	0,70	0,61	0,28		
8,293	1041	1049	α -Terpinoleno	0,25	0,30	0,80	0,46	-	0,40	0,19	0,24		
8,865	1082	1080	Linalol	26,40	16,55	26,40	16,91	26,38	24,27	24,36	14,96		
8,985	1091	1094	Bencil carbinol	-	0,97	0,33	0,22	-	-	0,19	-		
9,482	1129	1126	1R,4R-p-Menta-2,8-dien-1-ol	1,22	-	-	-	-	1,69	1,59	0,68		
9,526	1132	1138	Trans óxido de limoneno	-	-	-	-	-	-	0,25	-		
9,527	1132	1138	Cis óxido de limoneno	1,22	-	-	-	-	-	-	-		
10,054	1173	1174	(-)-Terpinen-4-ol	0,85	1,90	4,98	2,41	-	1,69	1,87	2,01		
10,166	1181	1185	trans-p-Menta-1(7),8-dien-2-ol	-	-	-	-	-	0,19	-	-		
10,214	1185	1190	α -Terpineol	4,75	3,01	5,65	2,72	4,55	3,93	4,12	2,88		
10,259	1189	1189	Dihidrocarveol	-	0,42	-	-	-	1,04	-	-		
10,556	1212	1219	trans-Carveol	1,87	1,49	2,13	1,32	2,22	2,70	2,14	1,13		
10,702	1224	1222	Carveol	1,47	1,58	-	1,20	2,09	2,60	2,06	0,88		
10,883	1239	1238	Carvona	7,94	2,28	-	6,24	6,72	0,83	5,37	5,36		

10,635	1219	1220	Geraniol	-	0,43	-	0,63	-	-	0,33	0,41
11,263	1271	1274	Perilla aldehído	-	-	-	-	-	-	0,25	0,17
11,522	1292	1295	Perilla alcohol	-	0,46	0,44	0,17	-	0,70	0,75	0,70
12,404	1370	1379	Acetato de geraniol	-	0,06	-	0,90	-	0,11	0,14	0,08
12,474	1376	1375	Copaeno	0,59	0,19	0,46	0,13	0,47	0,27	0,28	-
12,622	1389	1391	β -Cubebeno	-	0,20	0,46	0,31	-	0,29	0,31	0,21
13,077	1431	1430	β -Copaeno	-	0,16	-	0,29	-	-	-	0,15
12,992	1423	1427	Cariofileno	0,34	0,15	0,33	0,17	0,36	0,21	0,25	0,17
13,235	1446	1442	cis- β -Farneseno	0,31	0,08	0,28	0,17	0,28	-	0,14	0,08
13,708	1490	1490	Selineno	-	-	-	-	-	0,40	-	0,62
13,765	-	1498	Naftaleno	1,33	0,37	1,21	0,72	0,96	-	0,58	0,43
13,763	1495	1496	Valenceno	-	-	-	-	-	0,51	-	-
19,513	2145	2151	Etil ester del ácido linoleico	-	-	-	-	-	1,42	1,70	2,45
19,565	2152	2173	Ácido linoleico	-	-	-	-	-	2,73	3,06	2,62

BMI: Muestra control, conformada por medio de cultivo, sustrato y ausencia de microorganismo

