



# **BIOPROCESAMIENTO DE ORUJO DE UVA PARA LA RECUPERACIÓN DE POLIFENOLES Y PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FÚNGICAS**

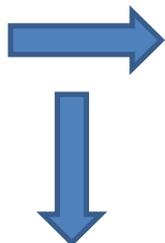
María Rocío Meini  
Diana Romanini

**IPROBYQ-CONICET-UNR**

*III Jornadas Internacionales de Investigación, Ciencia y Universidad y las XII  
Jornadas Institucionales de Investigación de la Universidad Juan Agustín Maza.*

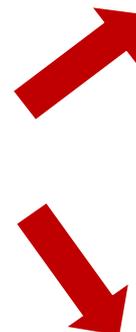
**2020**

# Introducción



**ORUJO DE UVA**

Polifenoles



**Antioxidantes**

**Productos de alto valor**

**Contaminante**

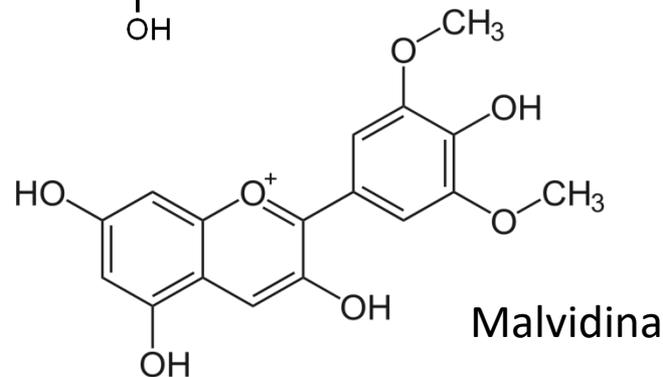
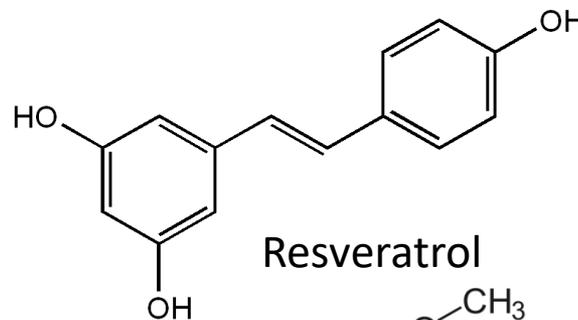
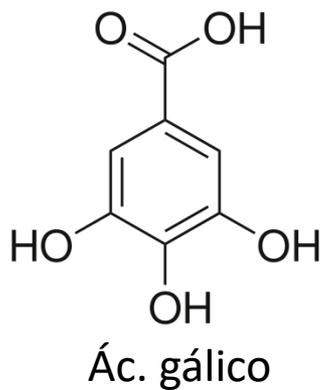
**Problema de gestión de residuos**

# Introducción



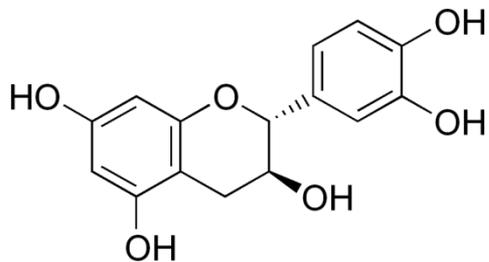
## Polifenoles

- Ác. Fenólicos
- Estilbenos
- Lignanos
- Flavonoides



- Antocianinas
- Flavonoles
- Flavanoles

- Monómeros
- Taninos
  - Hidrolizables
  - Condensados-Proantocianidinas

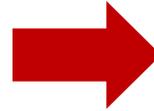


Catequina



# Introducción

## Extracción de polifenoles a partir de orujo de uva



### *¿Qué se busca?*

- ✓ Maximizar el rendimiento de recuperación de polifenoles totales y de la actividad antioxidante
- ✓ Composición. Enriquecer la muestra en determinados compuestos de interés.
- ✓ Minimizar el impacto ambiental

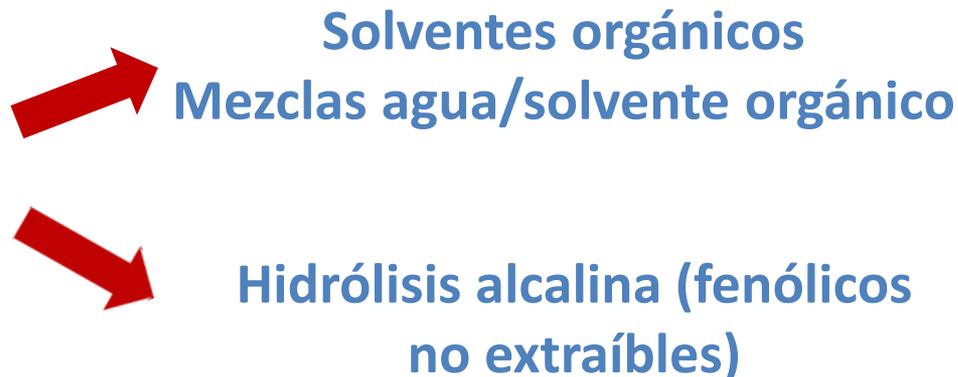


# Introducción

## Extracción de polifenoles a partir de orujo de uva

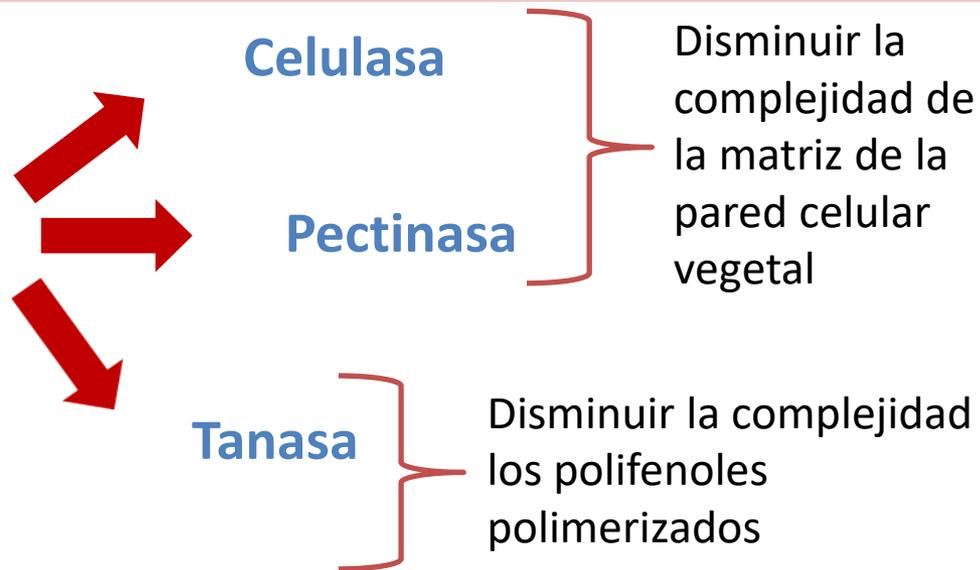
¿Cómo?

