

EMPLEO DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA SIDRERA PARA LA PRODUCCIÓN DE LEVADURAS

Josefina M. Fontanini¹; Andrea C. Origone^{1,2}; Carmen R. Maturano¹; Marcela P. Sangorrín¹;
Christian A. Lopes^{1,2}; M. Eugenia Rodríguez^{1,3}

1- PROBIEN, CONICET-UNCo, Neuquén, Neuquén.

2- Facultad de Ciencias Agrarias, UNCo, Cinco Saltos, Río Negro.

3- Facultad de Ciencias Médicas, UNCo, Cipolletti, Río Negro.

Email: jose.fontanini@gmail.com

RESUMEN

La industria sidrera regional genera grandes cantidades de residuos, principalmente bagazo y borra, causando problemas ambientales y de salud. En este trabajo se investigó el potencial uso de estos residuos como medios de cultivo para *S. uvarum*, tras la optimización de pre tratamientos específicos con el fin de liberar mayores nutrientes al medio. Los pretratamientos con ácido fosfórico e hidróxido de amonio en bagazo incrementaron los azúcares reductores. Los resultados demostraron que el medio formulado con pretratamiento ácido presentó mayor crecimiento de la levadura. Seleccionado este tratamiento, se escaló la producción de biomasa en un reactor tipo *batch*, utilizando bagazo como fuente de carbono y borra autolisada como fuente de nitrógeno. Estos resultados sugieren una estrategia prometedora para reutilizar los residuos de la industria sidrera y reducir sus impactos ambientales.

Palabras claves: *Saccharomyces*; bagazo de manzana; pretratamiento ácido; pretratamiento alcalino; reactor Batch.

1. Introducción

Argentina es uno de los principales productores de manzanas y peras, con una destacada concentración en las provincias patagónicas de Río Negro y Neuquén. La región patagónica alberga el 75% de la producción nacional de sidra, siendo una industria de gran impacto económico regional. Sin embargo, los residuos generados durante el procesamiento de frutas representan un desafío debido a su alto contenido de humedad y materia orgánica (Parmar y Rupasinghe, 2013). La transformación de estos residuos en productos de valor agregado podría ser una solución a este problema.

El bagazo de manzana (BM -hollejo, restos de pulpa, cáscara, semillas, entre otros-) contiene una cantidad significativa de carbohidratos, principalmente glucosa y fructosa, que son metabolizados por levaduras del género *Saccharomyces*. Por otro lado, la borra de sidra (BS-células, pulpa y partículas grandes-) proporciona nutrientes importantes después de la autólisis (Mirzaeia y col., 2015; Pérez-Bibbins y col, 2015).

La composición del bagazo de manzana es similar a la de plantas leñosas, con lignina, celulosa y hemicelulosa que forman una

estructura compleja (Givens y col., 1987). Los pretratamientos físico-químicos, como el uso de solventes ácidos (Ucuncu y col., 2013, Magyar y col., 2016, Luo y Xu 2019) o hidróxidos (Jurgens y col., 2012; Guilherme y col., 2015, Hijosa-Valsero y col., 2017), pueden alterar esta estructura y facilitar la liberación de azúcares simples.

Existen pocos estudios sobre la aplicación de residuos como sustrato para el desarrollo de microorganismos. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el desarrollo de biomasa de una levadura criotolerante, *Saccharomyces uvarum*, aislada de sidra patagónica (Gonzalez Flores y col., 2019), a escala de reactor empleando como sustrato la combinación de bagazo de manzana y borra pretratados como principales fuentes de azúcares y nitrógeno.

2. Materiales y métodos

2.1 Residuos pretratados de la industria sidrera

Los residuos utilizados fueron bagazo de manzana (BM) y borra sidrera (BS) proporcionados por la Empresa CCU de Allen, Río Negro. Ambos, fueron secados a 60°C durante 48 horas. Se aplicaron métodos de

pretratamiento ácido (PA) y alcalino (PH) al BM, utilizando ácido fosfórico (121°C, 40 min) e hidróxido de amonio (20°C, 120 min) respectivamente. Para la BS, se realizó un proceso de autólisis con NaOH a pH 5,3 a 60°C, en agitación, durante 24 horas. Estos métodos fueron optimizados previamente en el laboratorio (Fontanini y col., 2021; Fontanini y col., 2022).

