

Producción de enzimas hidrolíticas por *Aspergillus awamori* sobre orujo de uva

C. Botella, I. de Ory, C. Webb, D. Cantero, A. Blandino

PPQ 2002-00358

**Departamento de Ingeniería Química,
Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio
Ambiente**

Universidad de Cádiz

Índice de Contenidos

1. INTRODUCCIÓN

- DEFINICIÓN DE SSF Y VENTAJAS
- NUEVAS APLICACIONES
- PRODUCCIÓN DE ENZIMAS
- SOPORTES SÓLIDOS

2. OBJETIVOS

3. METODOLOGÍA DE TRABAJO

- MICROORGANISMO
- SUSTRATO
- CONDICIONES DE FERMENTACIÓN
- CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

4. RESULTADOS

- COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ORUJO DE UVA Y DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTICULA
- PRODUCCIÓN DE ENZIMAS
- AZUCARES REDUCTORES Y PH
- COMPARACIÓN CON VALORES OBTENIDOS CON TRIGO

5. CONCLUSIONES

1. Introducción

Definición de SSF y ventajas

- **Fermentación en Estado Sólido (SSF):**
Crecimiento de microorganismos sobre soportes sólidos húmedos en ausencia de agua libre
- **Ventajas:**
 - Mayores rendimientos
 - Más fácil la recuperación de los productos
 - No se producen espumas
 - Volumen de reactor menor
 - El riesgo de contaminación se reduce dado los bajos niveles de humedad en el medio
 - Se pueden emplear como sustratos materias primas o residuos de bajo coste de industrias agrícolas o de alimentos
 - La biomasa agotada puede ser utilizada para la alimentación de animales de granja
 - Impacto ambiental menor: se reduce el volumen de los efluentes

1. Introducción: Nuevas Aplicaciones

- **Control Medioambiental:**
 - biorremediación
 - biodegradación de compuestos tóxicos
 - destoxificación de residuos agrícolas
 - las biotransformaciones de algunos cultivos o de sus residuos para la mejora de su calidad nutricional
 - pulpeado biológico
- **Obtención de productos de alto valor añadido:**
 - metabolitos secundarios
 - ácidos orgánicos
 - pesticidas
 - compuestos aromáticos
 - combustibles
 - enzimas

1. Introducción: Producción de enzimas

- El 75% enzimas usadas en industria son enzimas hidrolíticas
- Celulasas: industria textil, procesamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de alimentos, combustibles y productos químicos
- Xilanasas: industria del papel y en la preparación de alimentos y piensos
- Pectinasas: industria del vino y de zumos de frutas

1. Introducción: Soportes sólidos



1. Introducción

Soportes sólidos

- **SUSTRATOS NATURALES**

- fibras y paja de trigo
- maíz
- arroz
- bagazo de caña de azúcar y de remolacha
- residuos de banana
- residuos de patata
- té
- coco
- manzana
- cítricos
- harinas de trigo y maíz
- cáscaras de café y de arroz, alpechín, malta agotada, etc.