✓ Extracción sólido-líquido



Cabezudo I. *et al*(2020) Soybean (*Glycine max*) hull valorization through the extraction of polyphenols by green alternative methods. **Food Chemistry**

✓ Extracciones mediadas por enzimas hidrolíticas

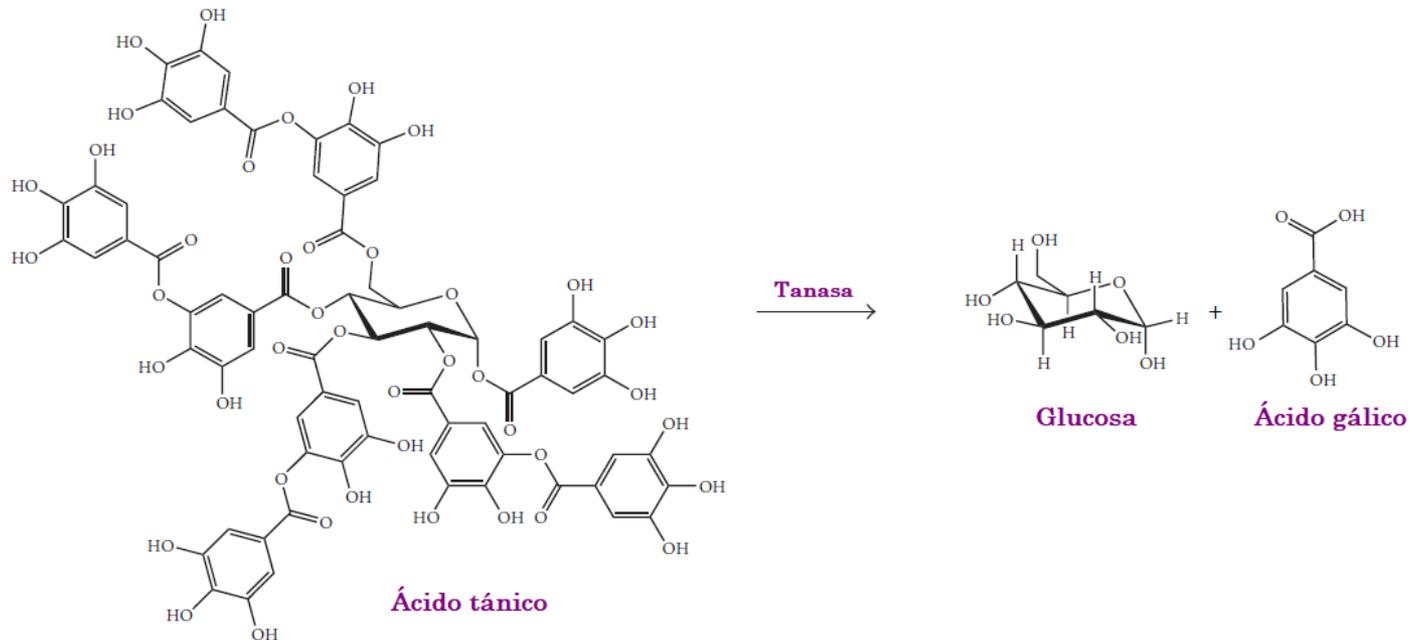




# Parte II-Introducción

## Enzima Tanasa (EC 3.1.1.20)

- Cataliza la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los taninos hidrolizables y ésteres de ácido gálico.



- Está presente en un grupo diverso de microorganismos, incluyendo bacterias del rumen, levaduras y hongos filamentosos



# Parte I-Materiales y métodos



- ✓ Congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- ✓ Secado en estufa a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta humedad menor a 6 %
- ✓ Molido hasta obtener un tamaño de partícula entre 0.25 – 2.38 mm





# Parte I-Materiales y métodos

## Optimización de la extracción enzimática de polifenoles mediante la metodología de superficie de respuesta (*Syrah*)

Cribado—> 6 factores, 16 experimentos

pH, Temperatura, tiempo de incubación, pectinasa, celulasa, tanasa

	U de enzima/ g of GP			t (h)
	Pectinasa	Celulasa	Tanasa	
(Fernández et al., 2015)	190	1500	750	3
(Chamorro et al., 2012)	6.75-13.5	158-315	2000-4000	24
Rango para el cribado	0-100	0-100	0-100	2-6

Enzima	Valores óptimos reportados	
	T (°C)	pH
Pectinasa	50 °C	4.0
Celulasa	37 °C	5.0
Tanasa	40 °C	5.5
Rango para el cribado	25-45 °C	4-5.5

Meini M.R.; Cabezudo I.; Boschetti C.; Romanini D.(2019) *Recovery of Phenolic Antioxidants from Syrah Grape Pomace through the Optimization of an Enzymatic Extraction Process*. **Food Chemistry**

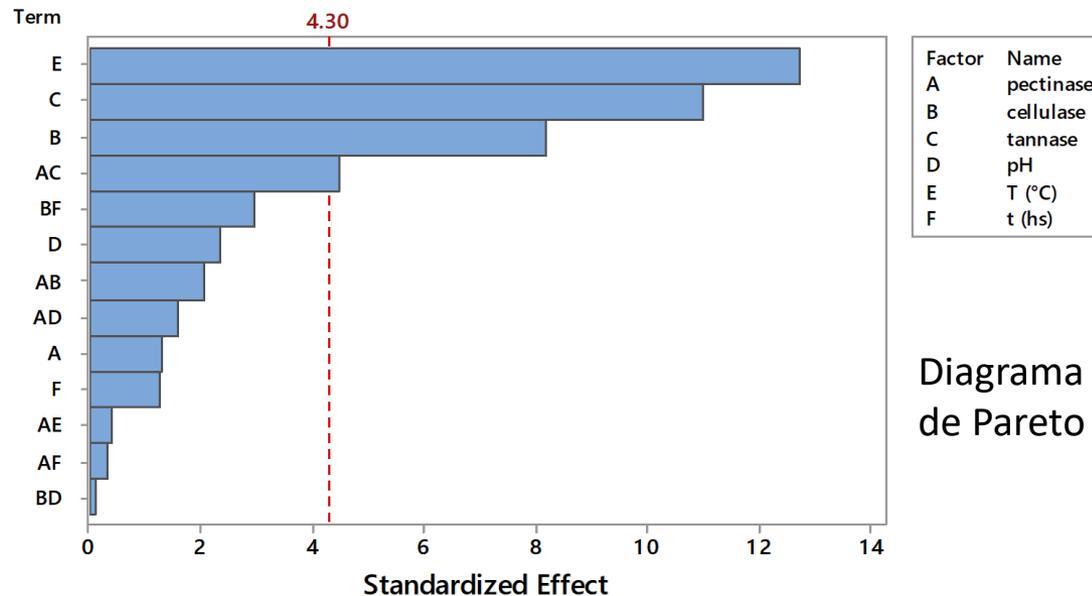


# Parte I- Resultados

-> Respuestas evaluadas:

**Fenoles Totales – Método Folin-Ciocalteu (TP)**

**Actividad Antioxidante - Método del ABTS (TEAC)**



✓ No hay efecto significativo de los factores pH, tiempo y pectinasa en los rangos evaluados.



