

Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con *Aspergillus terreus*

Por L. Martínez Nieto*, A. Ramos Cormenzana**, M.^a P. García Pareja** y S.E. Garrido Hoyos

* Dpto. de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

** Dpto. de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

RESUMEN

Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con *Aspergillus terreus*

Se estudia la degradación de alpechines con *Aspergillus terreus* en condiciones de aerobiosis y temperatura de 28°C, utilizando como parámetro el contenido fenólico.

Se analiza el efecto de la concentración de alpechín con *Aspergillus terreus* utilizando el mismo parámetro.

Se han identificado por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) 10 compuestos fenólicos que suponen el 90% del total del alpechín.

PALABRAS-CLAVE: Almazara - Alpechín - Compuestos fenólicos - Cromatografía líquida de alta eficacia - Depuración aerobia - Microorganismo.

SUMMARY

Phenolic compounds biodegradation of olive mill wastewater with *Aspergillus terreus*

Olive mill wastewater degradation by *Aspergillus terreus* and under aerobic conditions at 28°C, was measured by the parameter of phenol content.

We have explored the effect of different concentrations of olive mill wastewater upon the activity of *Aspergillus terreus*.

Through HPLC, 10 phenol compounds (90% of the total phenolic content of the olive mill wastewater) were identified.

KEY-WORDS: Aerobic depuration - High performance liquid chromatography - Microorganism - Oil mill - Olive mill wastewater - Phenolic compounds.

1. INTRODUCCION

El alpechín es el agua residual del proceso de extracción de aceite de oliva, presentando como característica más importante una elevada DQO (entre 39.900-210.000 p.p.m.) y DBO (entre 9.600-150.000 p.p.m.) así como un carácter recalcitrante para su autodepuración debido a su elevado contenido en compuestos fenólicos de alto poder contaminante (1).

Tan sólo en la cuenca del río Guadalquivir se puede estimar una producción media de 1.800.000 m³/año, lo que supone el equivalente a la contaminación de una población de 3.500.000 habitantes (2), de las cuales se vierten directamente de una forma incontrolada el 25%, el 75% no vertido en la actualidad se trata en balsas de

evaporación (3) que tan solo palián parcialmente el problema.

En orden a resolver dicha contaminación se han puesto en práctica diversos procesos que van desde la simple evaporación (4) hasta procesos físico-químicos como la ósmosis inversa y ultrafiltración (5) pasando por procesos microbiológicos anaerobios (6). Todos ellos exigen alta inversión y suponen una difícil amortización dado el carácter temporal de la industria almazarera. La biodegradación que se estudia en el presente trabajo, puede ser una alternativa viable si tal como se piensa, el alpechín pierde parcialmente su poder antimicrobiano y pueda ser vertido, tras un tratamiento posterior de tipo químico sencillo.

Al ser el alpechín un subproducto vegetal posee un alto contenido en compuestos fenólicos. De todos los componentes descritos en él, sólo se prestará atención especial a los compuestos fenólicos de bajo peso molecular. En la Tabla I se describen los compuestos fenólicos identificados y cuantificados en el alpechín según varios autores. En la Tabla II se describen los fenoles totales en el alpechín.

Los ácidos hidroxicinámicos (18) (cafeico, p-cumárico, ferúlico y sinápico) se encuentran en la mayoría de las plantas no en forma libre sino como ácidos conjugados solubles frecuentemente como O-ésteres incluyendo los muy extendidos 1-O-acil glucósidos. También a menudo se acumulan como amidas con una limitada distribución en la mayoría de los tejidos de las plantas. En las paredes de las células los ácidos hidroxinámicos glucosilados solubles se encuentran como O-ésteres en polímeros.

Así por ejemplo el ácido cafeico libre no existe en la pulpa de la aceituna (12), pero sí en el alpechín debido a procesos de hidrólisis ocurridos durante la obtención de éste.

Otro posible origen de los ácidos fenólicos (verátrico, vainillínico y siríngico) es la lignina de las semillas de las aceitunas en los que se encuentran como polímeros que son capaces de reaccionar con otros compuestos (proteínas) formando estructuras resistentes a la biodegradación (19). Mediante el proceso de prensado que sufren las semillas, se producen hidrólisis químicas y enzimáticas en el seno de este polímero.