1. Introducción

Soportes sólidos



VINO



ORUJO: Semillas, hollejo y raspón

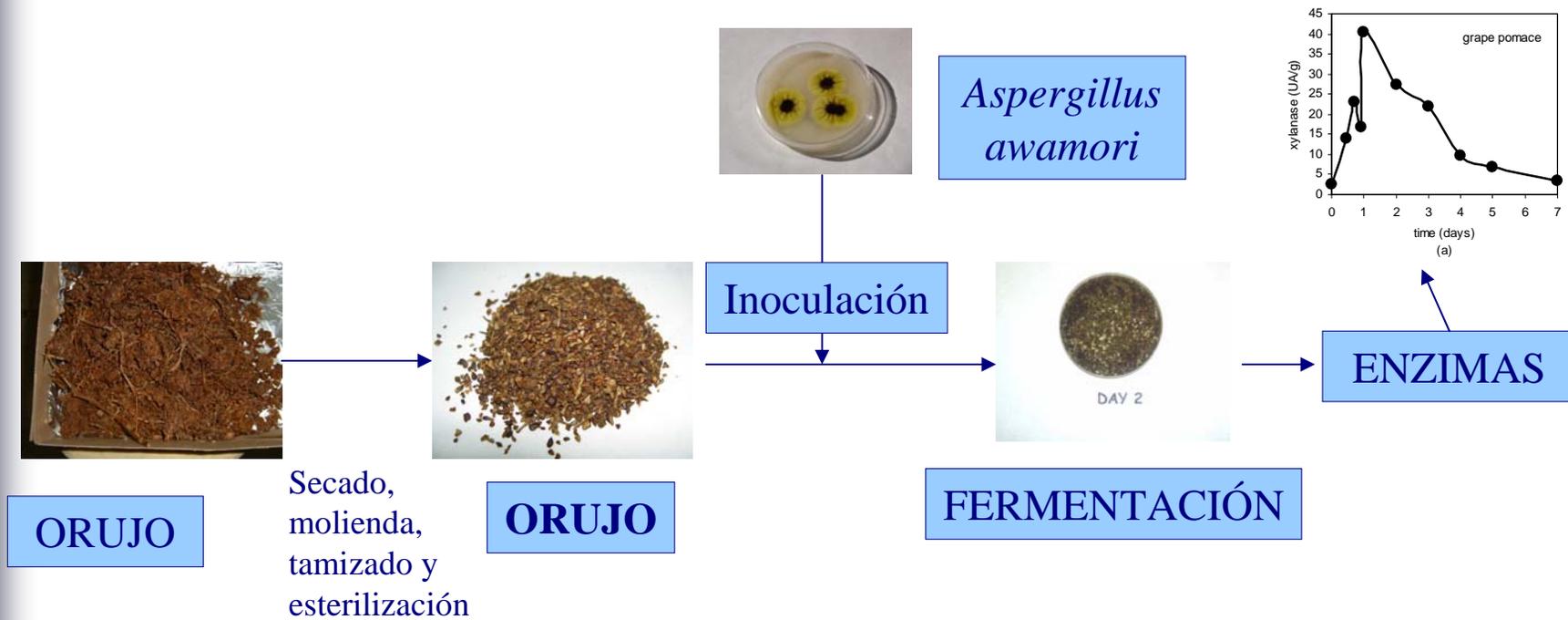
- Producción mundial de uva es 60 millones de toneladas anuales
- 68% uvas son empleadas en la producción de vino
- Residuo: Orujo de uva
- España produce 250 millones kg/ año de orujo

Alimentación de animales : bajo nivel nutricional
Obtención de alcoholes vínicos: no rentable
Acumulación en áreas al aire libre

NUEVOS USOS

Producción de enzimas

2. Objetivo: Aprovechamiento de un residuo agrario: ORUJO DE UVA



3. Metodología de Trabajo

• Microorganismo: *Aspergillus awamori* NRRL 3312



Cepa purificada

5 días 30°C



Tubo inclinado

5 días 30°C



Preinóculo en agar

Preparación del preinóculo

2. Metodología de trabajo

- **Sustrato**: Orujo de uva variedad *Palomino fino*, seco, molido y tamizado.



Orujo de uva *Palomino fino*



Secado,
molienda,
tamizado y
esterilización



Orujo preparado para la inoculación

Análisis Químico

↓
Humedad
Minerales
Glucosa
Nitrógeno
Proteínas
Fósforo

3. Metodología de trabajo

• Condiciones de la Fermentación

- Estático
- Placas petri con 10g de sólido
- Humedad del sólido 60%
- Temperatura 30°C
- Concentración de esporas 5×10^5 esporas/g
- Tiempo total de la fermentación 7 días



Orujo

10 g



Aspergillus awamori

5×10^5 esporas/g

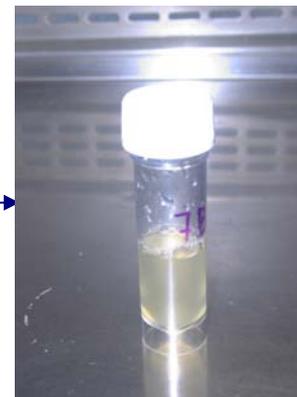
Fermentación en Placa Petri

30°C, 7 días

3. Metodología de trabajo

• Condiciones de la Extracción

- Matraz erlenmeyer 50ml agua Milli Ro
- Temperatura 30°C
- Tiempo 30 min
- Agitador orbital a 220rpm
- Centrifugación del extracto a 10000 rpm durante 10 min



