



## **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



### **VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA OLIVÍCOLA COMO SISTRATOS PARA EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO**

**CAROLINA GHILARDI**

**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2022**



## PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), dependiente del CONICET y la Universidad Nacional del Sur (UNS), durante el período comprendido entre el 20 de septiembre de 2016 y el 21 de noviembre de 2022, bajo la dirección de la Dra. Amalia Carelli Albarracín (PLAPIQUI CONICET-UNS) y la Dra. María Virginia Borroni, (ITPN CONICET-UBA).”

Fecha

Firma



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ..../...../....., mereciendo la calificación de .... (.....)

## **Dedicada:**

A la memoria de mi papá, Juan Pablo Ghilardi.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado la beca doctoral, con la cual pude realizar esta Tesis.

A mi querida Universidad Nacional del Sur (UNS), por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de grado y postgrado.

A la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), porque a través de mis directoras, pude conocer y trabajar en un Instituto de alto perfil y con gran posicionamiento científico/tecnológico. Su gente y, en lo material, sus instalaciones, disposición de insumos, materiales y organización interna, me permitieron realizar la presente Tesis con seguridad y comodidad.

A la Dra. Amalia Carelli, por sus generosos consejos en el ámbito profesional y personal. Por su apoyo, buena predisposición y generosidad en compartir sus saberes y experiencias vividas en su vasta trayectoria científica. Es un honor, ser una de sus últimas becarias doctorales que dirigió antes de su retiro.

A la Dra. Virginia Borroni, por haber sido mi directora, mentora y compañera en este camino doctoral. No me alcanzan las palabras para agradecer su generosidad, humildad, paciencia, cariño, calma y don de gente, que me transmitió siempre. Por introducirme al mundo de la biotecnología aplicada, las levaduras y la reconversión de residuos agroindustriales. Por enseñarme todo lo que sé. Por su apoyo incondicional y la confianza que me brindó siempre. En este camino, hemos aprendimos juntas y trabajado a la par, como compañeras, lo que resalta su gran humildad como directora; lo cual, agradezco profundamente ya que, no suele ser una cualidad común en el ámbito

científico. Por su generosidad sin límites en compartir saberes y experiencias vividas dentro y fuera del país. Por permitirme conocer y contactarme con personas del ámbito científico. Por sus buenas formas al momento de corregir, enseñar y formar. Por permitirme participar de diferentes cursos y congresos nacionales e internacionales. Finalmente, agradecer su alegría, sencillez y calidez, lo que hizo muy agradable y fácil el trabajo diario.

Al grupo de Alimentos de PLAPIQUI, por haberme aceptado desde un principio; y a su personal de apoyo: Federico, Analía y Clarisa, por haberme ayudado siempre en lo que precisé.

A mis compañeras de Alimentos (2016-2020). Por aceptarme y haberme ayudado siempre durante estos años y los buenos momentos compartidos.

A mi compañera Daniela Mussio, por brindarme desinteresadamente datos y bibliografía sobre la caracterización del alperujo, que fueron de gran utilidad para esta Tesis.

A mis amigas que el doctorado me dio: Lu, Clarita, May, Cin y Yami. Por la amistad que se formó a partir de la convivencia diaria y sobre todo en durante la pandemia.

A Charly, por tomarte el tiempo de corregirme la presentación de la Tesis.

A mis compañeros de la Salita de Becarios de PLAPIQUI, por todos los buenos momentos compartidos dentro y fuera de PLAPIQUI.

Al establecimiento RUMAROLI S.A., a través del Sr. Jorge Bucciarelli por habernos facilitado durante este tiempo, las muestras de alperujo con las que hemos trabajado en esta Tesis.

Al Instituto de Botánica "Carlos Spegazzini" por proporcionarnos la levadura empleada en esta Tesis (*Rhodoturula mucilaginoso spp.*); y al Departamento de Micología, del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán", por identificar a esta cepa.

A todo el Laboratorio de Bioprocesos por su calidez, que hicieron sencillo el trabajo diario compartido.

A las Dras. Yanina Torres y Mariela Ambrosino, por su generoso y desinteresado aporte bibliográfico, relacionado a datos agronómicos de la región del sudoeste bonaerense.

A la Sra. Susana González (personal de apoyo-INIBIBB-CCT-BAHIA BLANCA), por su importante colaboración durante las primeras etapas de esta Tesis, con la esterilización del material.

Al personal de las áreas de computación, administración y mantenimiento de PLAPIQUI, por su buena predisposición siempre.

A mi colega y amiga Vito Wies, porque esta oportunidad no existiría sin vos.

A mis amigas, Sabri, Eva, Ceci, Kari y Dai por ser incondicionales en todas y siempre.

A mis papás, por formarme como persona y convertirme en lo que soy hoy.

A mi mamá y a mi hermana Julia, por ser los pilares fundamentales de mi vida. Por su constante apoyo, por sostenerme siempre y por impulsarme a animarme a más.





## Resumen

El sistema de centrifugación bifásico para la extracción del aceite de oliva, genera un único subproducto denominado alperujo que, debido a sus características fisicoquímicas se convierte en un desecho poco amigable para el medio ambiente. El sudoeste de la provincia de Buenos Aires (SOB) constituye una nueva área de producción olivícola, con importante intensificación de la actividad, que impulsa la necesidad de analizar opciones para su reutilización. En esta Tesis se plantea la reconversión del alperujo, como sustrato de bajo costo para la producción de pigmentos carotenoides. Para tal fin, se evaluaron levaduras del género *Rhodotorula* (*Rh. mucilaginosa* LPSC 638, *Rh. graminis* Y52 y *Rh. glutinis* Y54). En primer lugar, se prepararon y caracterizaron diferentes medios derivados del alperujo: Extractos acuosos (EAs) de diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 30 % p/V) y la fracción líquida del alperujo (AA). Por otra parte, se desfenolizaron los medios con mayor concentración de biofenoles (EA 30% y AA), mediante la técnica partición líquido-líquido. Todos estos medios, se utilizaron para evaluar el desarrollo y la biosíntesis de carotenoides en *Rh. mucilaginosa* LPSC638. Asimismo, se evaluó la influencia del inhibidor Imidazol en su vía carotenogénica. También, se estudió el metabolismo de la levadura asociado a fuentes de C y N. Al mismo tiempo, se realizaron ensayos de fitotoxicidad en EAs y AA normales y desfenolizados, sobre semillas de *Lactuca sativa* L. En segundo lugar, se analizó al alperujo en conjunto con el bagazo de cebada (BSG), como medios de cultivo sólidos. Finalmente, se analizó la estrategia de acoplar la producción de carotenoides con la recuperación de biofenoles desde el alperujo. Para ello, se utilizó como medio de cultivo, la fracción líquida del alperujo tratado hidrotermalmente (Sevilla, España. Patent No. US 6,849,770 B2 , 2005), para

analizar el desarrollo y producción de carotenoides en *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 y dos especies aisladas desde residuos olivícolas (*Rh. graminis* Y52 y *Rh. glutinis* Y54). Los resultados obtenidos fueron: **Capítulo 1.** Los EAs y AA ofrecen fuentes de C y N, además de un rango de pH adecuado para el desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. La técnica de desfenolización utilizada redujo el 45% y 30% de biofenoles en EAs y AA, respectivamente. **Capítulo 2:** La levadura se desarrolló y sintetizó carotenoides en todas las concentraciones de EAs y AA. Metabolizó azúcares presentes y no consumió biofenoles. Los carotenoides sintetizados fueron: toruleno, torularodina,  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno. **Capítulo 3:** La presencia de imidazol no afectó el desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Se obtuvo la mayor cantidad del caroteno en el medio con mayor concentración de imidazol (1000 ppm). Esta cantidad fue muy inferior respecto a la reportada en bibliografía. **Capítulo 4:** *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 pudo desarrollarse en medios sólidos, formados por alperujo, BSG y combinación. Los carotenoides sintetizados fueron: toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno. **Capítulo 5:** La fitotoxicidad sobre semillas de *Lactuca sativa* L., se reduce en tratamientos con medios desfenolizados y después del desarrollo de la levadura. No hay efectos fitotóxicos cuando las semillas son tratadas con medios más diluidos (EAs de 5 % y 10%). **Capítulo 6:** El proceso de desfenolización favorece el desarrollo y síntesis de carotenoides en *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. En el AA tratado hidrotermalmente, *Rh. glutinis* Y54, *Rh. graminis* Y52 y *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 producen: torularodina, toruleno,  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno. *Rh. glutinis* Y54 y *Rh. graminis* Y52, se desarrollaron mejor con respecto a *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. La técnica favorece la recuperación del hidroxitirosol.

**Palabras Clave:** Alperujo, Carotenoides, *Rhodotorula* spp., *Rhodotorula mucilaginosa*, Residuos agroindustriales, Economía Circular.