Tabla A6.7. Compuestos identificados mediante CG-MS y cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de biotransformación de limoneno estándar, bajo condiciones optimizadas en escala pre-piloto (Reactores de 1L de capacidad). Por las cepas *A. flavus* (LE2) y *G. citri-aurantii* (M4). En el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y residuos de alcahofa (ALC), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I.T	R-I Exp	Compuesto	EMA				ALC				
				BM	LE2	M4	M4	BM	LE2	M4	M4	
6,646	928	927	α -pineno	28,50	0,09	13,17	26,70	22,03	24,94			
6,878	943	946	Camfeno	0,09	0,06	-	0,12	0,10	0,10			
7,239	968	968	(-)- α -tujeno	-	-	-	-	-	13,42	8,60		
7,241	968	969	Sabineno	16,10	5,99	3,73	15,70	-	-	-		
7,301	972	972	β -pineno	5,70	3,43	3,08	6,00	5,12	4,05			
7,476	984	988	β -mirreno	72,43	36,46	33,92	67,33	58,49	65,59			
7,694	998	1008	Careno	0,58	2,41	0,00	0,46	-	-			
7,786	1005	1007	3-Careno	4,82	-	2,36	4,58	3,74	4,11			
8,302	1042	-	β -ocimeno	0,51	0,17	0,11	-	-	0,41			
8,468	1054	1053	γ -terpineno	-	0,63	0,33	-	0,52	1,26			
8,655	1067	1080	Terpinoleno	-	0,15	0,22	-	-	0,29			
8,998	1092	1094	Linalool	16,17	14,04	8,27	15,53	14,53	13,44			
9,204	1107	1109	Bencil carbinol	-	-	-	-	-	0,25			
9,31	1114	-	cis-p-ment-2-en-1-ol	1,06	-	-	1,44	-	-			
9,307	1115	1123	Menta-2,8-dien-1-ol,	-	-	-	-	1,50	0,78			
9,499	1130	1126	1R,4R-p-menta-2,8-dien-1-ol	0,95	1,30	0,50	1,04	-	0,58			
10,072	1174	1174	Terpinen-4-ol	-	1,92	1,48	-	1,18	1,78			
10,232	1187	1190	α -Terpineol	2,93	2,81	1,62	2,83	2,51	2,19			
10,575	1214	1219	trans-Carveol	1,48	2,12	0,76	1,86	1,55	0,51			
10,652	1220	1220	cis-Geraniol	-	-	0,32	-	-	0,21			

10,72	1226	1222	Carveol	1,18	1,85	0,69	2,02	1,74	0,52
10,902	1241	1238	D-carvona	5,63	2,67	3,93	5,05	2,90	3,87
11,285	1273	1274	Perilla aldehído	0,30	0,61	0,12	0,29	-	0,16
11,436	1285	-	m-Menta-1,8-dieno	-	-	-	-	0,14	0,20
11,547	1294	1295	Perilla alcohol	-	-	-	-	0,41	0,54
12,118	1344	-	Acetato de nerilo	-	-	0,03	-	-	0,06
12,007	1335	1342	Limoneno-1,2-diol	-	-	-	-	0,28	0,13
12,493	1377	1375	Copaeno	-	0,24	-	-	0,20	0,16
12,644	1391	1391	β -cubebeno	-	0,11	0,09	-	-	0,12
13,013	1425	1427	Cariofileno	-	-	0,06	-	-	0,10
13,012	1425	1433	β -Copaeno	-	0,09	0,09	-	-	0,09
13,731	1492	1490	β -Selineno	-	-	0,23	0,18	-	0,09
13,255	1447	1442	cis- β -farneseno	-	0,07	0,06	-	-	-
13,787	1497	1498	Naftaleno	0,36	0,29	-	0,27	-	0,26
19,534	2148	2159	Ester etílico del ácido linoleico	-	-	-	-	1,31	1,07
19,59	2155	2169	Ácido linolénico	-	-	-	-	2,24	1,22

BM: Muestra control, conformada por medio de cultivo, sustrato y ausencia de microorganismo