Tabla I
Compuestos fenólicos descritos en el alpechín

| No flavonoides (mg/L) | <u>7</u> | <u>8</u> | <u>9</u> | <u>10</u> | <u>11</u> | <u>12</u> | <u>13*</u> | <u>14</u> | <u>15</u> |
|--|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Acidos cinámicos | | | | | | | | | |
| Acido Cafeico | – | NC | – | – | 90 | NC | – | – | NC |
| Acido Dihidrocafeico | NC | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 1-cafeil glucosa | – | – | – | – | – | NC | – | – | – |
| Acido p-cumárico | – | – | – | – | – | NC | NC | NC | NC |
| Acido Ferúlico | – | – | – | – | – | – | NC | – | NC |
| Acid. Dihidroxicinámico | NC | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Acidos benzoico y sus derivados | | | | | | | | | |
| Acid. Protocatéuico | NC | NC | – | – | – | NC | NC | NC | – |
| Aldh. Protocatéuico | – | – | – | – | – | – | NC | – | – |
| Acido p-OHbenzoico | – | – | – | 0-590 | – | – | NC | NC | NC |
| p-OHbenzaldehído | – | – | – | – | – | – | NC | NC | – |
| Vainillol | – | – | – | NC | – | – | – | – | – |
| Acido vainillínico | – | – | – | 0-1.360 | 242 | NC | NC | NC | NC |
| p-vainillina | – | – | – | – | – | – | NC | NC | – |
| Acido sirngico (b) | NC | – | – | T | 710 | – | NC | – | – |
| Siringaldehído | – | – | – | – | – | – | NC | NC | – |
| Acid. 2,6 diOHbenzoico | – | – | – | 0-1.060 | – | – | – | – | – |
| Acid. 3,4,5 trimetoxibenzoico | – | – | – | – | 80 | – | – | – | – |
| Acido verátrico | – | – | – | – | 500 | – | – | – | – |
| Aci. 1,3,4 diOHmandelico | – | – | – | – | – | – | – | – | NC |
| Aci. p-OHfenil acético | – | – | – | – | 145 | – | – | – | – |
| Acid. p-OHfenil propiónico | – | – | – | – | – | – | NC | NC | – |
| Derivados del alcohol | | | | | | | | | |
| β-3,4 diOHfeniletanol | | | | | | | | | |
| Hidroxitirosol | – | NC | – | – | – | NC | – | – | NC |
| Tirosol | – | NC | – | – | – | NC | NC | – | NC |
| 4-OHtirosol m-glucósido | – | – | – | – | – | NC | – | – | – |
| 4-OHtirosol diglucósido | – | – | – | – | – | NC | – | – | – |
| Oleuropeína | – | – | – | – | – | NC | – | – | – |
| Esculetina | NC | – | – | – | – | – | – | – | NC |
| Flavonoides | | | | | | | | | |
| Apigenina | – | – | – | – | – | NC | – | – | – |
| Cianidina | – | – | NC | – | – | – | – | – | – |
| Flavanona o flavanol | – | – | – | – | – | NC | – | – | – |
| Luteolina | – | – | – | – | – | NC | – | – | – |
| Luteolin 7-glucósido | – | – | – | – | – | NC | – | – | – |
| Quercetina | – | – | – | – | – | NC | – | – | – |

NC: No cuantificado. En la cita 7 los porcentajes se refieren a peso/volumen.

(b): Aparecen con interrogación en la cita 10.

*: Se han identificado en el pigmento del alpechín tras oxidación con CuO.

Tabla II
Fenoles totales en el alpechín en (mg. / L)

| 6 | 8 | 9 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 5.000 | 17.500 | 1.400 | 1.470 | 4.000 | 7.100 | 65.000 |

En el desarrollo del proceso de bioconversión de la lignina (20), la fermentación se puede orientar a una máxima obtención de productos como enzimas lignolíticas, o polímeros de la lignina, los cuales pueden tener algunas modificaciones o bien compuestos fenólicos de bajo peso molecular, al igual que pueden intervenir en la biosíntesis de la lignina como el ácido sinápico (21).