Extracto Enzimático

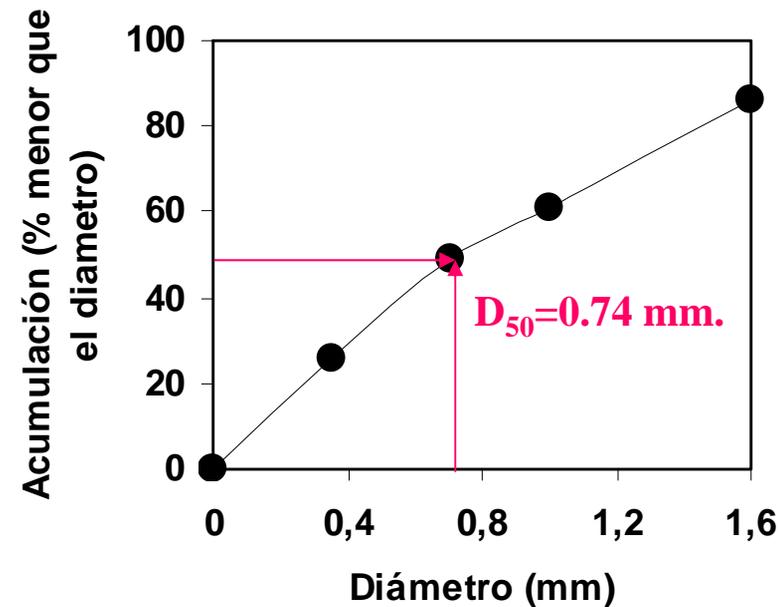
Análisis

pH
Azúcares Red
Celulasa
Xilanasas
Exo-PG
Endo-PG

4. Resultados

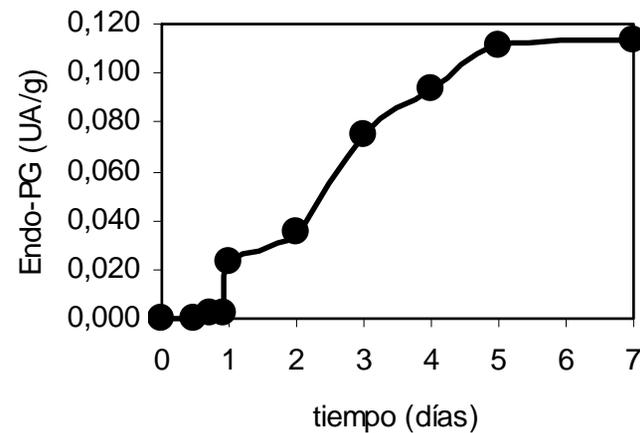
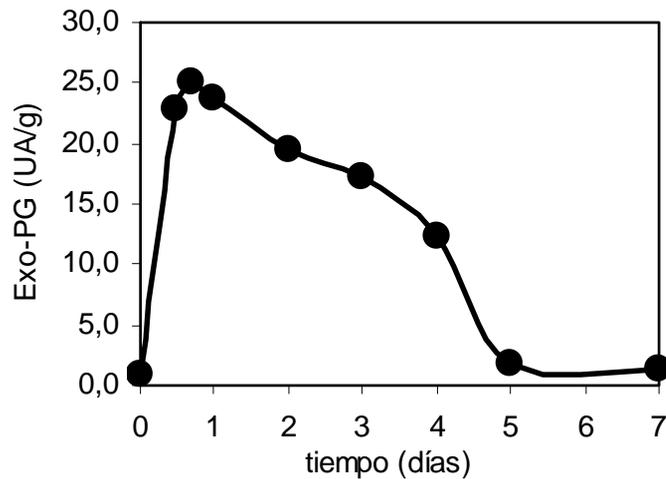
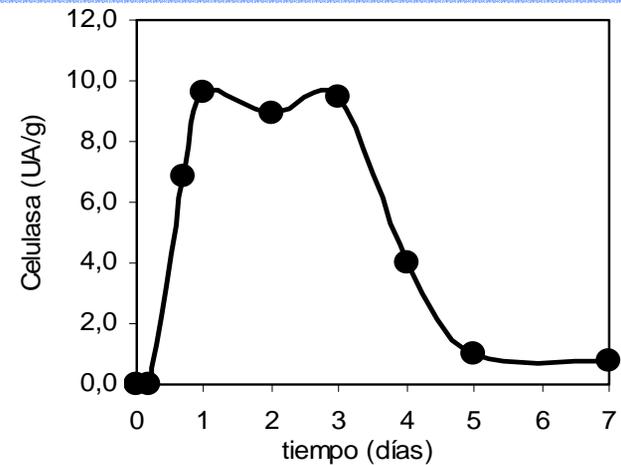
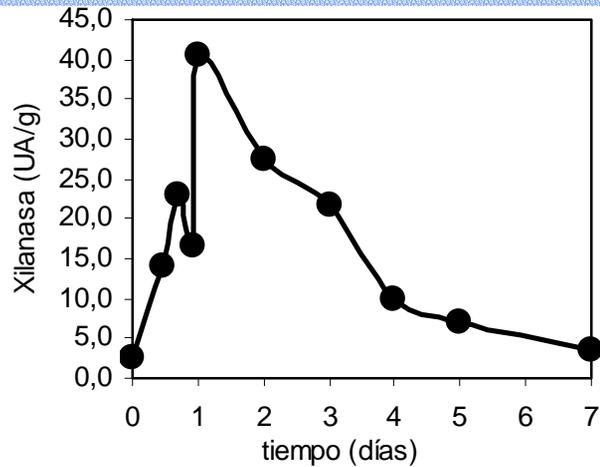
Composición Química del Orujo de uva y distribución del tamaño de partícula

