



# “Determinación de la Cinética de crecimiento de *Rhizopus oryzae* NCIM 1299 usando escobajo de uva en experimentos de membrana”

María Carla Groff<sup>1</sup>, Gustavo Juan Eduardo Scaglia<sup>2</sup>, Marta Gaido<sup>3</sup>, Diego Enrique Kassuha<sup>1</sup>, Oscar Alberto Ortiz<sup>2</sup>, Sandra Edith Noriega<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Químicas y Tecnológicas, Universidad Católica de Cuyo, San Juan, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina.

<sup>3</sup> Laboratorio de Control de Calidad Dr. Alberto Graffigna, Universidad Católica de Cuyo, San Juan, Argentina.



La economía de San Juan se sustenta en la actividad agroindustrial y manufacturera, destacándose el complejo vitivinícola...

Tabla I: Destino de la uva ingresada a establecimientos en 2018 (quintales).

PROVINCIAS	ELABORACIÓN DE VINO Y MOSTO	CONSUMO EN FRESCO	PASAS	TOTAL
Mendoza	17.147.256	2.375	1.720	17.151.351
San Juan	<b>6.587.152</b>	63.577	489.584	7.140.313
La Rioja	732.365	-	16.198	748.563
Salta	348.673	-	-	348.673
Catamarca	144.275	-	-	144.275
Neuquén	115.829	-	-	115.829
Río negro	49.360	-	-	49.360
La pampa	14.986	-	-	14.986
Córdoba	8.838	-	-	8.838
Tucumán	3.892	-	-	3.892
San Luis	3.397	-	-	3.397
Entre Ríos	1.038	-	-	1.038
Buenos Aires	1.025	-	-	1.025
Chubut	804	-	-	804
Jujuy	769	-	-	769
TOTAL	25.159.660	65.952	507.502	25.733.114

Residuo: ESCOBAJO DE UVA (EU)  
5%

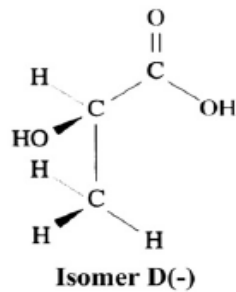
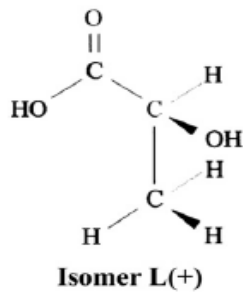


**32.935 ton. en 2018**

Fuente: Instituto Nacional de Vitivinicultura (2018).



## Ác. Láctico



## Síntesis biotecnológica de Ác. Láctico



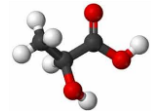
Uso de sustratos renovables y  
Microorganismos



↓ Tº proceso y ahorro energético



Obtención isómero L(+) puro



Bajos costos



**Demanda mundial: 1.220 kilotoneladas**  
de Ac. Láctico en 2016 (Grand View Research).

**Importación: 2.442 ton de Ác. láctico** en 2013  
(Maggioni y Giaroli, 2015).



## Uso de Hongos en fermentación

- **Desarrollo hifal** que penetra el sustrato sólido;
- **Baja exigencia nutricional** para su desarrollo;
- **Buena tolerancia** a la baja actividad de agua y a la alta presión osmótica;
- Potente de producción de **enzimas hidrolíticas**. (Rahardjo Y. , 2005)

(**Dificultades operativas:** altos niveles de aireación, dificultad de agitación y de control de la humedad)



**Ventajas** sobre los **microorganismos unicelulares** en la colonización de sustratos sólidos.

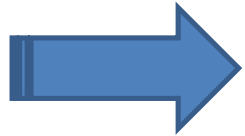


***R. oryzae*** posee solo el **gen L-LDH**, por lo que produce **L (+) AL puro**.

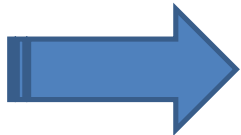


## Objetivo General

**Proponer al Escobajo de Uva como sustrato de la fermentación con *R.oryzae* NCIM1299 para obtener Ác. Láctico y conocer la cinética del crecimiento fúngico.**



No hay reportes de trabajo con Escobajo de Uva en fermentación de estado sólido.