No hay que olvidar que la lignina puede ser degradada por bacterias con actividad lignolítica (22) obteniéndose los ácidos p-hidroxibenzoico, vainillínico, verátrico y p-cumárico, o por hongos incrementando los compuestos fenólicos hidrolizados y su solubilidad (23).

Debido a estas características y dependiendo en qué tiempo de la campaña se obtiene el alpechín, la cantidad en compuestos fenólicos puede variar en más o menos. Así el contenido de fenoles decrece durante la maduración de la aceituna (12).

Debido a la actividad antimicrobiana y efecto fitotóxico de los compuestos fenólicos, es de una gran importancia la identificación y cuantificación de éstos para resolver uno de los problemas de contaminación fluvial más importante existente en el momento.

Para su identificación y cuantificación se ha utilizado el método de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), que es 10 veces más sensible que la cromatografía de gases (CG). Es una técnica rápida y versátil para separar y cuantificar los compuestos fenólicos en el alpechín. Una de las ventajas de CLAE en los estudios de biodegradación es la separación de compuestos con diferentes polaridades en una sola inyección, además puede haber una menor interferencia de otros compuestos, ya que la detección si se hace en un detector de diodos, se puede observar la muestra que se está analizando en un rango de longitud de onda entre 190 a 600 nm.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Alpechín utilizado

En la Tabla III se encuentran las características más interesantes del alpechín utilizado en los experimentos. Las muestras se tomaron de "Jimena Osuna S.A." obtenidas por un proceso "Pieralisi" continuo. Fueron recolectadas a la salida de la última centrifuga. Se introdujeron en frascos estériles para su traslado al laboratorio y almacenados a -20°C en el momento de su recepción.

2.2. Tratamiento previo del alpechín

Antes de proceder al tratamiento biológico todas las muestras se filtran al vacío en un Büchner, con objeto de eliminar las partículas suspendidas presentes en la muestra. A continuación del proceso de filtrado, el alpechín se somete a una esterilización en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Tabla III
Características físico-químicas del alpechín

| | (g/L) |
|--------------------------|--------|
| pH | 5,26 |
| DQO | 212,25 |
| DBO | 179,45 |
| Sólidos totales | 55,59 |
| Sólidos volátiles | 44,46 |
| Sólidos no volátiles | 11,13 |
| Sólidos sedimentables | 7,75 |
| Sólidos no sedimentables | 47,84 |
| Sólidos suspendidos | 2,44 |
| Sólidos disueltos | 45,40 |
| Fenoles totales | 0,7% |

2.3. Medios de cultivo

Se han utilizado concentraciones de alpechín del 20% al 100% utilizando medio mínimo de mantenimiento (MMM) (24) para las diluciones. En la Tabla IV se describe la composición del MMM.

Tabla IV
Composición del medio mínimo de mantenimiento

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Fosfato bi-potásico | 1,60 g. |
| Fosfato mono-potásico | 0,50 g. |
| Sulfato amónico | 1,25 g. |
| Nitrato amónico | 1,00 g. |
| Sulfato magnésico pentahidratado | 0,50 g. |
| Cloruro sódico | 0,25 g. |
| Cloruro férrico hexahidratado | 0,025 g. |
| Cloruro cálcico | 0,010 g. |
| Agua Destilada c.s.p. | 1.000 mL. |

La disolución de cada uno de los reactivos se hizo por separado para evitar que los fosfatos precipiten con el resto de los reactivos adicionales. El medio fue esterilizado a 121°C durante 20 minutos.

2.4. Microorganismo

Se ha utilizado el hongo *Aspergillus terreus* cedido por el Departamento de Microbiología, Facultad de Far-

macia de la Universidad de Granada. El *Aspergillus terreus* fue aislado de un cultivo de enriquecimiento, utilizando como fuente de carbono alternativa el pigmento del alpechín teniéndose en cuenta la propia composición del pigmento según Pérez Torres (13).