2.2 Microorganismos

Se utilizó una la cepa de *Saccharomyces uvarum*, levadura aislada de sidra y caracterizada en nuestro laboratorio (Gonzalez Flores y col., 2019) perteneciente a la colección de cultivos del laboratorio (*North Patagonian Culture Collection*, NPCC).

2.3 Caracterización de bagazo de manzana

Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica del BM con PA, PH y sin tratamiento como control, realizando las pruebas por duplicado. En la fracción líquida, se determinó el contenido de carbohidratos como glucosa, fructosa, arabinosa, xilosa y galactosa mediante HPLC. También se analizó mediante HPLC la presencia de ácidos acético, fórmico y levulínico, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) como potenciales compuestos inhibitorios de crecimiento. En la fracción sólida, se analizaron los componentes de la red lignocelulósica: lignina, celulosa y hemicelulosa, para ello se separaron los extractivos utilizando disolventes polares y se determinó celulosa, lignina, holocelulosa y hemicelulosa según métodos estándares.

2.4 Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces uvarum*

Se evaluó el crecimiento de la cepa *S. uvarum* a escala de laboratorio, con la formulación de dos medios de cultivo: BM con PA (BPA) y BM con PH (BPH), suplementados con fosfato de amonio. Los medios se incubaron en Erlenmeyer con agitación a 20°C. El seguimiento se realizó por espectrofotometría a 640 nm y se modelaron las curvas de crecimiento para obtener parámetros de crecimiento estimados, utilizando la ecuación de Gompertz reparametrizada mediante el uso del paquete estadístico Statistica 8.0.

2.5 Propagación de *S. uvarum* en biorreactor

Se escaló la producción de *S. uvarum* en un biorreactor de 17 L, utilizando un medio de cultivo previamente optimizado compuesto por 20% de BPA y 80% de borra autolisada, esterilizado previamente (Fontanini y col., 2022).

El volumen final de medio de cultivo fue de 7 L con una concentración inicial de levaduras de 5.10^6 cel/mL. Las condiciones de producción incluyeron una temperatura de 20 °C, aireación a 1 vvm y agitación a 300-400 rpm, manteniendo un mínimo del 20% de oxígeno disuelto. Se evaluó el crecimiento cada dos horas midiendo la densidad óptica a 640 nm y analizando las curvas de crecimiento para obtener parámetros específicos.

3. Resultados

3.1 Caracterización de los residuos

Se caracterizaron los residuos lignocelulósicos de la sidrera sin tratamiento. Se observó un aumento significativo en los niveles de glucosa y fructosa de BPA y BPH en comparación con el no tratado, lo que podría enriquecer los medios de cultivo para las levaduras (Tabla 1). La fructosa se encontró como azúcar mayoritario tanto en el BM sin tratamiento como en el pre-tratado, lo cual podría favorecer el desarrollo de la cepa bajo estudio, por su capacidad fructofílica (Gonzalez Flores y col, 2019). Además, el BPA promovió la liberación de otros azúcares, como xilosa, galactosa y arabinosa, siendo la galactosa un azúcar metabolizable por la levadura bajo estudio. Se observó una reducción en los componentes estructurales, lignina, celulosa y hemicelulosa, en los tratamientos siendo consistente con la liberación de azúcares. Se detectaron compuestos inhibidores en los tratamientos químicos, pero en niveles considerados como no inhibitorios para el crecimiento microbiano (Tabla 1). Estos resultados sugieren el potencial uso de estos residuos tratados como medios de cultivo.

3.2 Evaluación del crecimiento de *S. uvarum* en residuos de sidrera a escala de laboratorio

Se observó que la cepa fue capaz de crecer en ambos medios, aunque el crecimiento fue más favorable en el medio BPA (Figura 1A) reflejado en mayores valores de velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}=0,19\text{h}^{-1}$) y de crecimiento máximo alcanzado ($A=4,63$) respectivamente, en comparación con el medio BPH ($\mu_{\text{máx}}= 0,14 \text{ h}^{-1}$ y $A = 4.01$). Los tiempos de fase de latencia fueron similares (Figura 1A).

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de bagazo de manzana sin tratar (BM), bagazo con pretratamiento ácido (BPA) y bagazo con pretratamiento alcalino (BPH).