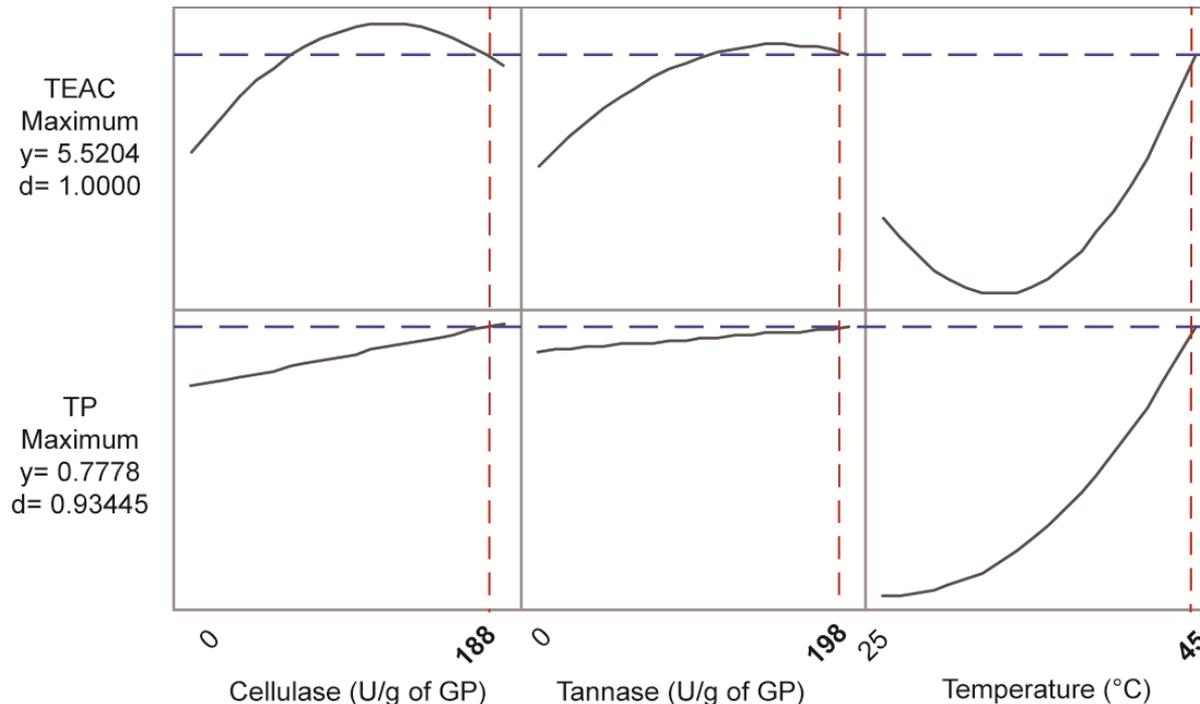
# Parte I- Resultados

## Optimización de la extracción enzimática de polifenoles

Diseño de superficie de respuesta: Box-Behken (15 experimentos)

Factores:

Celulasa (0-200 U), tanasa (0-200 U), temperatura (25-45 °C).





# Parte I- Resultados

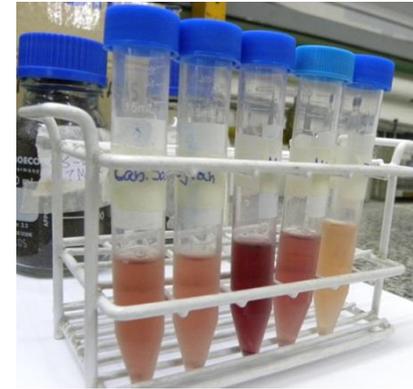
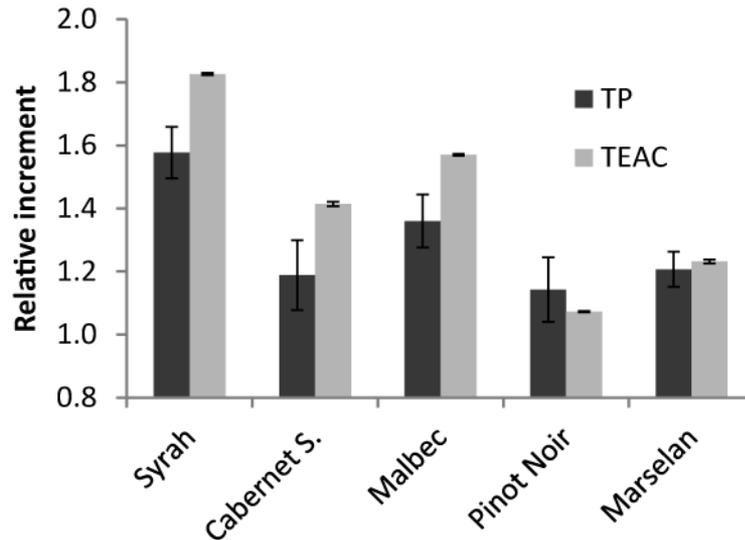
## Optimización de la extracción enzimática de polifenoles

- ✓ Condiciones óptimas para **maximizar** el rendimiento de obtención de **fenoles totales** y **actividad antioxidante**.

Respuesta maximizada	Factores			Fenoles Totales (FT) (g GAE / 100 g of GP)		Actividad antioxidante (TEAC) (TE mmol / 100 g of GP)	
	Celulasa (U / g of GP)	Tanasa (U / g of GP)	T (°C)	Predicho	Experimental	Predicho	Experimental
FT and TEAC	188	198	45	0.78	0.81 ± 0.04	5.52	5.58 ± 0.05



# Resultados



✓ Las mismas condiciones optimizadas pueden aplicarse a otras variedades de orujo, obteniendo aumentos en los rendimientos de extracción:

✓ polifenoles → 10-60 %

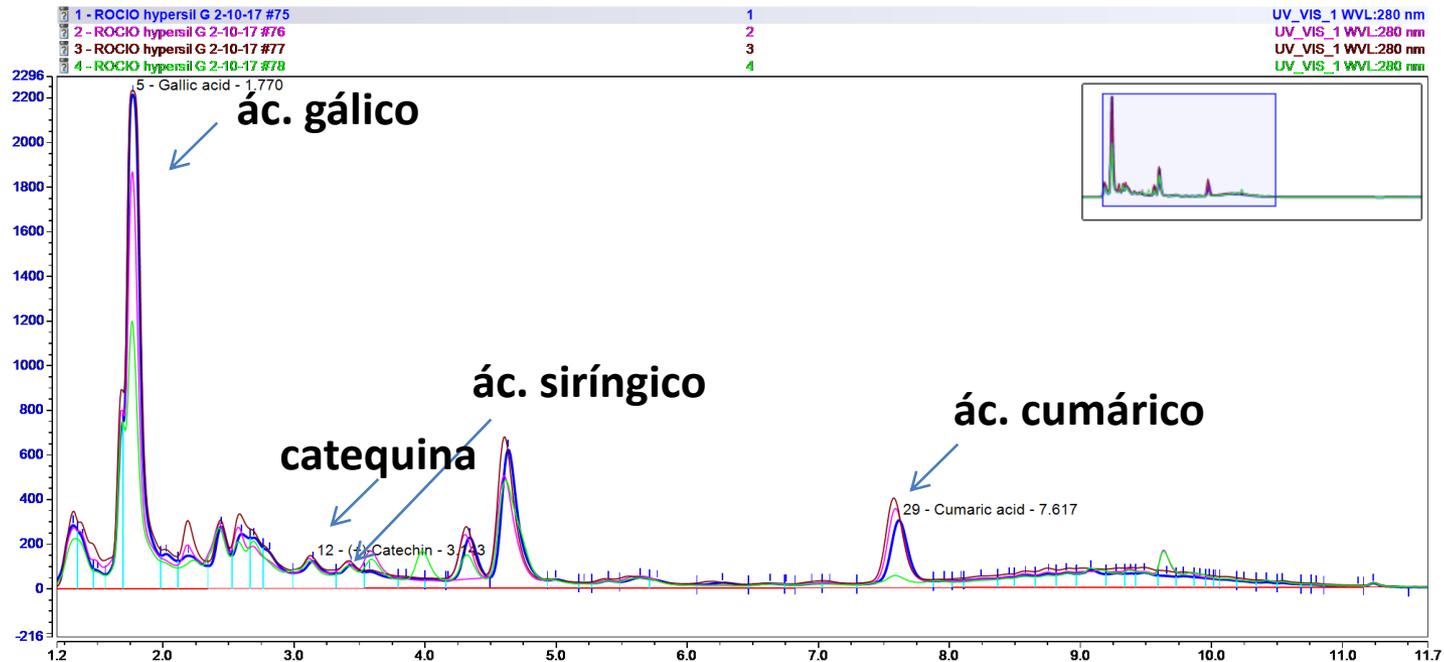
✓ actividad antioxidante → 10- 80 %

Meini M.R.; Cabezudo I.; Boschetti C.; Romanini D.(2019) *Recovery of Phenolic Antioxidants from Syrah Grape Pomace through the Optimization of an Enzymatic Extraction Process*. Food Chemistry



# Resultados

## Caracterización de los extractos por HPLC-DAD



**Columna:** Hypersil Gold C18 3  $\mu$ m; 2.1 mm; 100 mm

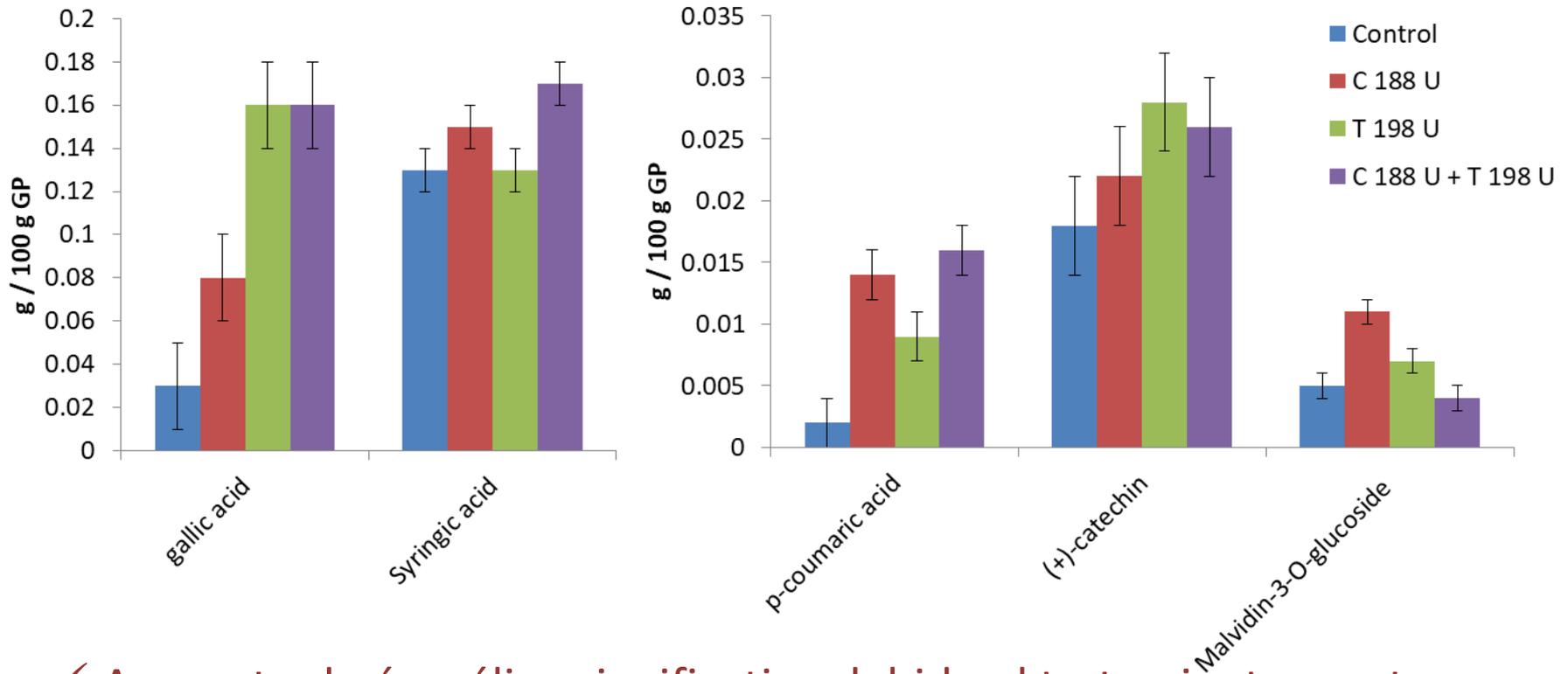
**Eluente A:** Agua, ác. acético 0,5 %

**Eluente B:** Acetonitrilo



# Parte I- Resultados

## Caracterización de los extractos por HPLC-DAD



- ✓ Aumento de ác. gálico significativo debido al tratamiento con tanasa.
- ✓ Aumento de ác. cumárico por acción de tanasa y de celulasa.
- ✓ Aumento significativo de malvidin-3-O-glucoside debido al tratamiento con celulasa.