## **Abstract**

The two-phase centrifugation system for extracting olive oil generates a single by-product called alperujo. Due to its physicochemical characteristics, alperujo is a non-ecological waste. The southwest of Buenos Aires province (SOB) constitutes a new area of olive oil production, with a significant intensification of the activity, which drives the need to analyze options for its reuse. This thesis proposes the reconversion of alperujo as a low-cost substrate for producing carotenoid pigments. For this purpose, yeasts of the genus *Rhodotorula* (*Rh. mucilaginosa* LPSC 638, *Rh. graminis* Y52 and *Rh. glutinis* Y54) were evaluated. First, different alperujo-derived media were prepared and characterized: aqueous extracts (AE) of different concentrations (5, 10, 20 and 30 % w/V) and the liquid fraction of alperujo (AA). On the other hand, the media with the highest concentration of biophenols (EA 30% and AA) were dephenolized using the liquid-liquid partitioning technique. All these media were used to evaluate the development and biosynthesis of carotenoids in *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. The influence of the inhibitor Imidazole on the carotenogenic pathway was also evaluated. Also, yeast metabolism associated with different C and N sources was studied. At the same time, phytotoxicity tests were performed on normal and dephenolized AE and AA on seeds of *Lactuca sativa* L. Secondly, alperujo was analyzed together with beer spent grain (BSG) as solid culture media. Finally, the strategy of coupling carotenoid production with biophenol recovery from alperujo was analyzed. For this purpose, the liquid fraction of hydrothermally treated alperujo (Sevilla, España. Patent No. US 6,849,770 B2, 2005), was used as a culture medium to analyze the development and production of carotenoids in *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 and two species isolated from olive residues (*Rh. graminis* Y52

and *Rh. glutinis* Y54). The results obtained in each chapter were: **Chapter 1.** EAs and AA provide sources of C and N, as well as a suitable pH for the development of *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. The dephenolization technique used reduced 45% and 30% of biophenols in EAs and AA, respectively. **Chapter 2:** The yeast developed and synthesized carotenoids at all concentrations of EAs and AA. It metabolized the sugars present and did not consume biophenols. The carotenoids synthesized were: torulene, torularhodin  $\beta$ -carotene and  $\gamma$ -carotene. Lycopene was found only when media contained the inhibitor imidazole. **Chapter 3:** The presence of imidazole did not affect the development of *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. The highest amount of carotene was obtained in the medium with the highest concentration of imidazole (1000 ppm). This amount was lower than that reported in literature. **Chapter 4:** *Rh. mucilaginosa* LPSC638 can grow on solid media, consisting of alperujo, BSG and a combination of both. The carotenoids synthesized were: torulene, torularodine and  $\beta$ -carotene. **Chapter 5:** Phytotoxicity on *Lactuca sativa* L. seeds is reduced in treatments with dephenolized media and after yeast development. There are no phytotoxic effects when seeds are treated with more diluted media (5 % and 10 % EAs). **Chapter 6:** The dephenolization process favors the development and synthesis of carotenoids in *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. In the dephenolized liquid fraction of hydrothermally treated alperujo, *Rh. glutinis* Y54, *Rh. graminis* Y52 and *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 produce: torularhodin, torulene,  $\beta$ -carotene and  $\gamma$ -carotene. *Rh. glutinis* Y54 and *Rh. graminis* Y52 performed better than *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. The technique facilitates the recovery of Hydroxytyrosol.

**Keywords:** Alperujo, carotenoids, *Rhodotorula* spp., olive mill waste valorization, brewer's spent grain, Circular Economy.

# Índice General

Introducción General .....	1
<b>Bibliografía</b> .....	29
Materiales y Métodos .....	40
<b>1.1. Materiales</b> .....	41
<b>1.2. Muestras de Alperujo</b> .....	41
<b>1.3. Preparación de medios de cultivo</b> .....	43
a. Agua de Alperujo (AA) .....	43
b. Extractos Acuoso de alperujo (EAs) .....	44
c. Preparación de medios desfenolizados .....	45
<b>1.4. Procedimientos analíticos</b> .....	46
a. Determinación de pH: .....	46
b. Determinación de compuestos fenólicos totales: .....	46
c. Determinación de proteínas: .....	47
d. Determinación de glucosa: .....	48
e. Determinación de azúcares totales: .....	48
f. Determinación de la composición de azúcares por HPLC: .....	49
g. Determinación de pigmentos carotenoides: .....	49
<b>1.5. Microorganismo empleado</b> .....	51
a. Preparación del Inóculo: .....	51
b. Determinación de biomasa: .....	52
<b>1.6. Prueba de asimilación de nutrientes en <i>Rh. mucilaginoso LPSC 638</i></b> .....	53
<b>1.7. Producción y extracción de pigmentos carotenoides</b> .....	54
a. Medios AA y EAs (5, 10, 20 y 30%): .....	54
b. Medios desfenolizados vs. sin desfenolizar: AA y EAs (10% y 30%): .....	55
<b>1.8. Efecto del Imidazol sobre la producción de carotenoides</b> .....	57
<b>1.9. Fitotoxicidad</b> .....	57
<b>1.10. Desarrollo y producción de carotenoides por tres especies del género <i>Rhodotorula</i>, empleando como sustrato la fracción líquida del alperujo (L) tratada hidrotermalmente.</b> 60	
a. Especies del género <i>Rhodotorula</i> : .....	60
b. Muestras de alperujo: .....	60
c. Medios de cultivo: .....	61
d. Producción de carotenos: .....	61
<b>1.11. Desarrollo de <i>Rh. mucilaginoso LPSC 638</i> sobre alperujo y bagazo de cebada</b> .....	62

<b>1.12. Análisis Estadístico</b> .....	64
<b>Bibliografía</b> .....	66
Capítulo 1: Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo.....	69
<b>1.1. Introducción</b> .....	70
<b>Objetivo General</b> .....	76
<b>Objetivos específicos</b> .....	76
<b>1.2. Resultados y Discusión</b> .....	77
<b>1.2.1. Medios sin desfenolizar (EAs y AA)</b> .....	77
<b>1.2.2. Medios desfenolizados (EAs y AA). Reducción del contenido inicial de compuestos fenólicos.</b> .....	91
<b>1.2.3. Pruebas de asimilación de nutrientes en <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638.</b> .....	95
<b>1.3. Conclusiones parciales</b> .....	100
<b>1.4. Bibliografía</b> .....	102
Capítulo 2: <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.....	110
<b>2.1. Introducción</b> .....	111
<b>Objetivo General</b> .....	117
<b>Objetivos específicos</b> .....	117
<b>2.2. Resultados y discusión</b> .....	118
<b>2.2.1. Caracterización del crecimiento de <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638 en EAs y AA con concentración natural de biofenoles.</b> .....	118
<b>2.2.2. Producción de carotenoides por <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638 en EAs y AA.</b> .....	130
<b>2.3. Conclusiones parciales</b> .....	138
<b>2.4. Bibliografía</b> .....	140
Capítulo 3: Incidencia del Imidazol en la biosíntesis de carotenoides en <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638.....	146
<b>3.1. Introducción</b> .....	147
<b>Objetivo General</b> .....	152
<b>Objetivos específicos</b> .....	152
<b>3.2. Resultados y discusión</b> .....	153
<b>3.2.1. Efectos del imidazol sobre la biosíntesis de carotenoides en <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638.</b> .....	153
<b>3.3. Conclusiones parciales</b> .....	160
<b>3.4. Bibliografía</b> .....	162
Capítulo 4: Desarrollo de <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG).....	165
<b>4.1. Introducción</b> .....	166

Objetivo General .....	177
Objetivos específicos .....	177
<b>4.2. Resultados y Discusión .....</b>	<b>178</b>
<b>4.2.1. Desarrollo de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> LPSC 638 .....</b>	<b>178</b>
<b>4.2.2. Perfil de carotenoides identificados .....</b>	<b>184</b>
<b>4.3. Conclusiones parciales .....</b>	<b>188</b>
<b>4.4. Bibliografía .....</b>	<b>191</b>
Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de <i>Lactuca sativa</i> L. ....	199
<b>5.1. Introducción .....</b>	<b>200</b>
Objetivo General .....	206
Objetivos específicos .....	206
<b>5.2. Resultados y Discusión .....</b>	<b>207</b>
<b>5.2.1. Análisis de Fitotoxicidad de AA y EAs con concentración normal de compuestos fenólicos .....</b>	<b>207</b>
<b>5.2.2. Análisis de Fitotoxicidad de AA. Concentración normal y desfenolizada. ....</b>	<b>215</b>
<b>5.3. Conclusiones parciales .....</b>	<b>220</b>
<b>5.4. Bibliografía .....</b>	<b>222</b>
Capítulo 6: Desarrollo y producción de carotenoides por <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638, <i>Rh. glutinis</i> Y54 y <i>Rh. graminis</i> Y52 sobre medios derivados del Alperujo con diferentes niveles de compuestos fenólicos.....	229
<b>6.1. Introducción .....</b>	<b>230</b>
Objetivo General .....	235
Objetivos Específicos .....	235
<b>6.2. Resultados y Discusión .....</b>	<b>236</b>
<b>6.2.1. Caracterización del crecimiento de <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638 en medios normales y desfenolizados.....</b>	<b>236</b>
<b>6.2.2. Caracterización de los medios normales y desfenolizados luego del crecimiento de <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638.....</b>	<b>241</b>
<b>6.2.3. Producción de carotenoides de <i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638 en medios desfenolizados y con concentración normal de biofenoles. ....</b>	<b>245</b>
<b>6.2.4. Crecimiento de tres especies de levaduras del género <i>Rhodotorula</i> en la fracción líquida del alperujo (AA) tratada hidrotermalmente .....</b>	<b>249</b>
<b>6.2.5. Determinación del solvente para la extracción de carotenoides. ....</b>	<b>255</b>
<b>6.2.6. Producción de carotenoides por <i>Rhodotorula</i> spp. en la fracción LC2 del alperujo tratado hidrotermalmente .....</b>	<b>258</b>
<b>6.3. Conclusiones parciales .....</b>	<b>262</b>
<b>6.4. Bibliografía .....</b>	<b>265</b>

<b>Conclusión General.....</b>	<b>274</b>
--------------------------------	------------



# Introducción General

Uno de los desafíos que presenta la humanidad de cara al futuro, es producir más alimentos en una superficie cada vez menor para alimentar a una población mundial en constante crecimiento (Zapiola, 2022). Como consecuencia, el procesamiento de materia prima de origen vegetal y animal, destinada a la industria de alimentos y bebidas, produce millones de toneladas de desechos; generándose una gran diversidad y cantidad de residuos agroindustriales (Ministerio de Economía de España, 2015; Socaci et al., 2017; Panesar et al., 2015; dos Santos et al., 2014; Rodríguez et al., 2020; Lopes et al., 2016; Sánchez-Sánchez et al., 2020). Este tipo de desechos, se caracterizan por presentar una gran cantidad de materia orgánica, que se refleja en valores elevados de demanda química (DQO) y biológica (DBO) de oxígeno (Schneider et al., 2013; Panesar et al., 2015; Aliyu y Bala, 2011; dos Santos et al., 2014; Sánchez-Sánchez et al., 2020). En consecuencia, su liberación en el medio ambiente, sin un tratamiento previo, genera graves problemas de contaminación (Schneider et al., 2013; dos Santos et al., 2014; Ouzounidou et al., 2010; Dellagreca et al., 2001; Esteban-Torrente, 2019; Aliyu y Bala, 2011; Sánchez-Sánchez et al., 2020; Lopes et al., 2016).