Tabla A6.8. Compuestos identificados mediante CG-MS y cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de biotransformación de limoneno contenido en el aceite esencial extraído de los residuos (DBA-M), bajo condiciones optimizadas a escala laboratorio. Por las cepas *A. niger* (M3), *A. flavus* (LE2), y *G. citri-aurantii* (M4). En el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y residuos de alcachofa (ALC), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I.T	R-I Exp	Compuesto	EMA				ALC			
				BM	LE2	M3	M4	BM	LE2	M3	M4
6.609	925	927	α -pineno	11.65	18.22	10.77	25.65	15.34	21.21	10.58	6.315
6.911	946	946	Canfeno	-	-	-	0.21	7.71	-	-	1.179
7.205	965	969	Sabineno	4.88	3.07	-	5.26	-	1.25	-	0.789
7.295	971	975	β -pineno	1.16	3.31	3.10	0.00	-	3.51	-	-
7.414	979	988	β -mirreno	30.20	50.43	19.96	74.94	42.54	64.75	32.13	16.514
7.519	985	1007	3-careno	1.23	-	0.43	2.52	0.70	-	0.85	0.501
8.242	1037	1038	β -ocimeno	-	-	-	-	1.79	-	-	-
8.445	1052	1053	γ -terpineno	2.10	6.22	2.89	6.06	2.15	3.90	2.72	2.897
8.821	1079	1119	p-Menta-1,3,8-trieno	-	-	1.13	-	-	-	0.67	-
8.989	1091	1094	Linalool	3.27	8.54	7.51	8.27	3.53	7.14	3.26	6.052
9.341	1118	1126	1R,4R-p-menta-2,8-dien-1-ol	0.02	-	-	0.00	-	-	-	-
9.204	1107	1109	Bencilcarbinol	-	-	9.54	10.40	-	-	2.22	7.446
9.531	1132	1138	cis-p-menta-2,8-dien-1-ol	0.05	-	-	-	-	-	-	-
10.134	1179	1180	Terpinen-4-ol	0.65	3.87	5.16	3.82	0.45	2.40	1.14	3.028
10.309	1193	1192	α -terpineol	6.82	18.24	18.49	16.51	4.44	13.95	6.59	12.504
10.93	1243	1242	D-carvona	-	-	0.11	0.26	-	-	-	-
13.798	1498	1493	Valenceno	3.96	6.07	6.90	6.00	4.02	7.78	4.45	8.329
19.63	2160	2159	Ester etílico del ácido linoléico	-	-	-	-	-	9.52	4.26	11.318
19.68	2167	2169	Ácido linolénico	-	-	-	-	-	14.19	6.98	11.128

BM: Muestra control, conformada por medio de cultivo, sustrato y ausencia de microorganismo

Tabla A6.9. Compuestos identificados mediante CG-MS y cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de biotransformación de β -pineno y su seguimiento en el tiempo (min), bajo condiciones optimizadas por la cepa *A. niger* (M3). En el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I T	R-I Exp	Compuesto	BM-EMA						M3					
				0	90	180	270	360	450	0	90	180	270	360	450
6,602	925	925	α -Pineno	1,44	0,85	1,09	0,89	0,90	0,74	1,03	0,92	0,65	0,55	0,62	1,04
6,868	943	946	Canfeno	0,22	0,19	0,24	0,17	0,22	0,12	0,20	0,18	0,15	0,13	0,12	1,24
7,289	971	975	β -Pineno	453,27	408,16	447,91	421,91	441,83	428,98	388,09	361,69	308,28	255,76	307,54	330,46
7,408	979	970	Mirceno	1,72	1,05	1,18	0,95	1,04	0,77	1,04	1,10	0,70	0,50	0,64	0,78
7,699	999	1001	α -Felandreno	0,95	-	-	-	-	-	0,34	-	-	0,00	-	-
8,052	1024	1025	Limoneno	0,08	0,05	-	-	-	-	0,33	-	0,09	0,10	0,10	1,85
8,981	1091	1098	Linalool	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	-
8,822	1079	1080	Terpinoleno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	0,13	0,26	6,92
9,205	1107	1117	Bencilcarbinol	-	-	-	-	-	-	-	0,13	0,12	0,11	0,19	1,64
9,483	1129	1122	β -Fenchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12
9,626	1140	1141	Pinocarveol	0,85	1,10	1,06	1,04	0,94	1,04	0,84	0,89	0,87	0,66	0,77	2,08
9,907	1161	1164,2	Pinocarvona	0,18	0,29	0,30	0,22	0,23	0,25	0,24	0,23	0,18	0,16	0,14	-
10,124	1178	1180	Terpinen-4-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57
10,238	1187	1182	Isopinocarveol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	0,04	0,05	0,12
10,307	1192	1191	α -Terpineol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78,75
10,324	1194	1194	Mirtenol	1,29	1,65	1,56	1,48	1,51	1,42	1,23	1,52	2,03	1,79	2,82	-
13,778	1496	1496	β -Selineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,08	0,11