2.5. Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos se partió de esporas suspendidas en solución salina ($1,9 \times 10^8$ esporas viables por mililitro), se inoculó un 1% en medio líquido (alpechín a diferentes concentraciones), posteriormente se incubó a 28°C/72 horas. Al siguiente inóculo se le añadió un 10% del inóculo sembrado e incubado y nuevamente se incubó a 28°C/72 horas. No fue necesario ajustar el pH del medio ya que el alpechín tiene un pH entre 4,5-5,5 el cual es favorable para el crecimiento del hongo.

2.6. Reactor

En todos los casos los experimentos se realizaron en un reactor de 5 litros de capacidad tipo tanque agitado, cuyo esquema se representa en la Figura 1.

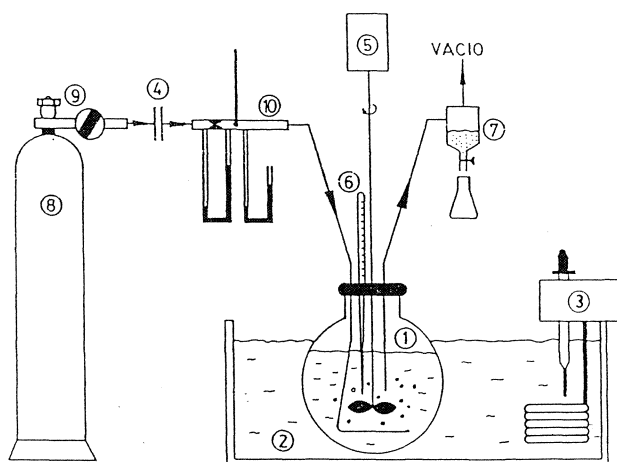


Figura 1
Esquema del Reactor

1. Depósito de almacenamiento, 2. Baño termostático, 3. Control de temperatura, 4. Filtro, 5. Agitador, 6. Termómetro, 7. Toma de muestras, 8. Bala de aire, 9. Manorreductor, 10. Diafragma.

Para la realización de un experimento, una vez esterilizados todos los componentes del reactor, se agrega alpechín a la concentración deseada, se adiciona el inóculo preparado como se ha descrito en el apartado 2.5., con un caudal de aire de 720 ml/min esterilizado por filtración. Se mantiene una agitación de 200 r.p.m. A intervalos regulares se toman muestras para determinar el contenido fenólico.

2.7. Métodos Analíticos

2.7.1. Medida del pH

Se efectuó en un pH-metro Crison.

2.7.2. Demanda Química de Oxígeno

Se efectuó el análisis según Rodier (25) con algunas modificaciones por Capitán Vallvey y Alonso Hernández (26).

2.7.3. Demanda Bioquímica de Oxígeno

Se efectuó el análisis según Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (27).

2.7.4. Contenido en sólidos

Se efectuó el análisis según Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (28).

2.7.5. Contenido fenólico

El contenido fenólico total se ha determinado siguiendo el método de Folín-Ciocalteu (29). Para realizar los análisis individuales se utilizó un cromatógrafo formado por los siguientes elementos: Cromatógrafo 501 de Waters Associates. Dos bombas M45, 501 de Waters. Inyector Perkin Elmer con un loop de 6µL. Controlador automático de gradiente 680 de Waters. Columna de fase reversa C₁₈ (12,5 cms x 4 mm I.D.), contenido Spherisorb C₁₈ unido a una fase de sílice. Un UV/VIS detector de diodos 2140 de LKB. Un software Wavescan EG de LKB y PE Nelson 3.000 series Chromatography Data System (Perkin Elmer Nelson Systems Inc.). Impresora NEC. Prinwriter CP7.

La detección se hizo a 6 longitudes de onda comprendidas entre 190 a 365 nm sobre los eluatos obtenidos según se describe en la Tabla V.