Algunos de los inconvenientes que presenta el procesamiento de la biomasa residual, son: que se genera en grandes volúmenes, en muchos casos en forma estacional, es de difícil transporte y no tiene valor económico de interés por sí misma (Trigo, 2021; Chavarria-Miranda, 2020; Lynch et al., 2016; Lopes et al., 2016). Es así que, el concepto de bioeconomía impulsó en las últimas décadas el interés por hallar opciones para la transformación en origen, reutilización y puesta en valor de la biomasa residual (Panesar et al., 2015; Berbel et al., 2018; European Regional Development Fund,

## Introducción General

2013; Trigo et al., 2017; Patermann, 2021; Sánchez-Sánchez et al., 2020; Ministerio de Economía de España, 2015; Socaci et al., 2017; UE Proyecto BioStep, 2015).

La bioeconomía constituye una estrategia de producción y organización económica que es transversal a toda la economía, e incluye a distintos sectores (tradicionales y modernos) con diversas escalas, los cuales utilizan procesos y recursos biológicos como parte de sus actividades productivas (Sánchez-Sánchez et al., 2020; Trigo et al., 2017; Bisang y Trigo, 2017).

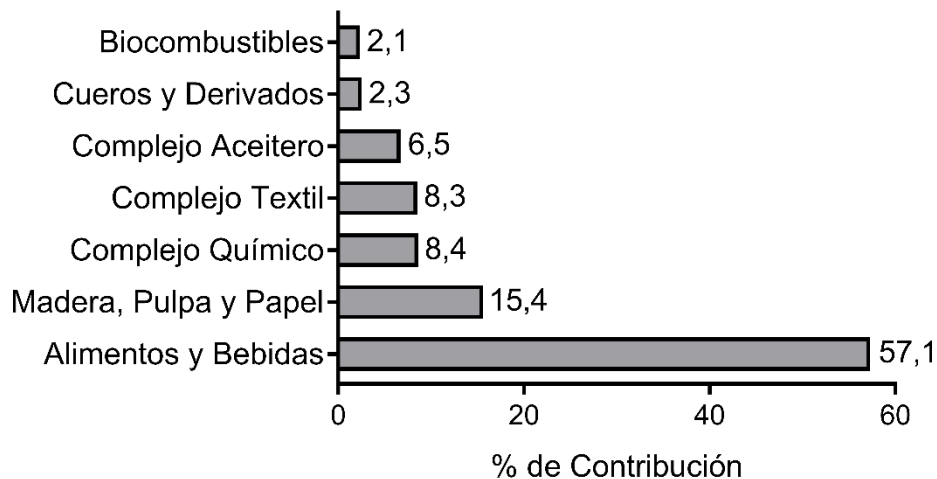
La definición de bioeconomía cobra renovada vigencia en estos tiempos, en respuesta a los desafíos globales que hoy enfrenta la humanidad como, el incremento en la demanda de alimentos, agua y energía, el cambio climático y el agotamiento de los recursos naturales (UE Proyecto BioStep, 2015; Trigo et al., 2021; Anlló, 2021). Este concepto económico responde a los desafíos antes mencionados, teniendo en cuenta a las actividades agropecuarias y agroindustriales en conjunto con el medio ambiente (Patermann, 2021; Trigo et al., 2021; von Braun, 2021; Nardone, 2020; Chavarría-Miranda, 2019; Naciones Unidas (CEPAL), 2015; UE Proyecto BioStep, 2015).

La bioeconomía está comenzando a desempeñar un rol significativo en las economías de América Latina, en las cuales el incremento del valor agregado a la producción agropecuaria, reviste una gran importancia para la expansión de la economía (Coremberg, 2019; Rodríguez et al., 2017). En particular para Argentina, representa una opción estratégica, ya que produce una alta disponibilidad y variedad de biomasa. Asimismo, cuenta con gran capacidad de desempeño en el ámbito empresarial y científico-tecnológico (Trigo et al., 2017; Nimo, 2020; Sánchez, 2022). Además, dispone de institucionalidad pública y un sector privado capaz de impulsar marcos regulatorios,

## Introducción General

innovaciones e inversiones, necesarios para su implementación, (Trigo, 2020; Alvarez, 2020; Costa, 2015).

Por otra parte, desde el punto de vista de las etapas de producción, la bioeconomía argentina está constituida por sectores productores de bienes biobasados y por sectores asociados, que contribuyen con la cadena de valor (Sánchez, 2022; Coremberg, 2019). Es importante subrayar que nuestro país es uno de los principales productores de alimentos a nivel global y uno de los pocos que aún puede incrementar su participación en la oferta mundial (Elizondo, 2022; Coremberg, 2019; Trigo et al., 2017).



**Fig. I.1.** Contribución de diferentes bloques bioindustriales a la Bioeconomía y al Producto Bruto Interno (PBI), argentino (datos del 2015 al 2017). La misma, fue medida en porcentaje contribuido al total del valor agregado. Se observa que la principal actividad bioindustrial, la genera el bloque de alimentos y bebidas con el 57,1% del total (Adaptado de Coremberg, 2019).

Sin lugar a dudas, el alto desarrollo y potencial argentino de la industria alimentaria y de bebidas, constituye una valiosa plataforma para la proyección de la bioeconomía (Fig. I.1). Estas industrias abarcan un amplio complejo de rubros de producción y transformación, que se distribuyen por toda la geografía del país (Sánchez, 2022; Nimo, 2020; Coremberg, 2019; Trigo et al., 2017).

## Introducción General

Los fundamentos de la bioeconomía, se enfocan en el aprovechamiento de procesos biológicos en tiempo real, en dónde la biomasa como fuente de carbono, es el componente central (Sánchez, 2022; Trigo, 2021; Patermann, 2021; Chavarria-Miranda, 2020; Bisang y Trigo, 2017; Rodríguez et al., 2017). Los bienes y servicios que se producen a partir de esta concepción económica, incluyen todos aquellos que resultan del uso y transformación de recursos biológicos; como así también, del aprovechamiento de los residuos agroindustriales (Sánchez, 2022; ALCUE Net, 2015).

De esta manera, la conversión de la biomasa residual permite aportarle valor agregado y transformarla en productos económicamente viables (Sánchez, 2022; von Braun, 2021; Patermann, 2021; Sánchez-Sánchez et al., 2020; Socaci et al., 2017; Naciones Unidas- CEPAL, 2015; UE Proyecto BioStep, 2015). Como resultado, su reutilización genera un mejor uso del recurso biológico, permite la interrelación entre distintas cadenas de valor, además de la creación de otras nuevas (Sánchez, 2022; Patermann, 2021; Nardone, 2020; Chavarria-Miranda, 2020).

A partir de la biomasa residual, se pueden extraer compuestos de interés económico (Ej.: pigmentos, antioxidantes, azúcares, triglicéridos, proteínas, enzimas, fibras), que se convierten en insumos para diferentes cadenas productivas (Ghilardi et al., 2022; Sánchez, 2022; Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Rodríguez et al., 2020; Sánchez-Sánchez et al., 2020; Bisang y Trigo, 2017; Rodríguez et al., 2017; Socaci et al., 2017; Lopes et al., 2016; Mussio et al., 2014; Usaquen-Alvarado, 2008).

En este sentido, se la puede emplear como sustrato de bajo costo para el desarrollo de microorganismos que sintetizan biocompuestos y biomateriales de interés económico (Ghilardi et al., 2022; Ghilardi et al., 2020; Alvarez, 2020; Nimo, 2020;

## Introducción General

Sánchez-Sánchez et al., 2020; Sharma y Goshal, 2020; Pereira-Cipolatti et al., 2019; Cuestas, 2019; Hussein et al., 2018; Borroni et al., 2017; Bisang y Trigo, 2017; Lopes et al., 2016; Cheng y Yang, 2016; Panesar et al., 2015; Postemsky, 2015; Schneider et al., 2013; Kotlar et al., 2013; Saparrat et al., 2008).

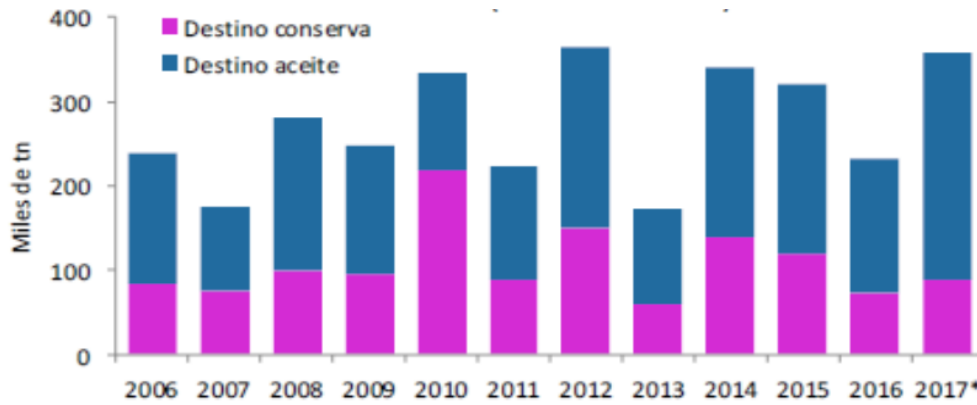
Del mismo modo, se puede utilizar biomasa residual para la producción de energía (desde biocombustibles a energía térmica y eléctrica) (González-Álvarez, 2021; Sánchez-Sánchez et al., 2020; European Regional Development Fund, 2013; Ministerio de Economía de España, 2015; Trigo et al., 2017; Nardone, 2020; Ravindran et al., 2018).