Caracterización	BM	BPA	BPH
Componentes estructurales			
Lignina	9±1,23	8±0,93	7,5±0,74
Celulosa	17±0,60	11±0,83	13,4±0,43
Hemicelulosa	7±1,06	5±0,70	6,4±0,52
Carbohidratos			
Glucosa	7,91±0,33	14,02±0,63	13,53±0,42
Fructosa	17,08±0,07	26,02±0,08	28,89±0,97
Sacarosa	ND	ND	ND
Xilosa	0,17±0,01	0,99±0,30	ND
Galactosa	ND	0,87±0,22	ND
Arabinosa	ND	2,95±0,06	ND
Compuestos inhibitorios			
Polifenoles totales	2,75±0,06	6,22±0,11	2,1±0,08
Ácido fórmico	ND	ND	0,71±0,08
Ácido acético	0,13±0,03	1,73±0,10	0,59±0,03
Ácido levulínico	1,04±0,03	ND	ND
Hidroxi metil furfural	0,14±0,01	1,09±0,03	0,09±0,00
Furfural	0,004±0,00	ND	ND

El contenido de cada compuesto está expresado en g/100g de bagazo de manzana seco. ND: no se detectó

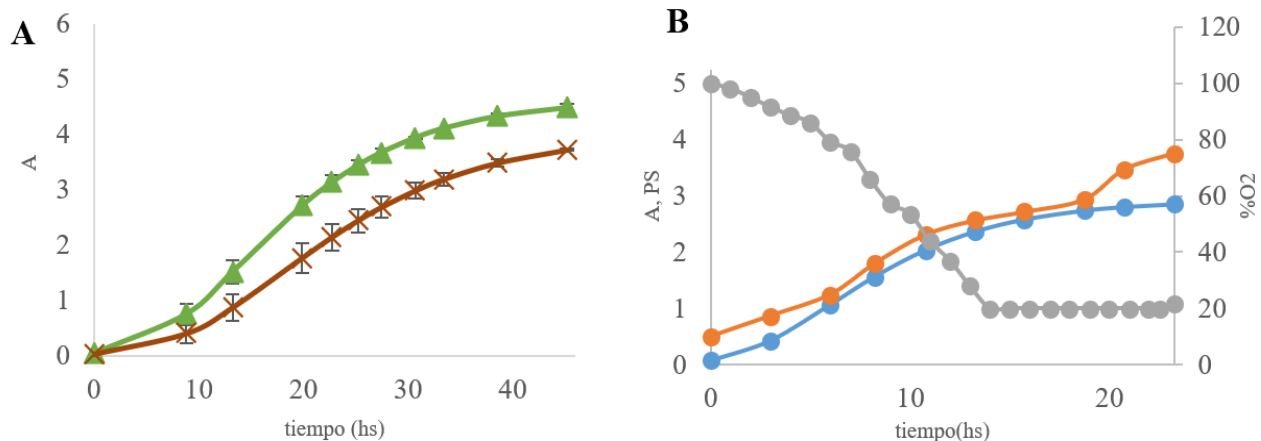


Figura 1. Crecimiento de *S. uvarum* NPCC 1420 en residuos de sidrera pretratados. Cinéticas de crecimiento de *S. uvarum*. **A:** Escala de laboratorio en medio de cultivo BPA (verde) y BPH (rojo). **B:** Propagación en biorreactor en medio PA suplementado con BS autolisada. Parámetros: A Crecimiento máximo (azul); PS, Peso seco (anaranjado) y %O₂ (gris).

Dado que el crecimiento de *S. uvarum* fue mayor en el medio de cultivo BPA con respecto al BPH se pudo inferir que los niveles encontrados de compuestos inhibitorios no influyeron en su desarrollo. Sin embargo, sería de interés evaluar en ensayos futuros el desarrollo de la levadura bajo concentraciones crecientes de estos

compuestos con el objetivo de caracterizar sus concentraciones inhibitorias.