ANÁLISIS QUÍMICO	
Componente	Composición (g/g) peso seco
Humedad	7.66%
Sales minerales	6.20%
Glucosa	7.13%
Nitrógeno	1.5%
Proteínas (N × 6.25)	9.32%
Fósforo	0.14%



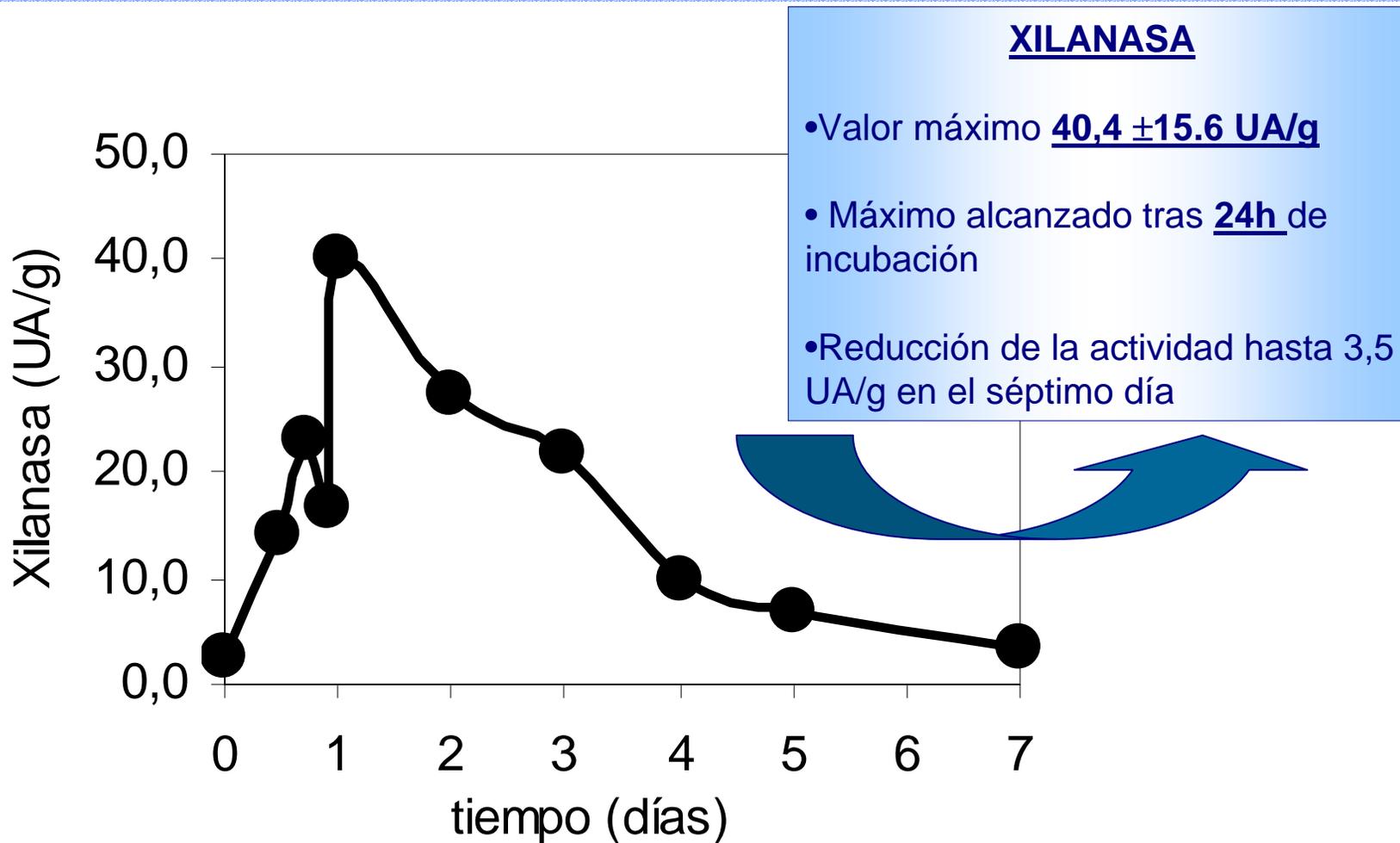
4. Resultados