Tabla V
Gradiente utilizado en la elución de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

| Tiempo (mín.) | flujo mL/mín.) | A% | B% | Curva |
|---------------|----------------|-----|----|-------|
| — | 1,0 | 100 | 0 | 5 |
| 3,0 | 1,0 | 100 | 0 | 5 |
| 5,0 | 1,0 | 50 | 50 | 5 |
| 10,0 | 1,1 | 40 | 60 | 5 |
| 20,0 | 1,2 | 30 | 70 | 5 |
| 22,0 | 1,2 | 25 | 75 | 5 |
| 25,0 | 1,2 | 20 | 80 | 5 |
| 30,0 | 1,2 | 15 | 85 | 5 |
| 35,0 | 1,2 | 15 | 85 | 5 |
| 37,0 | 1,0 | 100 | 0 | 5 |

Para A: Acido acético-Agua (2:98).

B: Agua-Acido acético-Metanol (68:2:30).

Se utilizaron como patrones compuestos comerciales de alta pureza de las casas comerciales de Fluka AG,

Sigma y Merk, los ácidos protocatéuico, vainillínico, caféico, p-hidroxifenil acético, p-hidroxibenzoico, siríngico, p-cumárico ferúlico, gálico, p-hidroxifenilpropiónico y sináptico, vainillol, p-vainillina y siringaldehído.

El procedimiento de extracción fue según la metodología de Olano y Hernández (30). Se tomaron 200 mL de alpechín sin degradar y degradado por el *Aspergillus terreus*. Se concentraron en rotavapor a presión reducida a 35°C hasta aproximadamente un tercio del volumen inicial. Las muestras se acidificaron con HCl y se realizaron tres extracciones sucesivas con éter etílico (v/v) a temperatura ambiente. Se reunieron las tres fracciones orgánicas y se secaron con Na₂SO₄ anhidro durante 30-40 minutos. Transcurrido este tiempo se concentró a sequedad en rotavapor, y se recogió con 2 mL de mezcla Metanol/H₂O (1:1). Se filtró con un filtro millipore de 0,45µ.

Finalizada la extracción y redisolución en metanol/H₂O los compuestos fenólicos de bajo peso molecular se separaron e identificaron por la técnica CLAE. Estos se identificaron por su tiempo de retención y por el cociente entre los factores de respuesta a 280 y 340 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla VI se encuentran los porcentajes degradados de cada uno de los compuestos fenólicos identificados para cada una de las diluciones empleadas. En la última fila se encuentra el porcentaje total de fenoles degradados respecto a la concentración inicial de partida. Hay que significar que los fenoles identificados suponen un 90% de la carga total de fenoles presentes en el alpechín.

De la observación de dicha tabla se puede deducir que al aumentar la concentración del alpechín el efecto de degradación por *Aspergillus terreus* va haciéndose en general menor.

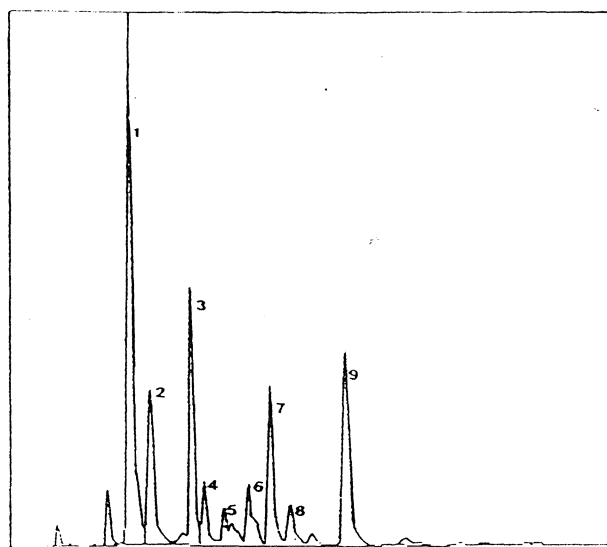
Tabla VI

Porcentaje de compuestos fenólicos degradados a diferentes concentraciones de alpechín

