

## Alternativas para el aprovechamiento integral del alperujo

Borroni, V.<sup>1</sup>, Monetta, P.<sup>2</sup>, Rodriguez-Gutierrez, G<sup>3</sup>

<sup>a</sup> ITPN UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina, <sup>b</sup> INTA-EEA San Juan, San Juan, Argentina, <sup>c</sup> Instituto de la Grasa-CSIC, Sevilla, España. [vmirborroni@gmail.com](mailto:vmirborroni@gmail.com)

El proceso de producción de aceite de oliva mediante el sistema de dos fases genera aceite y un residuo semisólido con un alto porcentaje de humedad (65-70%) llamado alperujo. La mayoría de los tratamientos que se han propuesto para bajar la carga tóxica de los residuos derivados de la industria olivícola, no contemplan la recuperación de compuestos bioactivos. Recientemente se ha desarrollado un nuevo tratamiento térmico que facilita la recuperación de compuestos de interés como biofenoles y azúcares. Mediante este tratamiento se obtiene a partir del alperujo un líquido enriquecido en compuestos bioactivos (L) y un menor volumen de sólido rico en celulosa, más digerible y fermentable [1]. Sin embargo, también se generan compuestos de degradación de azúcares como furfural e hidroximetilfurfural, los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos. Luego de extraídos dichos compuestos junto con los fenoles mediante cromatografía en columna, tendremos un líquido rico en azúcares (LC) con potencial para ser utilizado en bioprocesos. Previamente hemos evaluado la utilización de un extracto acuoso de alperujo como sustrato para el crecimiento de una levadura productora de carotenos, *Rhodotorulla sp.* Si bien el crecimiento de la cepa y la producción de carotenos son adecuados, se empieza a observar una inhibición con concentraciones de alperujo mayores al 10 g/100 mL, por lo que evaluar un sustrato libre de biofenoles y otros tóxicos se hace necesario para mejorar el proceso.

El objetivo general del trabajo es evaluar la capacidad de las fracciones líquidas provenientes del tratamiento térmico del alperujo como sustratos para el crecimiento de levaduras oleaginosas.

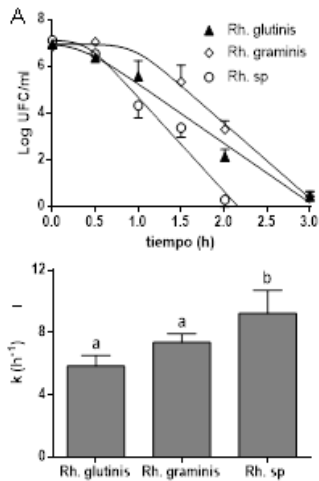
Microorganismos: Estudiamos el crecimiento de 3 cepas de levaduras del género *Rhodotorulla*, dos de las cuales (*Rh. Glutinis* y *Rh. Graminis*) fueron aisladas de fermentaciones de aceituna de mesa. La tercera cepa evaluada (*Rhodotorulla sp.*) es una donación del banco de levaduras del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini dependiente de la Universidad Nacional de La Plata. Esta cepa es la que se evaluó previamente en subproductos olivícolas sin pretratamiento.

Medios de cultivo: el alperujo se procesó mediante tratamiento térmico de 30 min, 160°C. Luego de centrifugación a baja velocidad se separó el líquido obtenido (L) el cual fue introducido en una columna con capacidad para retener fenoles y los productos de degradación de azúcares. El eluato resultante (LC) fue pasado por otra columna similar obteniéndose un nuevo eluato (LC2). Se evaluó la capacidad de los 3 licores para sostener el crecimiento de las levaduras.

Cultivo de microorganismo: las distintas cepas de *Rhodotorulla* fueron incubadas en los diferentes medios (L, LC, y LC2) puros o diluidos con agua destilada a 30°C con agitación constante de 200 rpm. A distintos tiempos una alícuota del medio fue extraída en esterilidad, diluida convenientemente y sembrada en palcas de medio YM sin antibióticos. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 h momento en el cual se procedió a realizar el recuento de colonias.

El tratamiento térmico pone a disposición una importante cantidad de azúcares (L=26±5g/L; LC=17±1 g/L; LC2= 8,8±0,8 g/L), que podrían ser consumidos por la levadura, pero también se generan inhibidores como el hidroximetilfurfural (L=4,8±0,5 g/L; LC=1,1±0,2 g/L; LC2=0,46±0,08 g/L) y se solubilizan niveles de fenoles (L=2,2±0,1 g/L; LC=1,2±0,3 g/L; LC2=0,53±0,06 g/L) que resultan tóxicos para el crecimiento de las 3 cepas.