# Parte I- Conclusiones

---

- ✓ Se obtuvieron las condiciones óptimas para el tratamiento de orujo de uva con las enzimas tanasa y celulasa:

↑ Fenoles  
totales

↑ Actividad  
antioxidante

↓ Cantidad  
de enzima

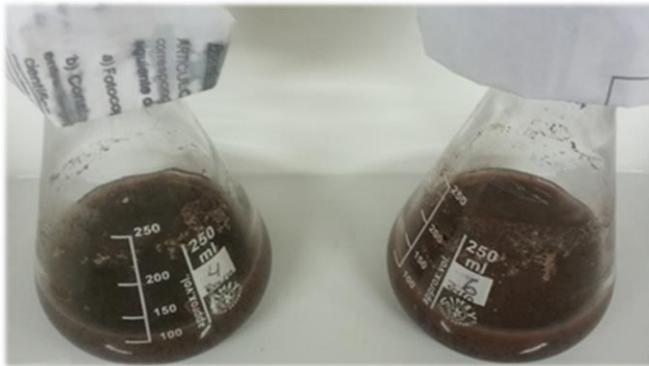
↓ Tiempo de  
incubación

- ✓ Pueden obtenerse extractos con enriquecimiento selectivo respecto a ciertos polifenoles
- ✓ El método es aplicable a distintas variedades de orujo.



## Parte II

- ✓ **Hipótesis de trabajo:** *“La fermentación en cultivo sumergido (FSM) y estado sólido (FES) de hongos filamentosos sobre el orujo de uva permitiría mejorar el rendimiento de extracción acuosa de polifenoles a través de la producción de enzimas hidrolasas in situ.”*





# Parte II-Introducción

## Empleo de hongos filamentosos para valorización de residuos



Bioresource Technology

Volume 298, February 2020, 122551



Journal of the  
Science of  
Food and Agriculture



Valorization of palm biomass wastes for biodiesel feedstock and clean solid biofuel through non-sterile repeated solid-state fermentation

Rawitsara Intasit <sup>a</sup>, Benjamas Cheirsilp <sup>a</sup>  , Yasmi Louhasakul <sup>b</sup>, Piyarat Boonsawang <sup>a</sup>, Sumate Chairapat <sup>c</sup>, Jarucha Yeesang <sup>d</sup>

Research Article | Published: 03 February 2020

Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions

Triantafyllos Roukas  & Parthena Kotzekidou

*Environmental Science and Pollution Research* 27, 13105–13113(2020) | [Cite this article](#)

261 Accesses | 1 Altmetric | [Metrics](#)

Research Article

Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation

Felisbela Oliveira, Cláudia Moreira, José Manuel Salgado, Luís Abrunhosa, Armando Venâncio, Isabel Belo 

First published: 25 November 2015 | <https://doi.org/10.1002/jsfa.7544> | Citations: 17



Journal of Biotechnology

Volume 231, 10 August 2016, Pages 55-64



Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus*

Md Ariful Haque <sup>a</sup>, Vasiliki Kachrimanidou <sup>b</sup>, Apostolis Koutinas <sup>b</sup>, Carol Sze Ki Lin <sup>a</sup>  

[Show more](#) 



## Parte II-Introducción

---

- ✓ Evaluar el efecto de la fermentación del orujo de uva mediada por hongos de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, sobre el rendimiento de extracción de polifenoles y de actividad antioxidantes.
- ✓ Evaluar la producción de enzimas en el medio extracelular que podrían favorecer la liberación de polifenoles: celulasa, pectinasa, **tanasa**.



# Parte II-Introducción

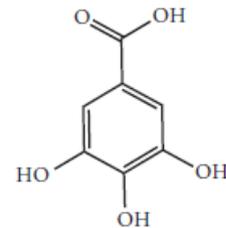
✓ Enzima Tanasa (EC 3.1.1.20)

## Aplicaciones

Agente clarificante



Producción de ácido gálico



Síntesis de trimetoprima

Síntesis de pirogalol

Síntesis de propilgalato



**Alto costo**

1 kg Tanasa Kikkoman  
500 U/g  
U\$S 250



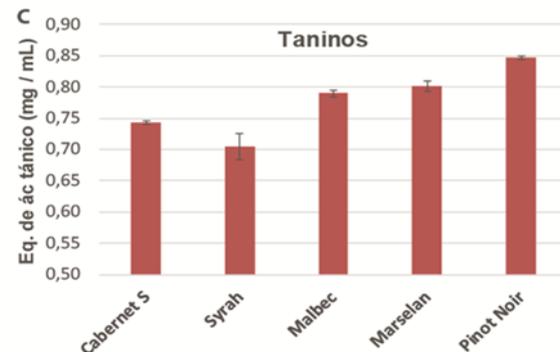
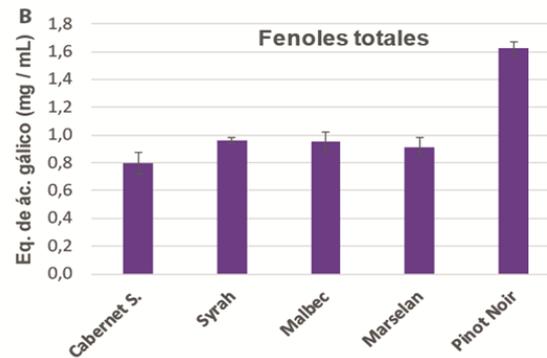
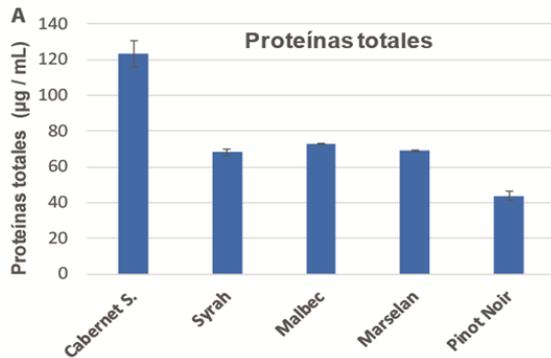
## Parte II-Introducción

- ✓ **Producción de tanasa en cultivos sumergidos de *A. niger***
- **Condiciones óptimas reportadas**
  - **Inductor: Ác. Tánico 1-2%; 10%**
  - Temperatura: 30°C-36°C
  - pH: 5.5
  - Agitación 150 rpm / ó Medio Sólido 65-70 % humedad
  - Tiempo de incubación: 36-96hs
- **Alternativa de inducción: fuentes naturales de taninos**



## Parte II-Resultados

### ✓ Producción de tanasa en cultivos sumergidos de *A. niger* empleando orujo de uva como inductor



✓ Para alcanzar una concentración de 0.25 % taninos → 8.8 g/100 ml

Se probó esta relación en cultivos (120 hs) → se observó crecimiento pero no se detectó actividad tanasa