No obstante, el aprovechamiento integral de la biomasa en cualquiera de las formas mencionadas, implica en primer lugar, el conocimiento del proceso y cómo llevarlo a cabo (*know how*) (Sánchez, 2022).

El olivo (*Olea europaea*) es una especie vegetal originaria de Asia Menor, que se extendió desde Siria y Grecia hacia toda la cuenca del Mediterráneo. Posteriormente, con el descubrimiento de América, el cultivo del olivo trascendió sus confines mediterráneos (IOC, 2020). De hecho, en la actualidad, existen 47 países productores de aceite de oliva que aportan en total 11 millones de hectáreas de olivares distribuidos en los cinco continentes (IOC, 2015).

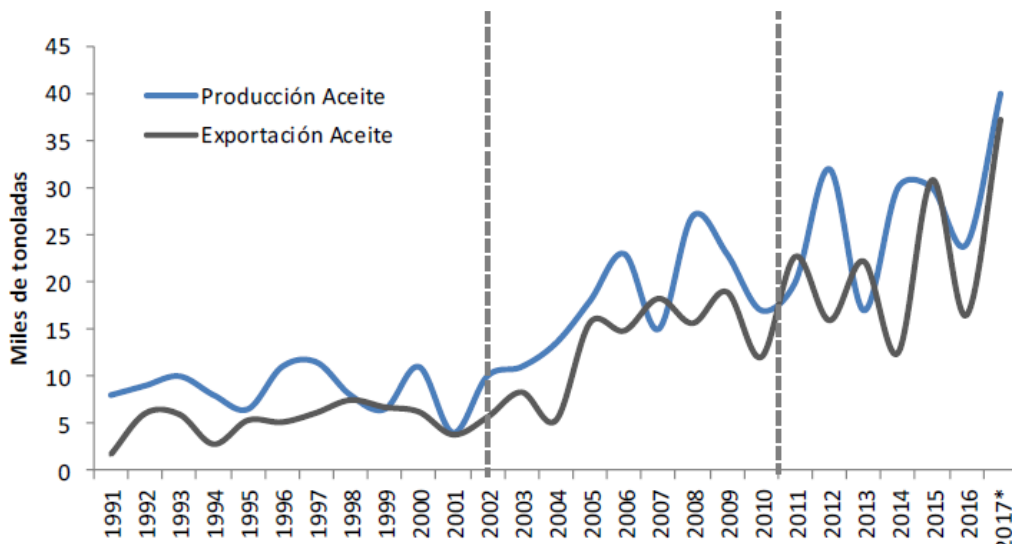
Existen dos campañas de cosecha de aceitunas, la primera abarca desde octubre a abril en el hemisferio norte y la segunda desde abril a julio, en el hemisferio sur (IOC, 2015). España, Italia y Grecia son los mayores productores de aceite de oliva y aceituna de mesa, aportando en conjunto el 75% de la producción mundial (de Domingo, 2019).

## Introducción General



**Fig. I.2.** Producción primaria Argentina de aceituna (en bruto) periodo 2006-2017 (miles de toneladas). Fuente: Subsecretaría de programación Microeconómica de la Nación, (2018).

Argentina es uno de los principales productores olivícolas por fuera de la cuenca mediterránea, junto con Australia, Nueva Zelanda, Chile, Perú, Uruguay, Estados Unidos y Sudáfrica (Monetta y Ibanez, 2014). Según la International Olive Council (IOC), nuestro país en el ranking mundial se encuentra 8° respecto a la producción de aceituna de mesa, 10° en la producción de aceite de oliva y 6° como país exportador del aceite (Fig. I.2 y I.3), (IOC, 2018; Subsecretaría de programación Microeconómica de la Nación, 2018).



**Fig. I.3.** Producción y Exportación de Aceite de Oliva en Argentina (miles de toneladas). Periodo 1991-2017). Fuente: Subsecretaría de programación Microeconómica de la Nación, (2018).

El 96% de los aceites de oliva exportados por Argentina son vírgenes, en su mayoría pertenecientes al grado virgen extra; 3% se mezclan y 1% se refina. De esta

## Introducción General

manera, nuestro país tiene una ventaja diferencial al posicionarse como un proveedor de nivel mundial, por la buena calidad del aceite destinado a exportación (Subsecretaria de programación Microeconómica de la Nación, 2018).

Estados Unidos es actualmente el principal destinatario de las exportaciones argentinas de aceite de oliva virgen extra (50%), seguido por Brasil (40%) y el 10% restante se exporta a más de 35 países, entre los que se encuentran Uruguay y Chile (Subsecretaria de programación Microeconómica, 2018).

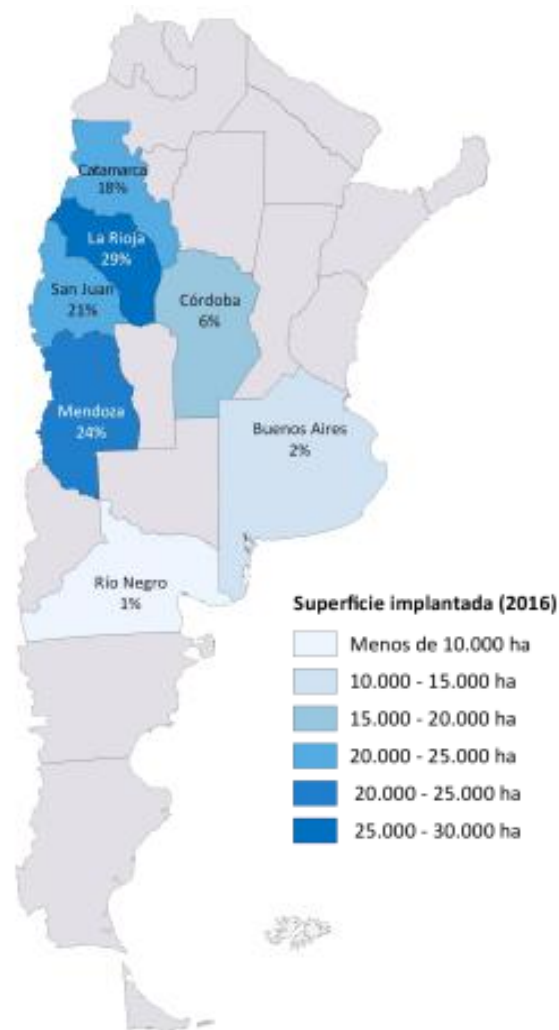
En cuanto al consumo interno de aceite de oliva, en Argentina se ingieren aproximadamente solo 0,17 litros per cápita al año (Subsecretaria de programación Microeconómica, 2018). Por esta razón, la mayor parte del aceite de oliva producido se exporta, debido a su alto costo en comparación con los aceites de oleaginosas; ya que es de cinco a seis veces más caro que el aceite de soja y girasol (Subsecretaria de programación Microeconómica, 2018).

Según el relevamiento realizado por el último censo agropecuario (2018), en nuestro país la producción anual de aceitunas destinadas a aceite fue de 267000 ton, de las cuales, 213600 se destinaron a exportación y 53400 a consumo interno (Informe Olivícola 2021; INDEC 2021). Las variedades predominantes que se cultivan en nuestro país, son Arauco y Arbequina, sin embargo, se pueden identificar otras variedades dependiendo del área de origen del cultivar como Frantoio, Farga, Nevadillo, Manzanilla y Picual (Ministerio de Desarrollo Productivo, 2022; Subsecretaria de programación Microeconómica, 2018 ).



## Introducción General

El sector olivícola en nuestro país, ha experimentado gran desarrollo en los últimos años que continúa aún en el presente (Elisei, 2007; Cámara Federal de Inversión, 2020; Ministerio de Desarrollo Productivo, 2022). Según el informe realizado por la IOC, (2012) a principios de la década de 1990, indicaba 29600 ha bajo producción olivícola; mientras que, en el último censo agropecuario, realizado en 2018, se contabilizan 77171 ha (INDEC, 2021).



**Fig. I.4.** Superficie (ha) implantada destinada a olivicultura hasta 2016 (Fuente: Subsecretaría de programación Microeconómica de la Nación, 2018).

## Introducción General

Actualmente, las principales provincias productoras de aceite de oliva y aceitunas de mesa son Catamarca, La Rioja, San Juan y Mendoza (Cámara Federal de Inversión, 2020; Elisei et al., 2007). También, se agregaron nuevas áreas de cultivo en las provincias de Córdoba, Buenos Aires, Río Negro, Neuquén y San Luis (Fig. I.4), (Cámara Federal de Inversión, 2020; INDEC, 2021; Subsecretaría de programación Microeconómica, 2018).



**Fig. I.5.** Localización de las áreas destinadas a olivicultura en el Sudoeste de la Provincia de Buenos Aires (SOB), (Tedesco, 2021).

La región del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (SOB), presenta un área ecológica apta para el cultivo del olivo que abarca los partidos de coronel Rosales, coronel Dorrego, Puán, Bahía Blanca, Villarino y Patagones (Tedesco, 2021; Kittler, 2017; Aguirre et al., 2010) (Fig. I.5). Se registran en la zona 42 establecimientos, principalmente PyMES, que conforman un micro "cluster" productivo de desarrollo avanzado como estrategia de diversificación de las actividades agrícolas tradicionales de la región (Tedesco, 2021; González et al., 2016).