BM-EMA: Muestra control, conformada por medio de cultivo elaborado con extracto de malta, sustrato y ausencia de microorganismo

Tabla A6.10. Compuestos identificados mediante CG-MS y cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de biotransformación de β -pineno y su seguimiento en el tiempo (min), bajo condiciones optimizadas por la cepa *A. niger* (M3). En el medio de cultivo convencional elaborado con residuos de alcachofa (ALC), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I T	R-I Exp	Compuesto	BM-ALC						M3					
				0	90	180	270	360	450	0	90	180	270	360	450
6.602	925	925	α -Pineno	1.16	1.05	0.71	0.54	0.71	0.68	1.18	0.97	0.79	1.03	0.94	0.85
6.868	943	946	Canfeno	0.23	0.20	0.17	0.12	0.14	0.12	0.21	0.19	0.20	0.22	0.18	0.16
7.289	971	975	β -Pineno	446.81	439.72	308.79	256.39	308.53	328.72	446.76	440.72	458.77	433.51	478.30	440.73
7.408	979	970	Mirceno	1.26	1.23	0.82	0.61	0.83	0.67	1.18	1.06	0.89	1.13	1.03	0.78
8.052	1024	1025	Limoneno	-	0.75	0.06	0.04	-	-	-	0.07	0.17	0.13	0.16	0.07
8.822	1079	1080	Terpinoleno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.11	-
9.205	1107	1117	Bencil carbinol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.24	-	-	-
9.626	1140	1141	Pinocarveol	1.01	1.01	0.75	0.62	0.87	0.84	1.01	0.87	1.52	0.89	1.51	1.30
9.907	1161	1164.2	Pinocarvona	0.25	0.24	0.17	0.12	0.20	0.16	0.32	0.32	0.16	0.29	0.24	0.33
10.088	1175	1169	Pinocanfona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.07	-
10.238	1187	1182	Isopinocarveol	-	-	-	-	-	-	-	0.06	0.10	0.07	0.08	0.08
10.307	1192	1191	α -Terpineol	-	-	-	-	-	-	-	1.44	-	-	-	-
10.324	1194	1194	Mirtenol	1.43	1.41	1.14	1.03	1.35	1.47	1.50	1.85	3.04	1.69	3.11	2.14
13.775	1496	1494	α -Selineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.24
13.778	1496	1496	β -Selineno	1.16	1.05	0.71	0.54	0.71	0.68	1.18	0.97	0.79	1.03	0.94	-

BM-ALC: Muestra control, conformada por medio de cultivo elaborado con residuos de alcachofa, sustrato y ausencia de microorganismo

Tabla A6.11. Compuestos identificados mediante CG-MS y cuantificados mediante CG-FID, tras el proceso de biotransformación de β -pineno, bajo condiciones optimizadas en escala pre-piloto (Reactores de 250 mL de capacidad). Por la cepa. *niger* (M3). En el medio de cultivo convencional elaborado con extracto de malta (EMA) y residuos de alcachofa (ALC), con sus respectivas concentraciones en el medio (mg/L). Se incluyen los índices experimentales y teóricos de Van Den Dool calculados y confirmados mediante NIST.

tR	R.I T	R-I Exp	Compuesto	EMA		ALC	
				BM	M3	BM	M3
6,615	926	934	α -Pineno	11,51	10,18	12,31	10,88
6,842	941	946	Canfeo	0,19	0,23	0,27	0,28
7,465	983	989	β -Mirceno	-	7,72	-	-
7,678	997	1001	α -Felandreno	8,89	8,81	4,79	8,37
8,081	1024	1027	Limoneno	46,95	48,88	53,54	50,06
8,432	1048	1049	γ -Terpineno	-	0,25	-	0,15
8,842	1075	1071	α -Terpinoleno	-	0,99	-	-
8,958	1083	1082	Linalool	-	0,12	0,13	-
9,205	1107	1110	Fenchol	-	0,31	-	-
9,451	1126	1134	<i>cis</i> oxido de limoneno	-	0,05	-	-
9,581	1136	1138	Pinocarveol	1,07	0,96	1,45	0,97
9,88	1159	1164,2	Pinocarvona	0,19	0,20	0,27	0,30
9,91	1162	1164	Borneol	-	0,14	-	-
10,04	1172	1171	Terpinen-4-ol	-	0,48	-	-
10,259	1189	1190	α -Terpineol	0,21	9,57	0,31	0,67
10,328	1194	1194	Mirtenol	1,93	1,57	2,52	1,63
10,974	1247	1257,1	<i>trans</i> -Mirtanol	-	-	-	0,16
11,506	1291	1295	Alcohol perilico	-	0,09	-	0,07
14,33	1551	1551	<i>trans</i> oxido de nerodiol	-	-	-	-
19,583	2154	2159	Ester etilico de ácido linoleico	-	-	-	0,22
19,638	2161	2169	Ácido linolenico	-	-	-	0,47