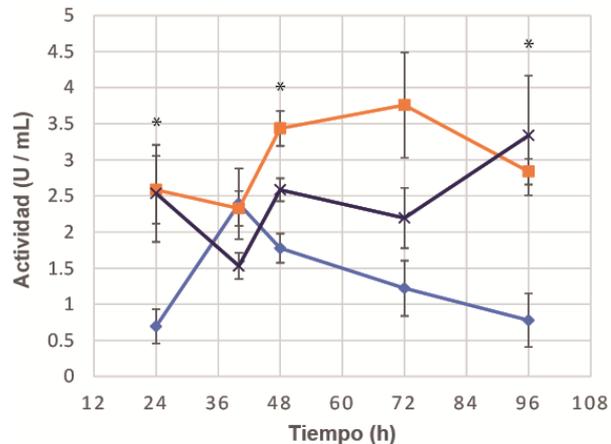
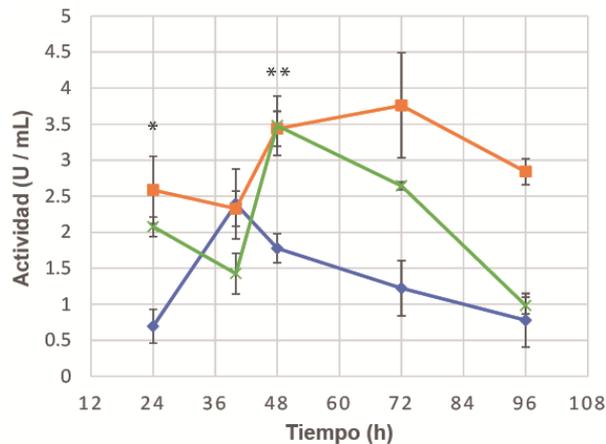
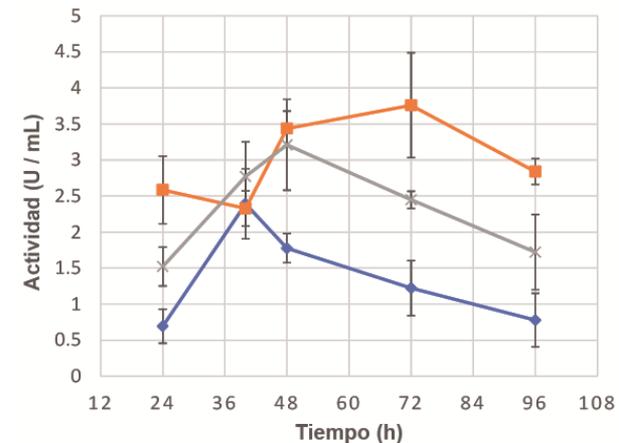
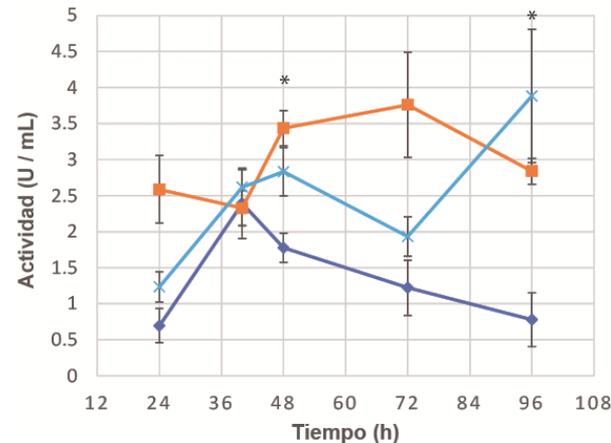
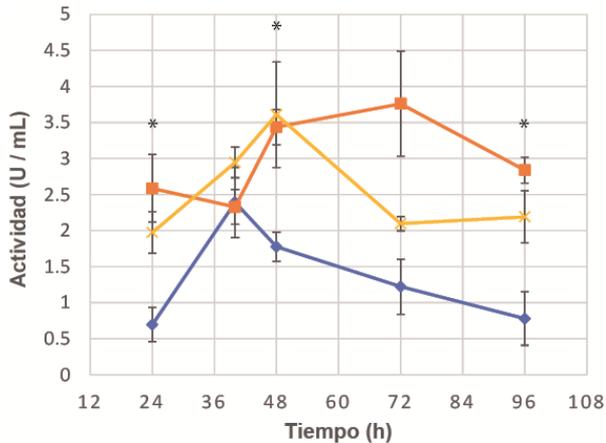
✓ Se decidió probar si el OU puede emplearse en forma complementaria al ácido tánico

Se realizaron cultivos con la relación 8.8 g/100 ml de OU + 4 % ác. tánico.



# Parte II-Resultados

✓ Producción de tanasa en cultivos sumergidos de *A. niger* empleando orujo de uva como inductor



- 4 % AT
- 6 % AT
- Syrah + 4 % AT
- Malbec + 4 % AT
- Cabernet S. + 4 % AT
- Marselan + 4 % AT
- Pinot Noir + 4 % AT



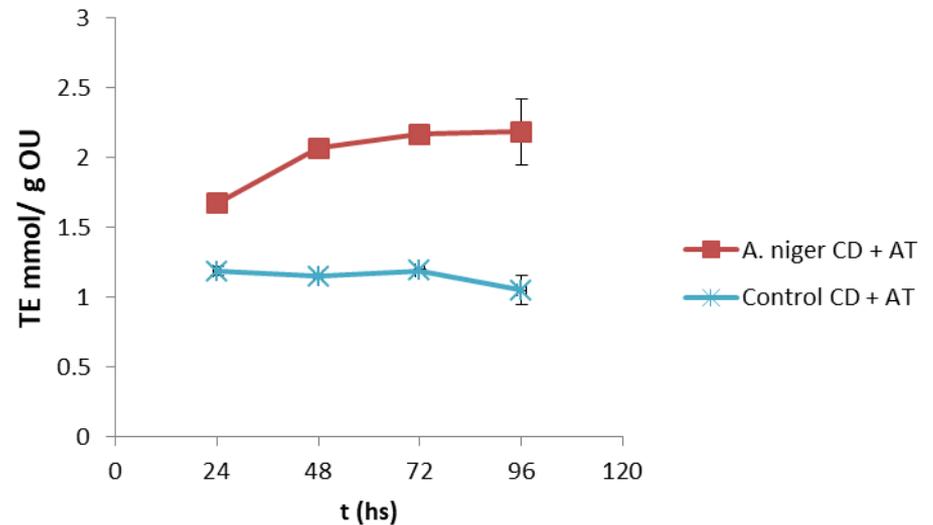
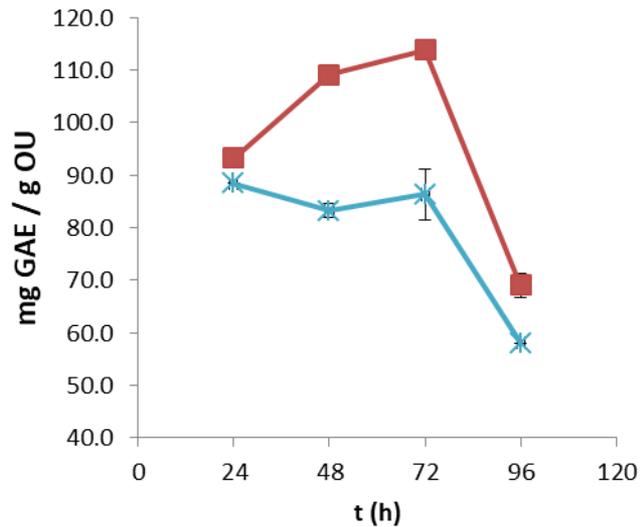
## Parte II-Conclusiones