No hay reportes de cinética de crecimiento de *R. oryzae* sobre sustratos sólidos.

**INNOVADOR**



# Metodología

1- Muestreo y acondicionamiento de EU

2- Caracterización fco-qca del EU

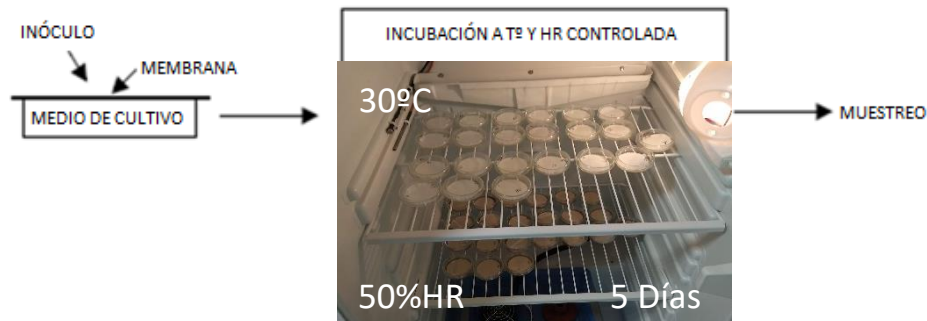
3- Crecimiento de *R. oryzae* NCIM 1299 sobre membrana: APD y Agar+EU

4- Cuantificación de biomasa seca fúngica

Las membranas se secaron a 80°C por 24 horas hasta peso constante (Saithi y col, 2016).



DETERMINACIÓN	NORMA
Humedad	NREL/TP-510-42621
Cenizas	NREL/TP-510-42622
Nitrógeno total	AOAC, Kjeldahl Method
Azúcares reductores	Método del DNS
Fibra bruta	AOAC Official Method 962.09
Material extraíble en agua y etanol	NREL/TP-510-42619 y Soxhlet
Lignina Klason insoluble	TAPPI 222
Holocelulosa	ASTM D-1104
Polifenoles totales	Gutfinger T. (1981)





# Metodología

5- Obtención y cuantificación de glucosamina



6- Determinación de la cinética de crecimiento

Modelo logístico

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) X \quad ; \quad X(0) = X_0 \quad (1)$$

$$X(t) = \frac{X_{max}}{\left(\frac{X_{max}}{X_0} - 1\right)e^{-\mu_{max}t} + 1} \quad (2)$$

Modelo de primer orden

$$\frac{dX}{dt} + \frac{X}{T_p} = \frac{1}{T_p} * X_{max} \quad , \quad X(0) = X_0 \quad (3)$$

$$X(t) = X_0 * e^{-t/T_p} + X_{max}(1 - e^{-t/T_p}) \quad (4)$$

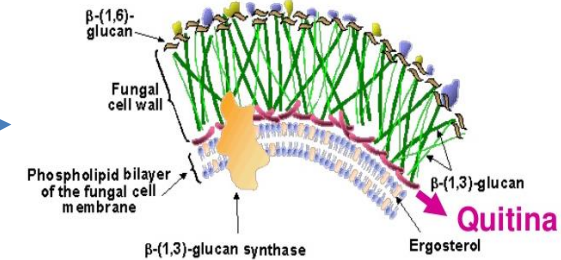
Modelo de primer orden con retardo

$$\frac{dX}{dt} + \frac{X}{T_p} = \frac{1}{T_p} * X_{max} (t - T_0) \quad , \quad X(0) = X_0 \quad (5)$$

para  $t \geq T_0$

$X = X_0$  para  $t < T_0$

$$X(t) = \begin{cases} X_0 * e^{-(t-T_0)/T_p} + X_{max} \left(1 - e^{-(t-T_0)/T_p}\right) & \text{para } t \geq T_0 \\ X = X_0 & \text{para } t < T_0 \end{cases} \quad (6)$$



Rodriguez Pérez y col. (2017)

Hidrólisis ácida

Neutralización con NaOH

Centrifugación

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% a Tº amb por 4hs

Sobrenadante se usa para cuantificar

Diluir H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3% a 100ºC por 2hs

Chen y Johnson. (1983)