| Compuesto | 20% | 40% | 60% | 80% | 100% |
|----------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|
| Ac. protocatéuico | 99,58 | 100 | 42,31 | 58,51 | 66,07 |
| Vainillol | 77,38 | 54,91 | 16,38 | 40,05 | 55,00 |
| Ac. p-hidroxibenzoico | 93,43 | 91,98 | 42,39 | 31,04 | 53,21 |
| Ac. p-hidroxifenil acético | — | 83,55 | -23,21 | -85,85 | -49,33 |
| Ac. vainillínico | 85,50 | 94,35 | 69,82 | 56,57 | 39,85 |
| Ac. caféico | 98,03 | 84,38 | 68,83 | 67,60 | 74,85 |
| pV+Ac. siríngico | — | 91,20 | 45,50 | 42,79 | 67,91 |
| Siringaldehído | 75,34 | 87,58 | 72,21 | 62,97 | 83,63 |
| Ac. p-cumárico | 98,09 | 96,42 | 89,00 | 70,39 | 90,74 |
| %Degradación | | | | | |
| Fenoles totales | 68,90 | 66,61 | 34,98 | 30,55 | 42,08 |

pV: parvainillina.

Se observa no obstante cuando se trabaja con alpechín sin diluir que para algunos fenoles la degradación aumenta ligeramente; también es de notar para el p-hidroxifenil acético que no solamente no se degrada sino que aumenta su concentración en el medio, probablemente debido a que aparece como consecuencia del metabolismo fúngico, lo que ya se ha indicado por varios

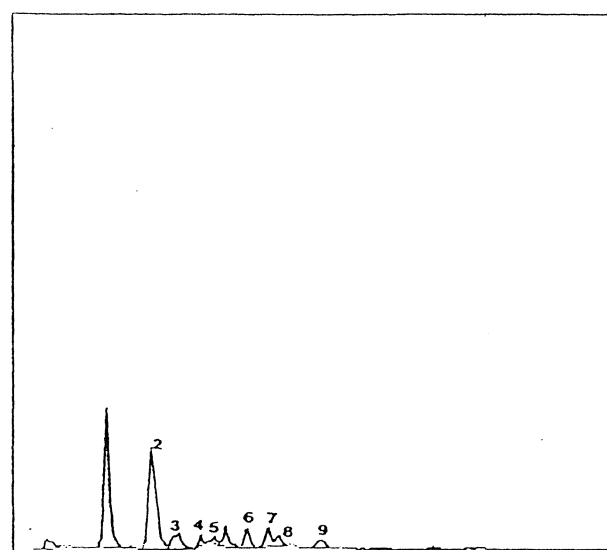


37 min.

Figura 2

Perfil cromatográfico por CLAE de los extractos del alpechín sin inoculo

1. Acido protocatéuico, 2. Vainillol, 3. Acido p-hidroxibenzoico, 4. Acido p-hidroxifenil acético, 5. Acido vainillínico, 6. Acido caféico, 7. p-vainillina + ácido siríngico, 8. Siringaldehído, 9. Acido p-cumárico.



37 min.

Figura 3

Perfil cromatográfico por CLAE de los extractos del alpechín inoculado

2. Vainillol, 3. Acido p-hidroxibenzoico, 4. Acido p-hidroxifenil acético, 5. Acido vainillínico, 6. Acido caféico, 7. p-vainillina + ácido siríngico, 8. Siringaldehído, 9. Acido p-cumárico.

autores. Según Pérez Torres (13) parece ser que cuando va asociada la degradación del ácido cafeico con el ácido p-hidroxifenil acético o en la degradación simultánea del p-hidroxifenil acético, vainillínico y siringico se detecta la aparición de nuevos picos. En estudios realizados por Kadam y col.(20), la degradación de los compuestos fenólicos en primer lugar, hay una pérdida inicial de grupos metoxilo, seguida de una pérdida de grupos OH del anillo aromático antes que la dioxigenasa del hongo rompa el anillo, estos anillos son convertidos a estructuras de tipo o-difenoles. Algunas de estas estructuras son formadas por demetilación, que resulta en la pérdida de grupos metoxilo, los cuales se detectarían como nuevos picos.

En las Figuras 2 y 3 se exponen a título de ejemplo, los cromatogramas obtenidos en las condiciones indicadas, en el apartado de métodos analíticos (contenido fenólico) para el alpechín tratado al 40% obtenidos a λ 280 nm.