4.2 Producción de enzimas



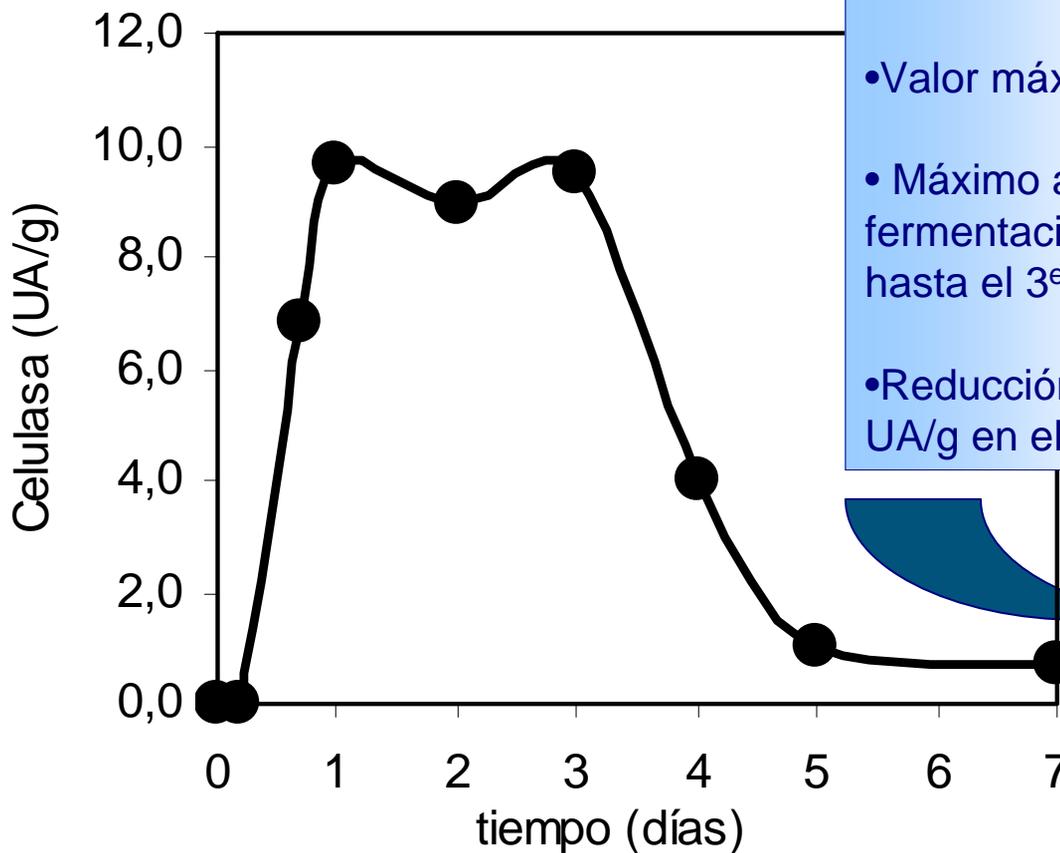
4. Resultados

Producción de enzimas



4. Resultados

Producción de enzimas

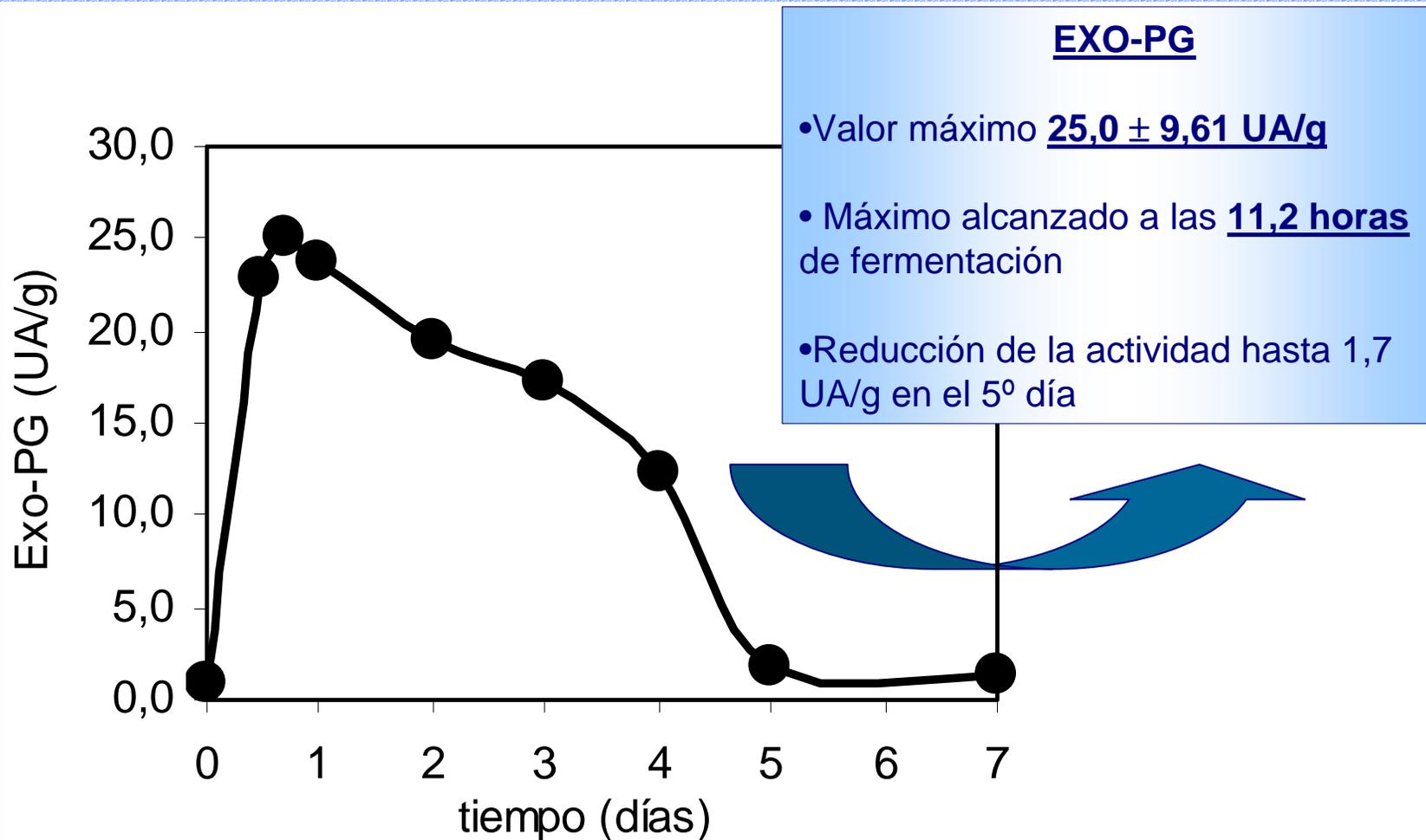


CELULASA

- No se excreta hasta transcurrido 17 h de fermentación
- Valor máximo **9,6 ± 0,76 UA/g**
- Máximo alcanzado el **1^{er} día** de fermentación y permanece constante hasta el 3^{er} día
- Reducción de la actividad hasta 1,0 UA/g en el 5^o día