+ Acetilacetona 4%

+ Reactivo de Ehrlich

Espetrofotometría

90ºC por 1 h

Color rosa se mide a 530 nm

Enfriar y + Etanol





# Resultados

**Tabla 1:** Composición química de EU de variedad Cereza.

Composición	Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ): $250 < \phi < 350$	
	Valor (g/100gEUS)	DS
Humedad	12.10	0.05
Cenizas	6.43	0.03
Extractivos		
Agua	19.62	-
Etanol	7.76	-
Total	27.38	
Lignina Klason insoluble <sup>a</sup>	38.61	1.48
Holocelulosa <sup>b</sup>	49.10	0.67
Fibra cruda <sup>c</sup>	30.50	2.88
Azúcares reductores <sup>d</sup>	54.07	0.97
Nitrógeno Total <sup>c</sup>	0.95	0.18
Proteína	6.18	-
Polifenoles totales (mg/100g EUS) <sup>d</sup>	2.19	0.02

Todos los datos están expresados por cada 100g de EU seco.

<sup>a</sup> Muestras sin extractivos, corregido por cenizas y proteínas.

<sup>b</sup> Muestras sin extractivos, sin corrección por cenizas y proteínas.

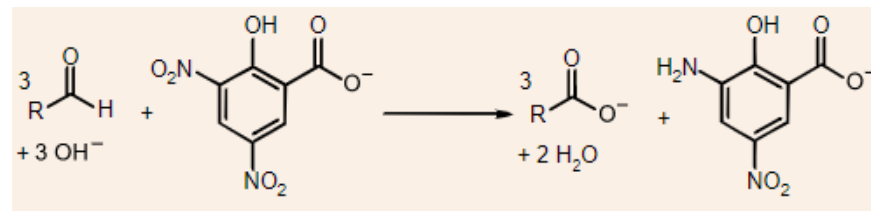
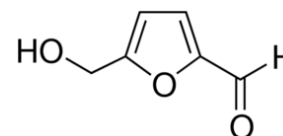
<sup>c</sup> Muestras con extractivos.

<sup>d</sup> Solubles en agua.

**Comparación de componentes lignocelulósicos de EU reportados por otros autores:**

	Holocelulosa (%)	Celulosa /Fibra cruda (%)	Hemicelulosa (%)
Nuestra investigación	49.10	30.50	18.60
Ping y col (2011).	60.80	36.30	24.50
Spigno y col (2008).	52.81	37.88	14.93
Prozil y col (2014)	51.30	30.30	21.00

	Solventes extractivos	Lignina Klason(%)
Nuestra investigación	Agua/Etanol	38.60
Ping y col (2011).	Diclorometano (DCM)	39.60
Spigno y col (2008).	Agua caliente(2x)	32.98
Prozil y col (2014)	Acetona/DCM/Agua	17.40

**Reacción AZ. RED con DNS:****Interferencia de HMF:**

**Error por exceso**





# Resultados

(Matlab R2015a)

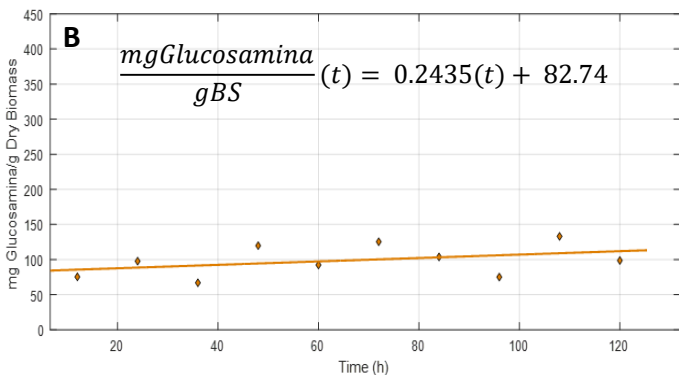
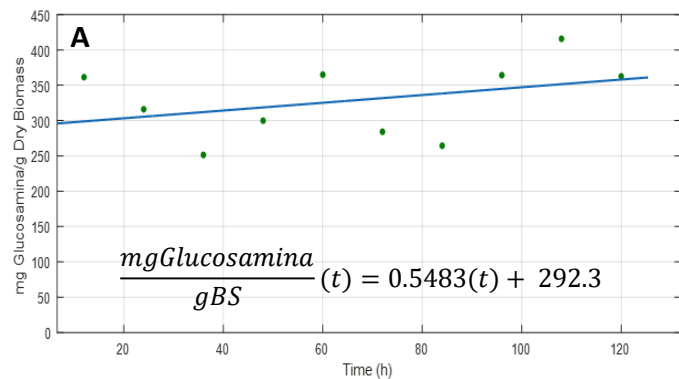