Con objeto de comprobar la bondad del método seguido, se han determinado algunos parámetros característicos de la columna, como el factor de capacidad (k'), el factor de selectividad (α) y resolución (R) que se encuentran en la Tabla VII.

De la observación de esta tabla, el factor de capacidad (k') se encuentra entre 1 y 10, siendo de confianza el análisis cualitativo, el factor de selectividad (α) se encuentra entre 1 y 2, lo cual demuestra que hay una buena relación de capacidad entre dos picos k'_2/k'_1 .

Tabla VII
Parámetros cromatográficos básicos para alpechín al 100%

| Compuesto | tr (mín) | k' | α | R |
|----------------------|----------|-------|----------|-------|
| Ac. Protocatéuico | 7.200 | 1.748 | — | — |
| Vainillol | 8.333 | 2.181 | 1.248 | 2.589 |
| Ac. p-OHbenzoico | 10.817 | 3.129 | 1.435 | 3.830 |
| Ac. p-OHfenilacético | 11.433 | 3.364 | 1.075 | 3.708 |
| Ac. vainillínico | 12.667 | 3.835 | 1.140 | 3.013 |
| Ac. cafeico | 14.067 | 4.369 | 1.139 | 3.819 |
| pV+Ac. siringico | 15.283 | 4.833 | 1.106 | 3.913 |
| Siringaldehído | 16.483 | 5.291 | 1.095 | 3.737 |
| Ac. p-cumárico | 19.700 | 6.519 | 1.232 | 3.618 |

pV: paravainillina.

4. CONCLUSIONES

De los experimentos realizados hasta el momento, se puede concluir, que el *Aspergillus terreus* se comporta como un buen degradador de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, habiéndose acomodado bien, cuando se ha partido de alpechín sin diluir, observándose no obstante una disminución de su acción degradadora, al aumentar la concentración de alpechín. Cabe pensar por tanto que el alpechín tratado sea de menor capacidad antimicrobiana.