Este incipiente conglomerado olivícola, está conformado por fincas con montes de olivos en producción y algunas de estas, además, cuentan con almazaras que proveen el

## Introducción General

servicio de extracción de aceite a las restantes (Tedesco, 2021; González et al., 2016). Por otro lado, los rendimientos de los productores de la región son dispares ya que se observan montes grandes, compuestos en general por olivos antiguos, mientras que a la par coexisten plantaciones nuevas (Tedesco, 2021; González et al., 2016).

En la actualidad, existen más de 2600 ha con olivos productivos, que presentan rendimientos de 8,5 ton de aceitunas/ha y un 18% en aceite de oliva/kilo (González et al., 2016). Especialmente el partido de coronel Dorrego, posee 2000 de las 2600 ha de olivos que se encuentran implantados en el SOB (Kittler, 2017); siendo las variedades predominantes: Arbequina, Farga, Nevadillo y Frantoio (Tedesco, 2021; Kittler, 2017; Elisei et al., 2007). En esta zona de la provincia, se obtiene un aceite de oliva con propiedades organolépticas diferenciadas respecto al de otras zonas del país, debido a las características agroclimáticas distintivas de la región como los suelos, el clima y en particular la cercanía del mar con las sierras (Ceci et al., 2019; Kittler, 2017; Gatti y Gonzalez, 2009; Elisei et al., 2007). De hecho, la amplitud térmica que se registra en esta zona entre el verano (41,5 °C) y el invierno (-7 °C) (Gatti y Gonzalez, 2009), beneficia a los olivares debido a que favorece la maduración lenta de los frutos (Ceci et al., 2019). A su vez, la acumulación de horas/frío permite obtener un aceite con alto contenido de ácido oleico y alta concentración de compuestos fenólicos (Ceci et al., 2019; González et al., 2016; Elisei et al., 2007).

Teniendo en cuenta todos estos parámetros de calidad, se podría generar a futuro, la caracterización de los aceites del SOB que daría pie a la denominación de origen (Elisei et al., 2007). Es por eso que, el conjunto de los atributos mencionados hace de esta

## Introducción General

región, un área con gran oportunidad para aprovechar las buenas condiciones coyunturales del negocio para fortalecerse (González et al., 2016).

Antiguamente, se utilizaba el método tradicional o discontinuo para procesar las olivas y obtener aceite. El mismo consistía en extraer el aceite a presión mediante la trituración mecánica de las aceitunas (Morillo et al., 2009). Sin embargo, la intensificación de la producción condujo al abandono de este método, remplazándose por molinos centrífugos más eficientes y de mayor capacidad (Ouzounidou et al., 2010), (Fig. 1.6). Estos molinos pueden tener dos formas diferentes de funcionamiento dependiendo del tipo de sistema de centrifugación que presenten: de dos o de tres fases (McNamara et al., 2008; Albuquerque et al., 2004 ).

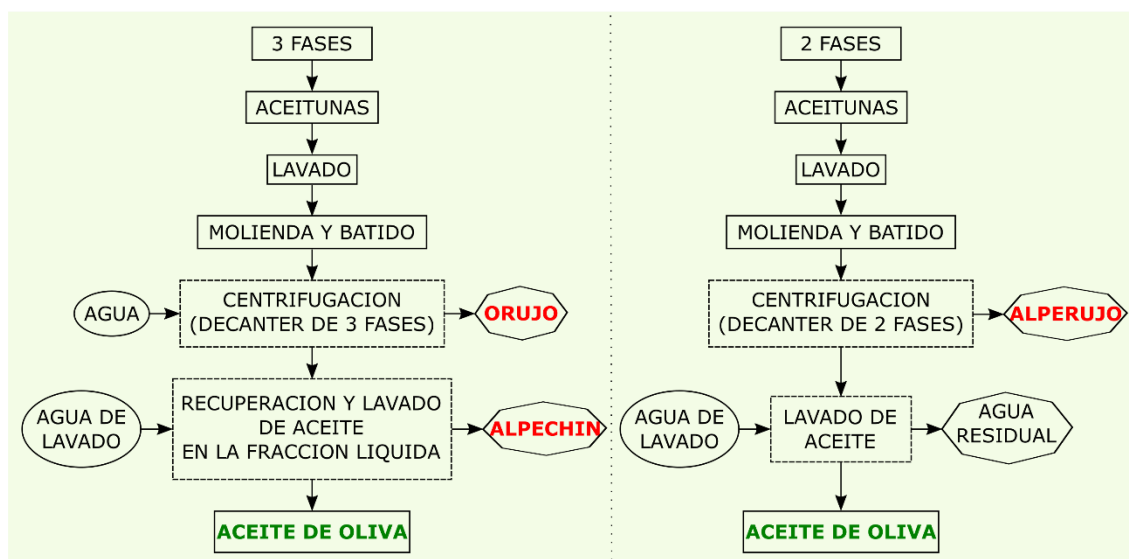


Fig. 1.6. Comparación de los sistemas de extracción de tres y dos fases. Diagrama adaptado de Albuquerque et al. (2004).

En el proceso de tres fases es necesario agregar grandes cantidades de agua a la pasta oleosa obteniéndose, además del aceite, dos residuos: por un lado, el alpechín, que consiste en el agua de vegetación de las aceitunas más el agua añadida y, por otro lado, el orujo que es la mezcla de la pasta de aceituna y los carozos (McNamara et al.,

## Introducción General

2008; Albuquerque et al., 2004). En cambio, en el sistema de dos fases se utiliza una menor cantidad de agua, respecto al sistema trifásico para separar el aceite. Por lo cual, queda como remanente un solo residuo: el alperujo (McNamara et al., 2008; Albuquerque et al., 2004). Este desecho presenta una composición similar al orujo del proceso de tres fases, pero con mayor humedad e incorpora los constituyentes del alpechín (Aguirre et al., 2010).

El sistema de tres fases fue introducido a nivel mundial, en la década de 1970 mientras que el sistema de centrifugación de dos fases, se introdujo a partir de 1990 para abordar el problema que presenta el sistema trifásico, que es el de utilizar grandes cantidades de agua durante el proceso centrífugo (Ouzounidou et al., 2010; Aguirre et al., 2010). En la actualidad, ambos sistemas están vigentes y se utilizan en los principales países olivícolas del mundo (Ouzounidou et al., 2010; McNamara et al., 2008).



**Fig. 1.7. A)** Equipo de centrifugación de dos fases en funcionamiento. **B)** Generación del alperujo al final del proceso de obtención del aceite de oliva (Establecimiento olivícola RumarOli).

La mayoría de las almazaras argentinas han adoptado el sistema de extracción bifásico con el que se generan aproximadamente, 80 ton de alperujo por cada 100 ton de aceitunas procesadas (Fig. 1.7), (Monetta y Ibañez, 2014; IOC, 2012).

## Introducción General

El alperujo se caracteriza por ser un residuo semisólido, con alto contenido de humedad (65% - 70%), pH ligeramente ácido (4,8 - 6), elevada concentración de sales y baja actividad de agua (aw). El 90% de su peso seco es materia orgánica, compuesta principalmente por lignina (46%), hemicelulosa (38%), celulosa (21%), lípidos, sales y carbohidratos (Ntougias et al., 2013; Ouzounidou et al., 2010; Aguirre et al., 2010). Asimismo, contiene cantidades significativas de compuestos fenólicos (Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Borroni et al., 2017; Ouzounidou et al., 2010; Aguirre et al., 2010).

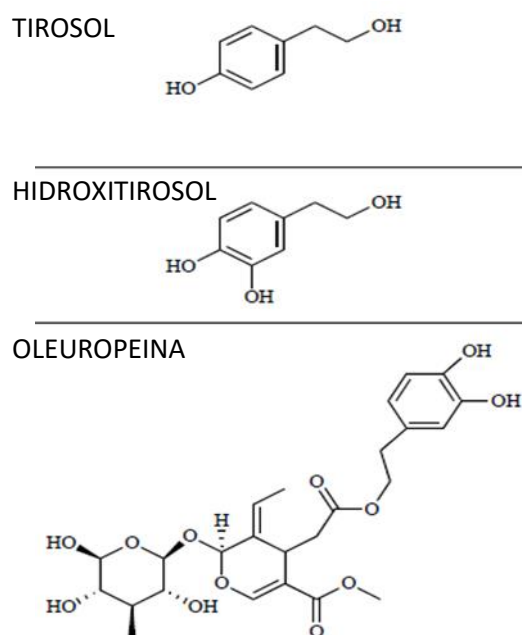
En la bibliografía se documenta, que el alperujo debido a su composición inhibe la germinación de semillas y el crecimiento temprano de las plantas, alterando las características del suelo, ya que crea condiciones reductoras que afectan la diversidad microbiana del mismo (Aguirre et al., 2014; Ntougias et al., 2013; Ouzounidou et al., 2010; Albuquerque et al., 2004; Aranda et al., 2006; Linares et al., 2003; Martin et al., 2002). De esta manera, se han empleado diversos métodos fisicoquímicos para remediar este residuo como: precipitación, floculación, adsorción y ozonización, entre otros (Ouzounidou et al., 2010). En general, estas técnicas demostraron niveles satisfactorios en la disminución de la carga orgánica y del contenido de compuestos fenólicos sobre este residuo (Ouzounidou et al., 2010). Sin embargo, la complejidad técnica, los altos costos de instalación y de operación que presentan, limitaron su aplicación y adopción (Ouzounidou et al., 2010).