- ✓ **Producción de tanasa en cultivos sumergidos de *A. niger* empleando orujo de uva como inductor**
  - ✓ *El OU por sí solo no es capaz de inducir la producción de enzima tanasa*
  - ✓ *El empleo de OU combinado con ácido tánico da lugar a un efecto sinérgico en la inducción de la enzima, que permite reducir la concentración de ácido tánico manteniendo el nivel de producción óptimo.*



## Parte II-Resultados

- ✓ Liberación de polifenoles en los cultivos sumergidos de *A. niger* que producen enzima tanasa

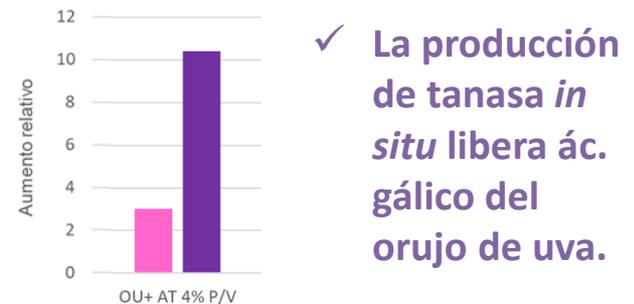
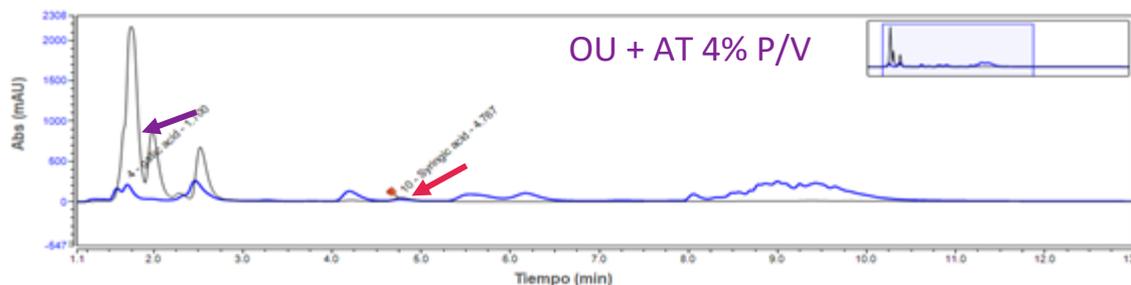
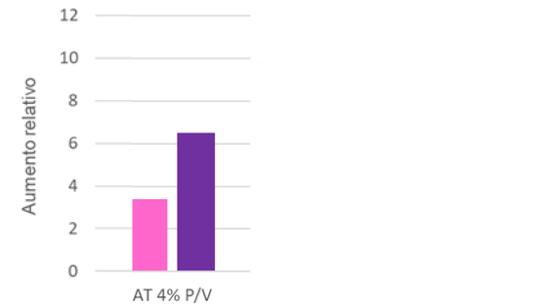
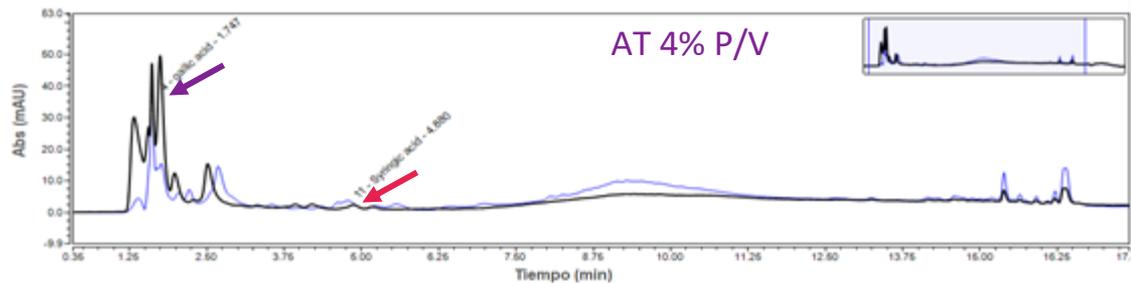
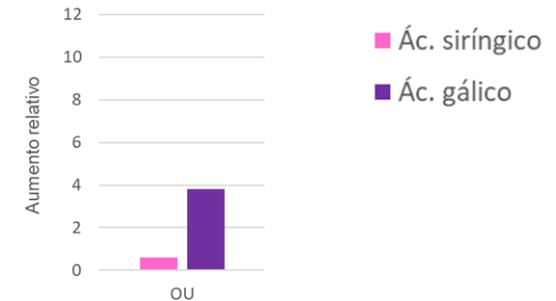
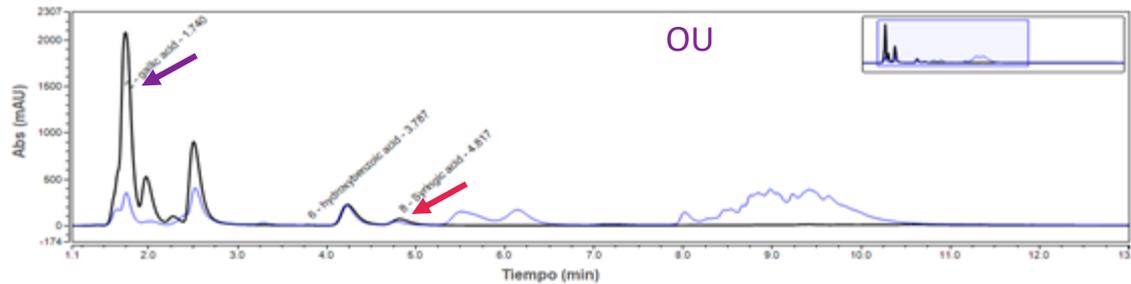


- ✓ Aumento en la cantidad de fenoles totales y actividad antioxidante en el medio entre las 48 y las 72 h