3.3 Propagación de la levadura

Se evaluó la producción de biomasa a mayor escala utilizando el medio de cultivo formulado con ácido fosfórico (BPA), complementado con borra sidrera (BS) autolisada para mejorar su

valor nutricional. En el biorreactor de 17 L, se observó un crecimiento adecuado de la cepa, alcanzando la fase estacionaria después de 20 horas con un consumo gradual de oxígeno (Figura 1B). Se logró una producción de biomasa seca de 3,76 g/L, con un rendimiento de 0,24 g/g y una tasa de crecimiento de 0,23 h⁻¹, superando los parámetros obtenidos a escala de laboratorio. La adición de BS autolisada pudo haber contribuido al aumento en la tasa de crecimiento al proporcionar nutrientes adicionales. Estudios anteriores han demostrado la presencia de minerales esenciales (Cu, Fe, Zn, Mn, Al, Ca y Mg) en residuos similares (Bustos y col., 2004; Pérez-Bibbins y col., 2015), lo que respalda su potencial como sustrato para el crecimiento microbiano.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos a partir del presente estudio permiten respaldar la eficacia de los tratamientos optimizados aplicados al BM, evidenciando un incremento significativo en los niveles de glucosa y fructosa en dicho residuo, con una correlativa reducción de los carbohidratos estructurales que conforman la red lignocelulósica. Adicionalmente, las condiciones de autólisis optimizadas en la BS resultaron en aumentos sustanciales en el contenido de nitrógeno y su incorporación en el medio de cultivo favoreció el desarrollo de la levadura incrementando los parámetros de crecimiento. Estos hallazgos destacan la importancia de la aplicación de estrategias de pretratamiento en residuos agroindustriales, que potencian su aplicación tecnológica, tal como la exitosa formulación de medios de cultivo económicos para la propagación de levaduras autóctonas de sidrera. A su vez, alientan a continuar con el estudio de aplicaciones en la valorización de estos sustratos para otros microorganismos. Nuestros trabajos futuros se enfocarán en la producción de biomasa en reactores, modificando las condiciones de trabajo con el fin de potenciar los rendimientos de biomasa con la consiguiente evaluación de su capacidad fermentativa.

5. Referencias

- Bustos G, Moldes AB, Cruz JM, Domínguez JM (2004) Formulation of low-cost fermentative media for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* using vinification lees as nutrients. *J Agric Food Chem*, 52, 801–808
- Fontanini JM, Origone AC, Gorordo F, Lopes C, Sangorrín MP, Rodríguez ME (2021) Bioethanol production: optimization of regional cider waste pre-treatment and selection of native *Saccharomyces Cerevisiae* strains. SAIB - SAMIGE Joint Meeting, 110
- Fontanini JM, Origone AC, Sangorrín MP, Rodríguez ME (2022) Use of cider waste for the formulation of an economic culture medium for the production of yeast biomass. XVII Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE, Córdoba, Argentina, 102
- Givens DI, Barber WP (1987) Nutritive value of apple pomace for ruminants, *Animal Feed Science and Technology* 16(4), 311-315.
- Gonzalez Flores M., Rodríguez M. E., Origone, AC., Oteiza JM., Querol A., Lopes, CA. (2019). *Saccharomyces uvarum* isolated from patagonian ciders shows excellent fermentative performance for low temperature cidermaking. *Food Research International*, 126, 108656.
- Guilherme AA, Dantas PVF, Santos ES, Fernandes FAN, Macedo GR (2015) Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. *Braz J Chem Eng* 32, 23–33.
- Hijosa-Valsero M, Paniagua-García AI, Díez-Antolínez R (2017) Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Jurgens G, Survase S, Berezina O (2012) Butanol production from lignocellulosics. *Biotechnol Lett* 34, 1415–1434
- Luo J y Xu Y. (2020). Comparison of biological and chemical pretreatment on coproduction of pectin and fermentable sugars from apple pomace. *Applied biochemistry and biotechnology*, 190, 129-137.
- Magyar M, da Costa Sousa L, Jin M, Sarks C, Balan V (2016) Conversion of apple pomace waste to ethanol at industrial relevant conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100,7349–7358
- Mirzaeia M, Mirdamadib S, Ehsanic MR, Aminlarid M, Hoseinie SE (2015) Characterization of yeast protein enzymatic hydrolysis and autolysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *J Food Biosciences Technol*, (5), 2, 19-30
- Parmar I, Rupasinghe HPV (2013) Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: enzymatic hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol*, 130, 613–620
- Pérez-Bibbins B, Torrado-Agrasar A, Salgado JM, Pinheiro R, Domínguez JM (2015) Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste Manag*, 40, 72–81
- Ucuncu C, Tari C, Demir H, Buyukkileci AO, Ozen B (2013) Diluted-acid hydrolysis of apple, orange, apricot and peach pomaces as potential candidates for bioethanol production. *J Biobased Mat Bioenergy*, 7, 1-14