Actualmente, se busca reducir el impacto en el medio ambiente de estos desechos olivícolas, a través del uso de metodologías combinadas: fisicoquímicas y biológicas, que permitan la degradación y detoxificación de los residuos olivícolas en general

## Introducción General

(Ouzounidou et al., 2010; Andrezzi et al., 2008). Todos los desechos provenientes de la industria olivícola, presentan una diversa gama de componentes orgánicos e inorgánicos que pueden ser recuperados como, los biofenoles (Ntougias et al., 2013). Estos compuestos presentan interés económico ya que se pueden utilizar en la industria alimentaria, farmacéutica y química como antioxidantes naturales, debido a los beneficios que aportan a la salud humana, o también, como componentes activos en productos desinfectantes (Mussio et al., 2017; Ntougias et al., 2013; Suarez et al., 2010).

Especialmente el alperujo, es un subproducto con un alto potencial para la recuperación de estos componentes que aún no ha sido aprovechado en toda su magnitud, en particular a nivel nacional (Aguirre et al., 2010).



**Fig. I.8.** Principales compuestos fenólicos hallados en alperujo junto a su estructura química. Diagrama adaptado de (Takaç y Karakaya, 2009).

Los compuestos fenólicos que generalmente contiene el alperujo son, alcoholes fenólicos (hidroxitirosol y tirosol), secoiridoides (oleuropeína y verbascósido) y flavonoides (Fig. I.8). Todos ellos presentan actividad antioxidante debido a que donan

## Introducción General

el átomo de hidrógeno del OH fenólico a los radicales libres, deteniendo así la reacción de oxidación (Lin et al., 2014; Rubio-Senent et al., 2013; Takaç y Karakaya, 2009; Bendini et al., 2007). De esta manera, el alperujo constituye una fuente natural de compuestos fenólicos (Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Takaç y Karakaya, 2009; Rubio-Senent et al., 2013; Fernández-Bolaños et al., 2008; Çelik et al., 2020; De Marco et al., 2007; Suarez et al., 2010).

Diferentes estudios llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* señalan que los compuestos fenólicos provenientes de las aceitunas, generan beneficios importantes a la salud humana, por sus propiedades antioxidantes y nutraceuticas, contribuyendo a la prevención de enfermedades cardíacas y de ciertos tipos de cáncer (Bendini et al., 2007; Visioli et al., 2002; Feroso et al., 2018; Bisignano et al., 1999). Además, poseen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas e hipoglucémicas (Bendini et al., 2007; Visioli et al., 2002). Por otra parte, favorecen la preservación de los alimentos ya que retardan la oxidación lipídica y disminuyen el ataque de microorganismos, demorando su deterioro (Galanakis et al., 2018; Bendini et al., 2007; Ntougias et al., 2013; Suarez et al., 2010; Takaç y Karakaya, 2009). Asimismo, la pequeña fracción de compuestos fenólicos que migran a la fase oleosa durante el proceso de extracción, contribuyen al sabor y aroma final del aceite de oliva, además de protegerlo de procesos oxidativos, confiriéndole estabilidad en el tiempo (Ceci et al., 2019).

Por otro lado, en los principales países productores olivícolas como España, hace tiempo que se busca reconvertir al alperujo, dándole diferentes utilidades generando, de esta manera, un residuo con menor impacto ambiental (Usaquen-Alvarado, 2008).



## Introducción General

Entre los usos más importantes que se conocen se encuentra la extracción del aceite de orujo, en donde los alperujos son sometidos a una segunda extracción mediante solventes (generalmente hexano), (Usaquen-Alvarado, 2008). El producto resultante es un aceite de menor calidad, pero apto para consumo humano y el subproducto es un alperujo que presenta apenas entre 10-13% de humedad (Usaquen-Alvarado, 2008). Este alperujo seco a su vez, se utiliza como combustible para la generación de energía eléctrica y térmica (por combustión), ya que presenta un poder calorífico de 400 kcal/kg (Aguirre et al., 2010; Morillo et al., 2009; Usaquen-Alvarado, 2008). Este proceso genera como residuo una gran cantidad de cenizas que, según Aguirre, (2010) se puede reutilizar para la elaboración de fertilizantes, dado su alto contenido de P y K; o también, para la fabricación de cemento portland y puzolánicos. Recientemente se propuso la carbonización hidrotermal del alperujo obteniéndose un hidrocarbón con gran potencial como adsorbente y un líquido enriquecido en compuestos fenólicos (Gimenez et al., 2020).

Además, el alperujo puede ser utilizado como suplemento nutricional en la dieta de rumiantes, especialmente caprinos y ovinos (Aguirre et al., 2010; Usaquen-Alvarado, 2008). Por otra parte, la fracción orgánica del alperujo tiene potencial para su conversión biológica, tanto para obtener metano como etanol y biodiesel (Najafi et al., 2021; Rincon et al., 2013; Rubio-Senent et al., 2013; Fernandez-Bolaños et al., 2004).

Asimismo, existen trabajos que proponen la utilización del alperujo como abono orgánico. En ellos se indica que la aplicación del alperujo mezclado adecuadamente e incorporado al suelo podría ser efectiva para mantener la fertilidad del mismo (Aguirre et al., 2010; Altieri y Espósito, 2008; Lopez-Pineiro et al., 2008; Lopez-Pineiro et al.,

## Introducción General

2007). De esta manera, se mejoraría la porosidad del suelo lo que conllevaría a un efecto benéfico sobre la retención de agua y la estabilidad estructural de los sustratos (Aguirre et al., 2014; Aguirre et al., 2010).

Contrariamente, otros autores sugieren que la aplicación directa del alperujo como abono, no sería beneficiosa para el suelo, el agua o el crecimiento de las plantas debido a las concentraciones de compuestos fenólicos, sales y materia orgánica que lo constituyen (Ouzounidou et al., 2010; Morillo et al., 2009; McNamara et al., 2008; Andreozzi et al., 2008; Martin et al., 2002). Por ejemplo, la aplicación directa del alperujo, provocaría la inmovilización de N y P del suelo causando el déficit de estos nutrientes en las plantas (Aguirre et al., 2010). En consecuencia, generaría inconvenientes en la germinación de las semillas y el posterior crecimiento de las plántulas, ocasionando la disminución productiva de los cultivos (Aguirre et al., 2010).

Además, los cambios producidos en el suelo por los componentes del alperujo, desequilibrarían el ecosistema microbiano (Vivas et al., 2009). Sin embargo, el tratamiento previo del alperujo con determinados hongos filamentosos saprobios, como los del género *Pleurotus*, disminuyen la fitotoxicidad de este residuo debido a la degradación y/o polimerización de los compuestos fenólicos presentes en el mismo, por lo que representaría una alternativa, si se quiere utilizar al alperujo como fertilizante (Cuestas et al., 2018; Aguirre et al., 2010; Usaquen-Alvarado, 2008).

Por otro lado, existen diversos trabajos que proponen utilizar desechos agroindustriales, entre ellos el alperujo, como sustratos de bajo costo para el crecimiento de microorganismos que pueden producir compuestos de alto valor agregado como: pigmentos, biopolímeros, biosurfactantes, enzimas y pectinas (Pereira-

## Introducción General

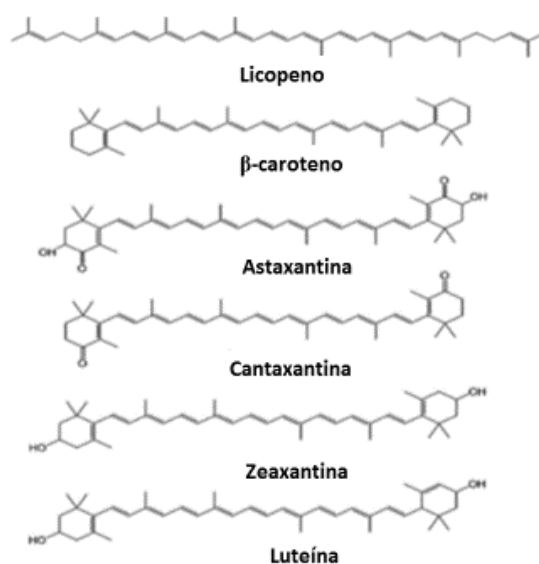
Cipolatti et al., 2019; Dias-Rodrigues et al., 2019; Hussein et al., 2018; Socaci et al., 2017; Borroni et al., 2017; Marova et al., 2012; Jarboui et al., 2012; Aguirre et al., 2010; Morillo et al., 2009; Usaquen-Alvarado, 2008; Davoli et al., 2004; Buzzini y Martini, 1999). Estos productos son de interés para la industria alimentaria, química, cosmética y farmacéutica (Buzzini y Martini, 1999). De esta manera, se estaría reconvirtiendo el alperujo como residuo, obteniendo compuestos de interés económico, a la vez que se contribuiría a disminuir el impacto ambiental que genera.

Los carotenoides son pigmentos liposolubles que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Cheng y Yang, 2016). Hasta el momento, más de 600 carotenoides han sido descritos y caracterizados (Dias-Rodrigues et al., 2019; Arathi et al., 2015; Buzzini et al., 2007). Son compuestos isoprenoides, generalmente formados por 40 átomos de carbono, con una cadena de polienos que contiene un número variable de dobles enlaces conjugados. Esta característica les imparte la propiedad de absorber la luz visible en un amplio rango, brindándole su coloración característica, la cual varía desde el amarillo al rojo (Pereira-Cipolatti, 2019; Rodríguez-Concepcion, 2018). Estos pigmentos también pueden estar asociados con otras moléculas, como ácidos grasos, azúcares y proteínas (Rodríguez-Concepcion, 2018).

Se pueden clasificar de dos maneras diferentes (Fig. 1.9). Dependiendo de la presencia o ausencia de anillos terminales en su estructura pueden ser: carotenoides cíclicos o acíclicos (Rodríguez-Concepcion, 2018). Desde el punto de vista de su composición química, aquellos carotenoides que solamente están formados por átomos de C e H se denominan carotenos, mientras que aquellos que contienen átomos de O, se clasifican como xantófilas (Rodríguez-Concepcion, 2018; Arathi et al., 2015).