BM: Muestra control, conformada por medio de cultivo, sustrato y ausencia de microorganismo

Anexo VII

Umbrales olfativos para la detección de aromas.

Tabla A7.1. Umbrales olfativos para la detección de aromas. Expresados en ppm.

ξ	Compuesto	UOD (mg/L)	Referencia
2157	Borneol	0,180	Padrayuttawat A, <i>et al</i> , 1997,
2248	Terpinen-4-ol	1,290	Padrayuttawat A, <i>et al</i> , 1997,
2249	Carvona; (-)-carvona	0,050	Ohloff G, 1978,
2252	Cariofileno; β-cariofileno	0,064	Ohloff G, 1978; Guadagni D., <i>et al</i> , 1966,
2507	Geraniol; <i>trans</i> -3,7- Dimetil-2,7-octadien-ol;	0,040-0,075	Takeoka G, <i>et al</i> , 1978,
2509	Acetato de geraniol	0,009	Buttery B, <i>et al</i> , 1988; Fazzalari F, 1978; Guadagni D, <i>et al</i> , 1966,
2633	Limoneno; D-limoneno	0,010	Fazzalari F, <i>et al</i> , 1978; Ohloff' G, 1978; Buttery B, <i>et al</i> , 1971,
2635	Linalool	0,006	Fazzalari F, <i>et al</i> , 1978; Guadagni D, <i>et al</i> , 1966; Ohloff G, 1978; Buttery B, <i>et al</i> , 1971; Amooore J, 1976,
2664	Alcohol perílico	1,660	Padrayuttawat A, <i>et al</i> , 1997,
2762	Mirceno	0,013-0,015	Fazzalari F, <i>et al</i> , 1978; Buttery B, <i>et al</i> , 1968; Guadagni D, <i>et al</i> , 1966; Ohloff G, 1978; Teranishi R, 1971,
2770	Nerol	0,300	Ohloff G, 1978,
2856	α-felandreno	0,002	Padrayuttawat A, <i>et al</i> , 1997,
2858	Bencil carbinol	0,750-1,100	Buttery B, <i>et al</i> , 1988; Buttery R, <i>et al</i> , 1989; Ohloff G, 1978; Buttery R, <i>et al</i> , 1990,
2902	α-pineno	0,006	Fazzalari F, 1978; Guadagni D, <i>et al</i> , 1966,
2903	β-pineno	0,140	Fazzalari F, 1978; Guadagni D, <i>et al</i> , 1966,
3045	Terpineol; α-Terpineol; p-menta-1-en-8-ol;	0,330-0,350	Takeoka G, <i>et al</i> , 1990; Buttery R, <i>et al</i> , 1968; Ohloff G, 1978; Buttery R, <i>et al</i> , 1990,
3046	Terpinoleno; p-menta-1,4(8)-diene	0,200	Fazzalari F, 1978; Buttery R, <i>et al</i> , 1968,
3559	γ-terpineno	0,020	Padrayuttawat A, <i>et al</i> , 1997,

FEMA: Flavor extract manufacturers association, UOD: Umbral olfativo de detección, Leffingwell & Associates, Odor & Flavor Detection Thresholds: <http://www.leffingwell.com/odorthre.htm>