Luego de 3 h de cultivo en L a 30°C y con agitación (200 rpm) el recuento de levaduras viables cae a 0. Las tres cepas son sensibles a la cantidad de fenoles e inhibidores presentes. No se encontraron diferencias significativas para la constante de inactivación (k) entre las cepas provenientes de la fermentación de las aceitunas de mesa entre sí, pero si hubo diferencias comparándolas con la cepa proveniente del banco de cepas (Figura 1).



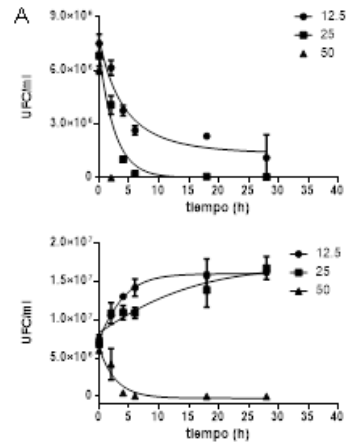
**Figura 1.** A- Curva de muerte de las distintas cepas de levadura en función del tiempo cuando se las incubaba en L a 30° C. B- Velocidad máxima de inactivación de las distintas cepas. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ )

La velocidad máxima de inactivación es mayor para esta última lo que indicaría que las cepas provenientes de la fermentación están más adaptadas a la concentración de biofenoles.

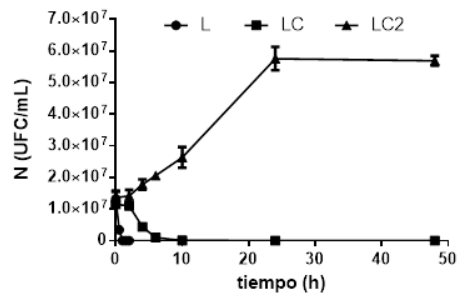
Los resultados muestran que es imprescindible disminuir la cantidad de inhibidores presentes, para poder aplicar un tratamiento biológico a este residuo. Esto puede lograrse mediante extracción selectiva (por cromatografía en columna) o mediante la dilución con agua. Si bien esta última opción implica un gasto extra en agua, es de notar que en una almazara se generan líquidos de lavado que podrían utilizarse para este fin. Ambas estrategias fueron estudiadas. El crecimiento de *Rhodotorulla sp* en la fase líquida con fenoles (L) y defenolizada (LC), ambas puras y diluidas con agua al 12,5; 25 y 50 % fue ensayado (Figura 2).

L aún diluido al 50% no permite el crecimiento de las levaduras. Sin embargo hay una disminución de la toxicidad a medida que se diluye. Luego de un primer paso por la columna de cromatografía, y diluyendo el LC al 25 y 12,5 % se logra el crecimiento de la levadura. Es decir que la dilución con agua funciona como una estrategia simple para reducir el efecto inhibitorio de la muestra. Si esta se acopla a la defenolización mediante cromatografía se obtienen mejores resultados. LC2 puro es adecuado para el crecimiento de las levaduras, sin necesidad de dilución (Figura 3). La obtención de este licor radica en el uso de una columna con un lecho de intercambio mayor. Esta estrategia resulta la más

adecuada, ya que por un lado permite una mayor recuperación de biofenoles y al mismo tiempo permite la aplicación de un tratamiento biológico que genera otros productos de alto valor agregado como levaduras y carotenos.



**Figura 2.** Curvas de Unidades Formadoras de Colonias de *Rhodotorulla sp.*/mL a 30° C en L (A) y LC (B) a distintas diluciones. ( $n=3$ )



**Figura 3.** Curvas de Unidades Formadoras de Colonias de *Rhodotorulla sp.* a 30° C en L, LC y LC2 puros. ( $n=3$ )

## Referencias:

- [1] Rodríguez, G., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., & Fernández-Bolaños, J. (2007). *Effect of steam treatment of alperujo on the composition, enzymatic saccharification, and in vitro digestibility of alperujo*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 136-142.
- [2] Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., & Van Impe, J. F. (2005). *GlnaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves*. International Journal of Food Microbiology, 102, 95-105.