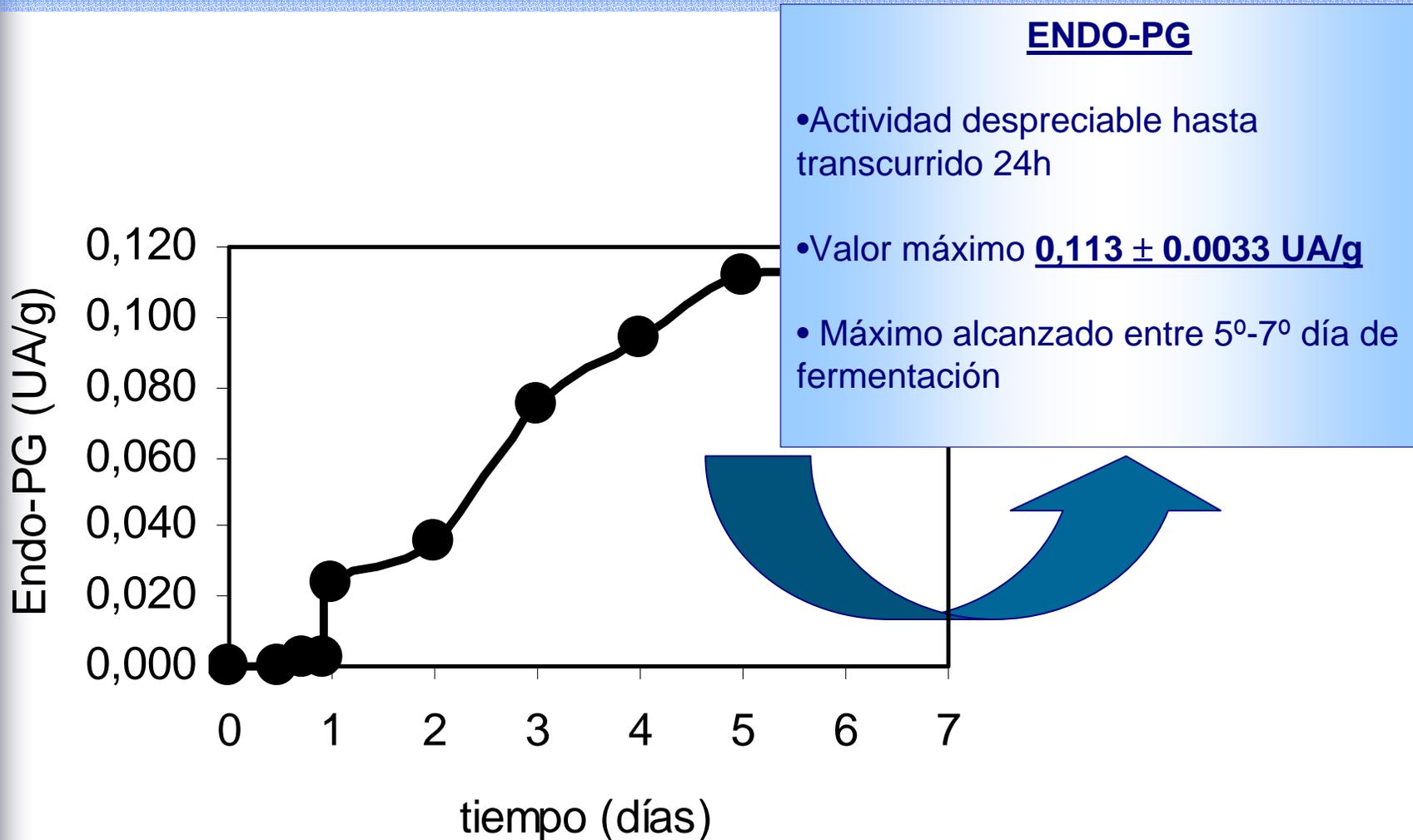
4. Resultados

Producción de enzimas



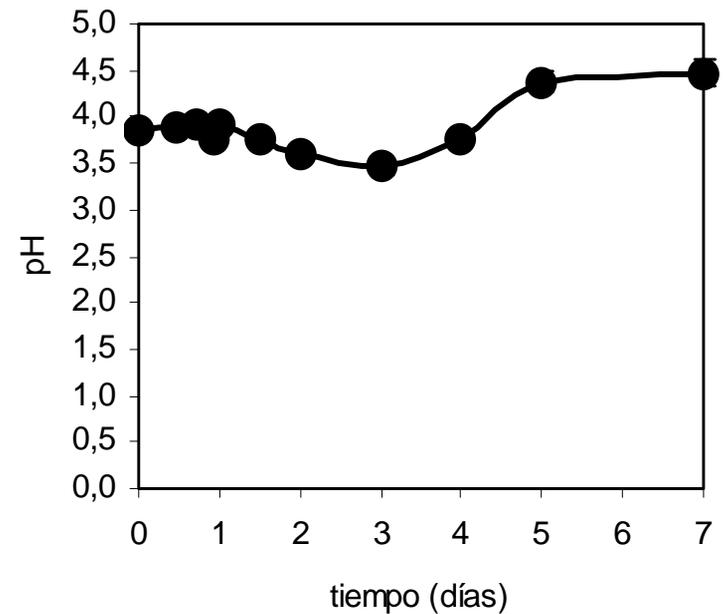
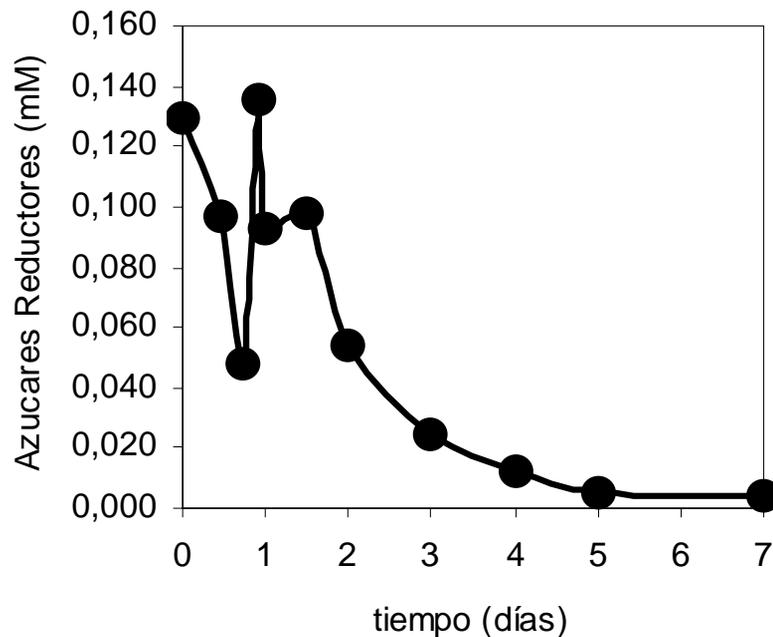
4. Resultados

Producción de enzimas



4. Resultados

Azúcares Reductores y pH



4. Resultados

Comparación con valores obtenidos con trigo y hongos filamentosos

Sustrato	Orujo de uva	Trigo
Actividad Máx.		
Xilanasa (UA/g)	40,4	18,93 (Cori, 2000)
Celulasa (UA/g)	9,6	9,05 (Yang, 2001)
Exo-PG (UA/g)	25,0	7,7 (Blandino, 2002)
Endo-PG (UA/g)	0,113	0,012 (Blandino, 2002)

5. Conclusiones

- El orujo de uva es un buen medio natural para la SSF, rico en nutrientes y de bajo coste.
- La producción por el hongo *Aspergillus awamori* de las enzimas xilanasa, celulasa y exo-PG sigue el mismo patrón. Rápido crecimiento en las primeras etapas de incubación alcanzando el máximo en el primer día.
- La actividad de la celulasa se ve inhibida posiblemente por la presencia de lignina.
- Endo-PG presenta represión catabólica cuando la concentración de azúcares es alta y su actividad crece cuando los azúcares son consumidos.
- Las actividades Xilanasa y Exo-PG presentan valores altos comparados con los valores encontrados en la bibliografía, mostrando buenas perspectivas para posteriores estudios y aplicaciones industriales.