# Parte II-Resultados

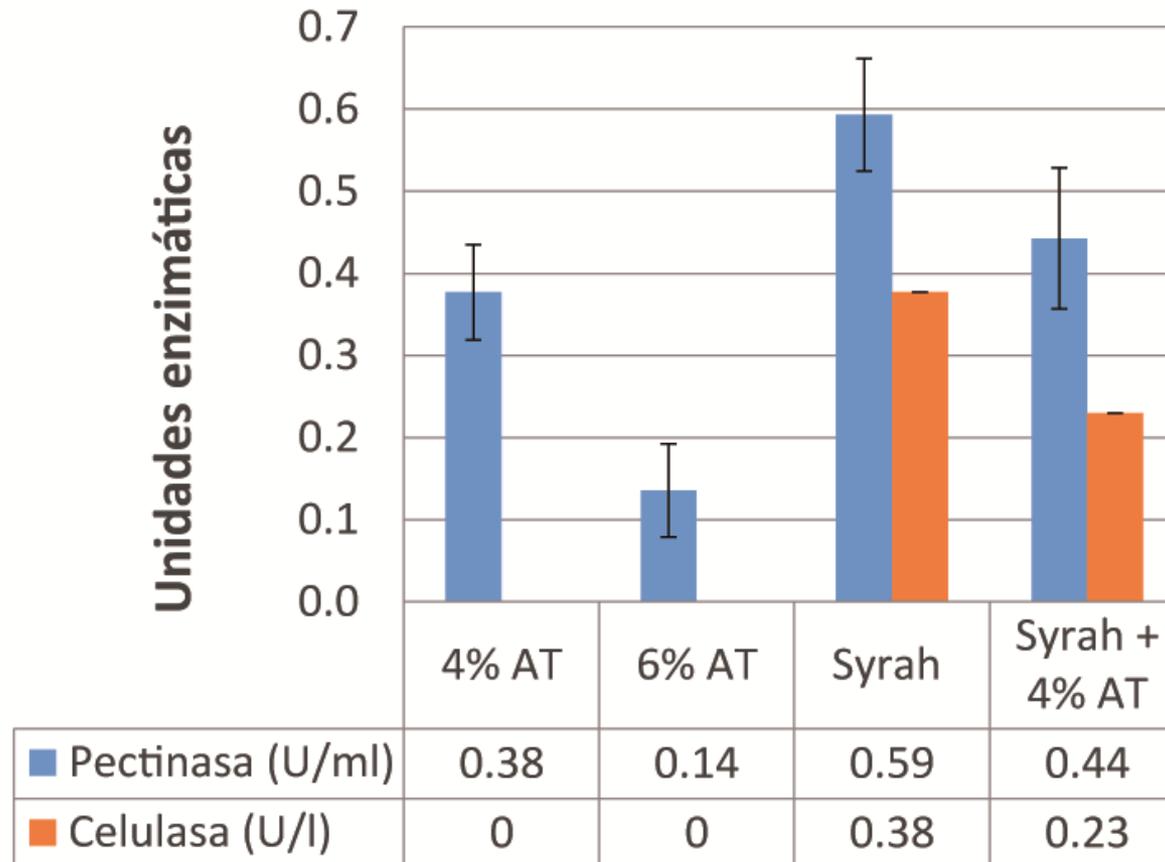
✓ Liberación de polifenoles en los cultivos sumergidos de *A. niger* que producen enzima tanasa





## Parte II-Resultados

### ✓ Producción de otras enzimas de interés industrial

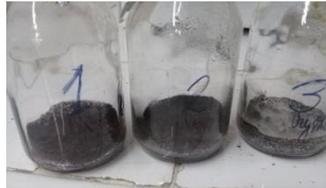
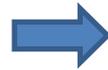
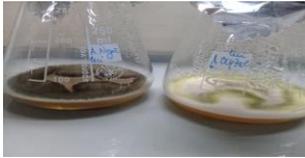


Meini, M.R., Ricardi, L. L., & Romanini, D. (2019). *Novel Routes for Valorisation of Grape Pomace Through the Production of Bioactives by Aspergillus niger*. **Waste and Biomass Valorization**.



## Parte II- Resultados

### ✓ Fermentación en estado sólido – *A. niger* y *A. oryzae*



- Propagación de las cepas
- Preparación del medio de cultivo
  - x g de OU
  - y ml de Medio Czapek Dox + Ác. Tánico 2 % w/v

Crecimiento del cultivo durante 3 días

Agregado de un volumen x de agua y agitación durante un tiempo y temperatura definidos

Filtración / Centrifugación



**Tesina Cecilia Galetto**  
**Co-directores: MR Meini**  
**e I. Cabezudo**

#### **Extractos**

- Polifenoles Totales
- Actividad Antioxidante
- Actividades Enzimáticas



## Parte II-Conclusiones

- ✓ Un proceso diseñado para producir tanasa empleando un residuo rico en taninos, puede a su vez ser utilizado para la producción de ác. gálico y de otras enzimas

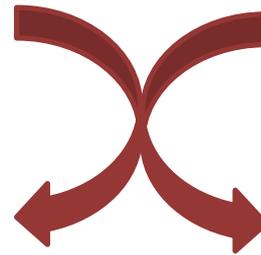


Orujo de uva



*A. niger*

Ác. gálico  
Ác. siríngico



Tanasa  
Pectinase  
Celulasa



# Obtención de bioproductos a partir de descartes de zanahoria



Lic. Laureana Guerra  
Dra. Adriana Clementz



# Aislamiento de nuevas cepas fúngicas autóctonas productoras de enzimas de interés industrial



Semillas de algodón, barbecho de soja

## Desechos Agroindustriales



Orujo de uva, cascarilla de soja, afrechillo de trigo

## Bioprospección

Zona Alcorta, Santa Fe



- Nuevas cepas fúngicas



## Revalorización

- Enzimas
- Pigmentos
- Antibióticos
- Otros metabolitos



**Lic. Natasha Melnichuk**  
**Dra. Diana Romanini**



**Gracias!**

**Laboratorio de  
Bioprocesos  
IPROBYQ**

Diana Romanini

Adriana L. Clementz

María Rocío Meini

Natasha Melnichuk

Joel Aguilera

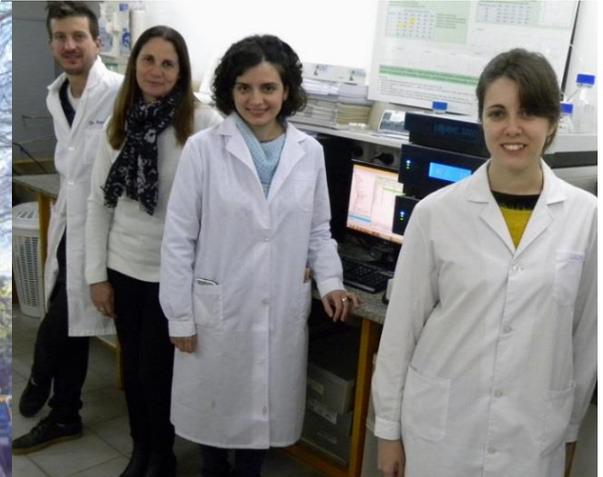
Laureana Guerra

Cecilia S. Galetto

Carlos E. Boschetti

Ignacio Cabezudo

Laura L. Ricardi



I P R O B Y Q