BIBLIOGRAFIA

- Moreno, E.; Pérez, J.; Ramos Cormenzana, A. & Martínez, J. (1987).— "Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacterial after incubation with diluted waste".— *Microbios* 51, 169-174.
- Rodrigo Román, J. (1990).— "Situación en España de los alpechines".— Jornadas Técnicas "Tratamiento sobre los alpechines".— 31 mayo, 1 junio. Córdoba.
- Fiestas Ros de Ursinos, J.A. (1986).— "Aprovechamiento de subproductos y tratamiento de aguas residuales de la industria agroalimentaria con especial atención al alpechín".— Curso ANQUE, "Tecnología de la transformación físico-química y biológica de los alimentos", 393-442. Granada.
- Storm, J. (1989).— "Evaporación del alpechín". Jornadas sobre innovación tecnológica, medio ambiente y desarrollo. Sevilla.
- Reimers Suárez, G. (1983).— "Posibilidades de tratamiento del alpechín por ultrafiltración y ósmosis inversa".— *Química e Industria*, 273-274.
- Fiestas Ros de Ursinos, J.A.; Martín Martín, A. & Borja Padilla, R. (1990).— "Influence of immobilization supports on the kinetic constants of anaerobic purification of olive mill waste water".— *Biological Wastes* 33, 131-142.
- Carola, C.; Arpino, A. et Lanzani, A. (1975).— "Lo smaltimento della acque di vegetazione provenienti dagli impianti di estrazione dell'olio dalle olive e studio della loro possibile utilizzazione".— *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 52, 335-340.
- Pompei, C. et Codovilli, F. (1974).— "Risultati preliminari sul trattamento di depurazione della acque di vegetazione delle olive per osmosi inversa".— *Sci. Tecnol. Alimenti* 4, 363-364.
- Raggazzi, E. et Veronesse, G. (1967).— "Ricerche sui costituenti idrosolubili delle olive. Nota II. Pigmenti e polisaccaridi".— *An. Chim.* 57, 1398-1413.
- López Aparicio, F.J.; García-Granados López de Hierro, A. y Rodríguez Alonso, M. (1977).— "Estudio del contenido en ácidos carboxílicos del alpechín de la aceituna y evolución de los mismos".— *Grasas y Aceites* 28, 393-401.
- Balice, V. and Cera, O. (1984).— "Acid phenolic fraction of the olive vegetation water determined by a gas chromatographic method".— *Grasas y Aceites* 35, 178-180.
- Vázquez Roncero, A.; Maestro Durán, R. y Graciani Constante, E. (1974).— "Componentes fenólicos de la aceituna II. Polifenoles del alpechín".— *Grasas y Aceites* 25, 341-345.
- Pérez Torres, J. (1988).— "Transformación microbiana de componentes aromáticos del alpechín".— Tesis Doctoral. Dpto. de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Sáez Merte, L.E. (1989).— "Contenido fenólico del alpechín y actividad antibacteriana".— Licenciatura. Dpto. Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- León Cabello, M.ª de los R. (1990).— "Estudio de la acción antibiótica de los componentes fenólicos del olivo (*Olea Europea L.*)".— Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Sevilla.
- García García, P.; Garrido Fernández, A.; Lemonier, J.P.; Overend, R.P. y Chornet, E. (1990).— "Aplicación de la tecnología Jet-reactor a la oxidación húmeda de las aguas residuales de las industrias derivadas del olivo".— *Grasas y Aceites* 41, 158-162.
- Montedoro, G.; Bertuccioli, M.; et Petruccioli, G. (1975).— "Effetti dei trattamenti con additivi enzimatici e con detannizzanti alle paste di oliva sottopaste ed estrazione per pressione unica, sui rendimenti in olio, sulla velocità di estrazione e sulle caratteristiche analitiche degli oli, delle acque di vegetazione e delle acque residuale".— *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 52, 255-265.
- Strack, D. (1990).— "Metabolism of hydroxycinnamic acid conjugates".— XV International Conference Groupe Polyphenols. Strasbourg.
- Sáinz-Jiménez, C. & Gómez Alarcón, G. (1986).— "Effects of vegetation water on fungal microflora".— En FAO (ed.). International Symposium on olive by products valorization, 61-76. Sevilla.
- Kadam, K.L. & Drew, S.W. (1986).— "Study of lignin biotransformation by *Aspergillus fumigatus* and white rot fungi using ¹⁴C-labeled and unlabeled kraft lignins".— *Biotechnology and Bioengineering* 28, 394-404.
- Barthes, P.; Durán, H. et Gorrichon, L. (1990).— "Nouvelle synthèse d'acide sinapique marque".— XV International Conference, Groupe Polyphenols, Strasbourg.
- Janshekar, H. & Fiechter, A. (1982).— "On the bacterial degradation of lignin".— *European J. Apply. Microbiol Biotechnol* 14, 47-50.

23. Trojanowski, A.; Hütterman & Majcherczyk. (1989).– "Conversion of industrial lignin by fungal cultures in pellet form".– Biomass Congres. Lisboa.
24. Janshekar, H.; Brown, C. & Fiechter, A. (1981).– "Determination of biodegraded lignin by ultraviolet spectrophotometry".– *Analytica Chimica Acta* **130**, 80-91.
25. Rodier, J. (1985).– "Análisis de las aguas".– (ed.) Omega, 528-533.
26. Capitán Valley, L. y Alonso Hernández, E.J. (1987).– "Técnicos en análisis de aguas".– Fondo Social Europeo. Universidad de Granada, 33-35.
27. Sauter, A. & Stoub, K. (1990).– Official Methods of Analysis (AOAC).– *Waters and Salt* **11**, 314-316.
28. Sauter, A. & Stoub, K. (1990).– Official Methods of Analysis (AOAC).– *Waters and Salt* **11**, 317.
29. Ribéreau-Gayon, P. (1968).– "Les composés phénoliques des végétaux".– Dunod. París.
30. Olano, A. & Hernández, T. (1985).– "Study of the separation of low molecular weight phenolic compounds by HPLC and GLC".– *Bull. Liaison. Groupe. Polyphenols* **12**, 80-91.

(Recibido: Julio 1991)