Fig. 1: Evolución de mgGlucosamina/gBiomasaSeca *R. oryzae*  
A: APD; B: Agar+EU.

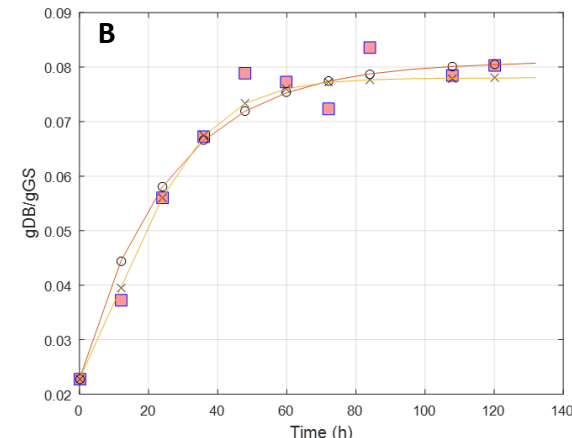
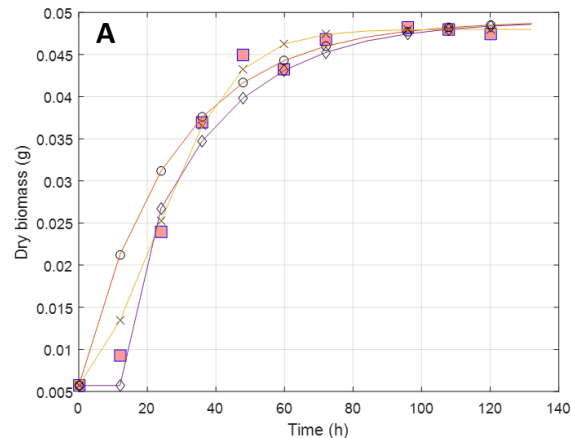


Fig. 2: Modelado matemático de la cinética de crecimiento de *R. oryzae* NCIM 1299 en: A: APD; B: Agar+EU.  $\square$  Resultado experimental;  $\circ$ : Modelo de Primer orden;  $\times$ : Modelo Logístico;  $\diamond$ : Modelo de primer orden con retardo.

Tabla 2: Parámetros obtenidos del ajuste de los modelos matemáticos de la cinética de crecimiento de *R. oryzae* NCIM 1299 en APD y Agar+EU.

Medio de cultivo	Modelos	$X_0$ (gBS/gEU or gglucosa)	$X_{max}$ (gBS/gEU or gglucosa)	$H_{max}$ (1/h)	$T_p$ (h)	$T_0$ (h)	$R^2$ (%)
PDA	Logístico	0.0570	0.483	0.084	-	-	98.76
	FO		0.485	-	27	-	91.64
	FOPDT		0.485	-	27	1	97.04
Agar+GS	Logístico	0.0228	0.078	0.076	-	-	97.35
	FO		0.081	-	25.8	-	95.80

## Conclusiones

El EU puede usarse como sustrato sólido en fermentación fúngica, siendo una alternativa de **revalorización** de este subproducto.

El contenido de **polifenoles del EU no obstaculizó** el desarrollo del hongo.

Se obtuvo la relación **Glucosamina/Biomasa seca de *R. oryzae* NCIM 1299** que podrá utilizarse en ensayos posteriores.

En la cinética fúngica sobre EU puede utilizarse el **Modelo de Primer Orden**, siendo más sencillo de manipular matemáticamente que el Modelo Logístico.

Resultados obtenidos podrán **aplicarse en fermentación en biorreactor** escala de banco.

# Muchas Gracias!!!