## Introducción General

En general, la estructura característica de los carotenoides determina sus propiedades y el potencial de sus funciones biológicas (Pereira-Cipolatti et al., 2019). De esta manera, en los organismos fotosintéticos, su rol está relacionado con ser pigmentos auxiliares de las clorofilas para captar la luz visible. Mientras que, en los organismos no fotosintéticos actúan como compuestos antioxidantes que protegen a las moléculas de formas reactivas de oxígeno y también ejercen la función de ser precursores de la vitamina A (Buzzini et al., 2007).



**Fig. 1.9.** Diferentes estructuras de carotenoides cíclicos y acíclicos (carotenos y xantofilas). (Hernández-Almanza et al., 2014).

Los carotenoides son sintetizados por plantas, algas, levaduras, hongos y bacterias (Arathi et al., 2015; Marova et al., 2012), (Fig. 1.10). Los animales vertebrados y los humanos no pueden sintetizarlos, por lo cual, la única manera de adquirirlos es a través de la dieta (Meléndez-Martínez, 2017). Además, debido a su naturaleza lipofílica, se acumulan en el tejido adiposo (Rodríguez-Concepcion, 2018). En el caso de los animales invertebrados, recientemente se descubrieron genes que codifican enzimas

biosintéticas de carotenoides en algunas especies de artrópodos (Rodríguez-Concepcion, 2018; Meléndez-Martínez, 2017).



**Fig. I.10.** Ejemplos de diferentes organismos que sintetizan carotenoides en la naturaleza.

Los carotenoides, por sus propiedades antioxidantes y algunos por ser precursores de la vitamina A, son biológicamente importantes ya que previenen el daño oxidativo en las membranas lipídicas de las células (Britton, 1998). Es así que, existen varios estudios epidemiológicos y clínicos que han relacionado positivamente una dieta rica en carotenoides con un menor riesgo de padecer deficiencia de vitamina A, algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y la degeneración macular relacionada con la edad (Cassamo et al., 2019; Meléndez-Martínez, 2017; Arathi et al., 2015).

Los pigmentos carotenoides más comercializados son:  $\beta$ -caroteno, Astaxantina, Zeaxantina, Luteína y Licopeno, los cuales son utilizados en diferentes industrias como: alimentaria, farmacéutica, cosmética, química y de piensos (Cassamo et al., 2019; McWilliams, 2018; Cheng y Yang, 2016). Por ejemplo, en la industria alimentaria se emplean como colorantes para poder influenciar la aceptabilidad de algunos alimentos como: margarinas, refrescos y productos horneados (Aksu y Tugba-Eren, 2005). En la industria de piensos se utilizan suplementos de carotenos para dar mayor color a yemas de huevos y a la carne de peces como el salmón, que son criados en cautiverio

(McWilliams, 2018; Rao y Rao, 2007; Mortensen, 2006; Surai et al., 2001). También, en la industria cosmética, se los emplea como aditivos y además como antioxidantes, para tratar el daño celular o tisular. Así mismo, en la industria farmacéutica se emplean carotenos como precursores de la vitamina A y en suplementos nutraceúticos (Aksu y Tugba-Eren, 2005; Surai et al., 2001).

Según McWilliams (2018), el mercado global de carotenoides alcanzó casi \$ 1,5 mil millones en 2017 y debería alcanzar \$ 2 mil millones para 2022; esperándose una tasa de incremento del 5,7% para este período. En la actualidad los carotenoides sintetizados químicamente dominan el mercado y se obtienen a partir del precursor  $\beta$ -ionona, un proceso que representa más del 85% del mercado mundial, especialmente de  $\beta$ -caroteno (Cassamo et al., 2019; Cheng y Yang, 2016). Es importante mencionar que, mediante síntesis química se obtienen mayoritariamente los isómeros *todo-trans* del  $\beta$ -caroteno, mientras que los carotenoides naturales son una mezcla compleja de varios isómeros (Gong y Bassi, 2016).

La demanda de carotenoides naturales aumenta cada año debido a que, por un lado, la síntesis química de estos pigmentos genera contaminantes que no son biodegradables y, por otro lado, los precursores que se utilizan en el proceso tienen efectos cancerígenos según Nigam y Luke, (2016). Además, existe un cambio en las preferencias de los consumidores hacia productos con aditivos naturales en vez de sintéticos. Esto se debe a que los primeros se los considera más seguros para el consumo humano (Lafarga et al., 2020; Rodríguez-Concepcion, 2018; Nigam y Luke, 2016; Thakur y Azmi, 2013). De hecho, varios estudios enfatizaron el riesgo potencial para la salud,

## Introducción General

asociado al consumo de algunos carotenoides sintetizados químicamente (Lafarga et al., 2020; Gong y Bassi, 2016; Patrick, 2000).

Por el contrario, los compuestos naturales ofrecen ventajas como, un menor riesgo de toxicidad y costo de producción (Lafarga et al., 2020). Por lo cual, el conjunto de estos factores hace que la búsqueda y desarrollo del suministro natural de carotenoides, presente interés económico (Cheng y Yang, 2016). De esta manera, en los últimos años, se han generado avances científicos respecto al conocimiento de las rutas biosintéticas de carotenoides, como así también, de diferentes estrategias para potenciar la producción microbiana de estos pigmentos a escala industrial (Lafarga et al., 2020; Cassamo et al., 2019; Thakur y Azmi, 2013; Frengova y Beshkova, 2008; Choudhari et al., 2008; An et al., 1999; López-Nieto et al., 2004; Bhosale, 2004; Kato y Shinomura, 2020; Rodríguez-Concepcion, 2018; Park, 2005; Yoo et al., 2016; Latha et al., 2005; Ferrao y Gang, 2011).

Las microalgas y ciertas especies de hongos filamentosos, como también de levaduras, son utilizadas actualmente para la producción comercial de distintos biocompuestos, entre ellos los pigmentos carotenoides (Nigam y Luke, 2016). En el caso de las levaduras, distintas especies de los géneros *Rhodotorula*, *Phaffia* y *Sporobolomyces*, se las considera importantes productoras de estos pigmentos (Thakur y Azmi, 2013; Frengova y Beshkova, 2008; Libkind et al., 2006; Buzzini et al., 2007; Kot et al., 2018; Zoz et al., 2015; Moliné et al., 2012; Elfeky et al., 2019; Mihalcea et al., 2011; Maldonade et al., 2007; Bhosale y Gadre, 2001).

Marcas como Aquasta<sup>®</sup> y Ecotone<sup>®</sup>, comercializan levadura seca inactivada (ej. *Phaffia rhodozyma*), como fuente natural de carotenoides, proteínas y otros nutrientes.

## Introducción General

Ambos productos se utilizan principalmente, en la Unión Europea, Canadá y EE. UU., como suplementos nutricionales para piensos destinados a salmonicultura, (Cassamo et al., 2019; Frengova y Beshkova, 2008). Asimismo, se utilizan preparados de *Rh. mucilaginoso* sp. inactivada, para suplementar piensos avícolas que promueven, por ejemplo, la mayor pigmentación en la yema de huevos (Cassamo et al., 2019; Surai et al., 2001; Margauth y Meydav, 1968).

Con respecto a las microalgas, producen pigmentos carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, lípidos y proteínas (Gong y Bassi, 2016). Estos compuestos se utilizan para diversas aplicaciones nutraceuticas, alimentarias, cosméticas y también en la industria de piensos (Ranga-Rao, 2013; Rodrigues et al., 2014). Las principales especies de microalgas que se han estudiado como productoras de carotenoides son: *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Botryococcus braunii* (Ranga-Rao, 2013), *Dunaliella salina*, *Chlorella spp* y *Scenedesmus spp.*, (Alhattab et al., 2018; Del Campo et al., 2007). Generalmente sintetizan  $\beta$ -caroteno, Luteína, Licopeno, además de Astaxantina, Zeaxantina y Cantaxantina (Gong y Bassi, 2016).

El cultivo de microalgas presenta ciertas ventajas como, por ejemplo, ciclos de procesamiento y recolección más rápidos que otros organismos (Gong y Bassi, 2016; Rodrigues et al., 2014). Sin embargo, se requieren ciclos de luz y oscuridad, además de un esfuerzo considerable para extraer y recuperar los biocompuestos del interior de las células, debido a la complejidad de la pared celular que presentan estos microorganismos. Esto genera que el costo de producción se eleve (Alhattab et al., 2018). Se han utilizado diferentes métodos químicos, físicos, biológicos y mecánicos para



## Introducción General

la disrupción de la pared celular, ya que su composición depende de la especie y por lo tanto varía notablemente (Alhattab et al., 2018).

En cuanto a los hongos filamentosos, su manejo a gran escala para la producción de carotenoides es difícil, debido a la formación de pellets y agregados asociados con su estructura miceliar (D'Annibale et al., 2006; Surai et al., 2001).

De esta manera, las levaduras constituyen una opción interesante, ya que su pared celular no es tan compleja ni tan rígida, como las de las microalgas, lo que facilita la recuperación de productos bioactivos (Cabib y Roberts, 1982; Damiani, 2010; Scodelaro y Bilbao, 2016). Así mismo, las levaduras debido a su estructura unicelular, ofrecen una importante ventaja para su manejo a gran escala, en comparación a los hongos filamentosos (D'Annibale et al., 2006; Surai et al., 2001). Además, presentan una tasa de crecimiento alta, son de fácil incubación y las fuentes de carbono que necesitan son sencillas en comparación a las de otros microorganismos, pudiendo utilizar medios de cultivo de bajo costo (Malisorn y Suntornsuk, 2008; Cheng y Yang, 2016; Dias-Rodrigues et al., 2019).

Las levaduras tienen un gran potencial como biocatalizadores, debido a la transformación que realizan de diferentes fuentes de carbono a metabolitos primarios y secundarios (Mannazzu et al., 2015). Además, presentan tolerancia a compuestos inhibidores que pueden estar presentes en los sustratos que se utilizan para su crecimiento como por ejemplo, los compuestos fenólicos que componen al alperujo (Mannazzu et al., 2015; Albuquerque et al., 2004). De esta manera, las levaduras tienen la posibilidad de desarrollarse bajo diferentes factores de estrés en comparación a otros organismos (Mannazzu et al., 2015).

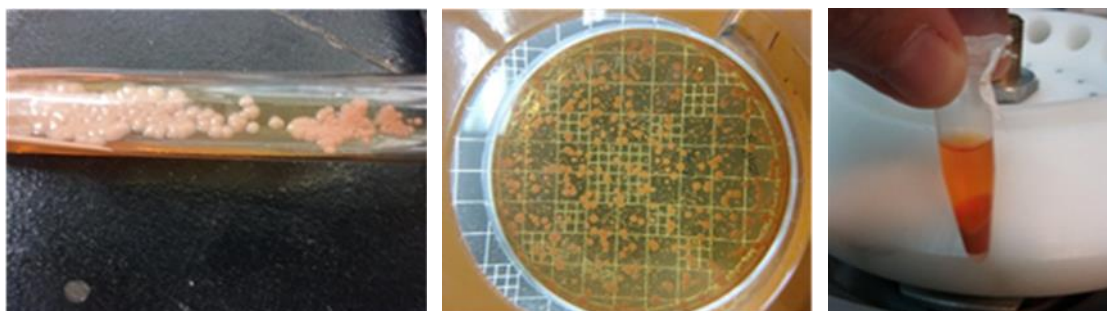
## Introducción General

Durante su desarrollo bajo condiciones desfavorables, se producen diferentes clases de sustancias que incluyen triglicéridos y compuestos antioxidantes, como los carotenoides (Marova et al., 2004). De hecho, la carotenogénesis está involucrada en las respuestas al estrés (Mannazzu et al., 2015; Damiani, 2010). Las células de levadura expuestas a estrés leve pueden desarrollar tolerancia no solo a dosis más altas del mismo estrés, sino también al causado por otros agentes. Este fenómeno se conoce como protección cruzada y sugiere la existencia de un mecanismo integrador de respuesta al estrés en levaduras (Marova et al., 2004).

Las levaduras rojas son un conjunto diverso de organismos no relacionados entre sí filogenéticamente, aunque por lo general pertenecen al filo Basidiomycotas, que incluye a los géneros *Phaffia*, *Sporidiobolus* y *Rhodotorula* (Dias-Rodrigues et al., 2019; Cheng y Yang, 2016; Mannazzu et al., 2015; Davoli et al., 2004; Frengova et al., 1997).

Las células vistas al microscopio óptico, generalmente son lisas y sus colonias a simple vista, se las identifica por su color rosado-anaranjado y rojo, debido a la presencia de pigmentos carotenoides (Ungureanu et al., 2012). Por lo general, estos pigmentos son producidos en abundancia por este grupo de levaduras, en concentraciones típicas que varían de 50 a 350  $\mu\text{g. g}^{-1}$  en peso seco. Un ejemplo de ello, son las cepas del género *Rhodotorula* (Davoli et al., 2004). Las especies de este género, son levaduras aerobias estrictas, productoras de carotenoides y lípidos durante la fase estacionaria de crecimiento (Fig. I.11) (Hernandez-Almanza et al., 2014).

Los principales carotenoides sintetizados por las levaduras del género *Rhodotorula* son  $\beta$ -caroteno, toruleno,  $\gamma$ -caroteno y torularodina (Fig. I.12) (Hernandez-Almanza et al., 2014; Ungureanu et al., 2012; Davoli et al., 2004).



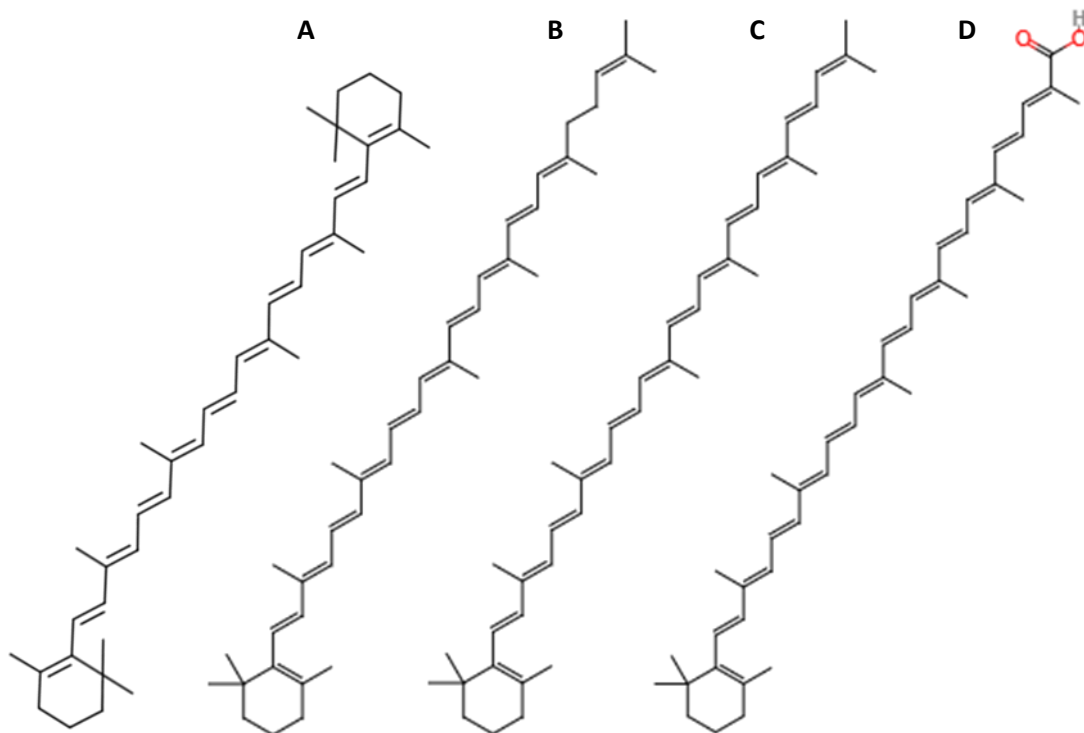
**Fig. I.11.** Colonias de *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638 y suspensión de carotenos extraídos.

Los tres primeros pigmentos son carotenos, mientras que la torularodina es una xantófila (Fig. I.12), (Kot et al., 2018). Tanto el toruleno como la torularodina, presentan un anillo de  $\beta$ -ionona conectado a la cadena de polieno (Fig. I.12), además debido a la presencia de trece dobles enlaces, estos compuestos tienen fuertes propiedades antioxidantes (Ávalos y Limón, 2017).

El rendimiento de la biosíntesis de carotenoides y la proporción de cada tipo de pigmento que se producen, dependen de la composición del medio y de parámetros de cultivo como pH, aireación y temperatura (Kot et al., 2018; Aksu y Tugba-Eren, 2005; Schneider et al., 2013). Estas variables afectan no solamente, a la cantidad de carotenoides totales producidos, sino también la proporción de  $\beta$ -caroteno, toruleno y torularodina sintetizados (Kot et al., 2018; Zoz et al., 2015; Ungureanu et al., 2012).

Estudios iniciales han confirmado propiedades anticancerígenas, actividad de pro-vitamina A y antimicrobiana en toruleno y torularodina y hasta el momento no se han comprobado efectos tóxicos en roedores (Du et al., 2016; Latha y Jeevaratanm, 2012). De esta manera, debido a su estructura química, propiedades biológicas y la gama de color que exhiben, probablemente el toruleno y la torularodina se puedan utilizar con éxito como aditivos alimentarios, cosméticos y también en componentes de

medicamentos (Kot et al., 2018; Zoz et al., 2015). Sin embargo, la producción y uso de toruleno y torularodina aún se encuentra en etapa de desarrollo (Zoz et al., 2015).



**Fig. I.12.** Estructuras químicas: A) β-caroteno. B) γ-caroteno C) toruleno D) torularodina (Meléndez-Martínez, 2017)

Aunque la tecnología para la bioproducción de carotenoides está desarrollada, uno de los mayores obstáculos es el alto costo que presentan los sustratos empleados, ya que encarecen el proceso de obtención (Cheng et al., 2016). Una forma de abaratarlos es el uso de subproductos y excedentes agroindustriales como fuente de carbono económica. De esta manera, no solo el costo de producción disminuye, sino que también reduce el impacto que generan en el ambiente este tipo de residuos, además de poder recuperar, a partir de ellos, compuestos de interés económico (Buzzini et al., 2007; Aksu y Tugba-Eren, 2005; Cheng y Yang, 2016; Borroni et al., 2017; Hernandez-Almanza et al., 2014; Aguirre et al., 2010; Pereira-Cipolatti et al., 2019; Dias-Rodrigues et al., 2019).

## Introducción General

El objetivo general de esta Tesis es, analizar el uso de levaduras del género *Rhodotorula* para la producción de carotenoides utilizando desechos de la industria olivícola como medio de crecimiento.

## Bibliografía

- Aguirre, M., Ottogali, J.M., et al. "Evaluation of Cation and Anion Leaching in a Soil after Treatment with alperujo." *Acta Horticulturae.*, no. 1057 (2014): 321–328.
- Aguirre, M.E., Elisei, V.R., et al. «Reutilización de los subproductos de la industria olivarera.» *AgroUNS (EdiUNS)*, nº 13 (2010): 16-19.
- Aksu, Z., & Tugba-Eren, A. "Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source." *Process Biochemistry* 40 (2005): 2985–2991.
- Alburquerque, J.A., Gonzalez, J., et al. "Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction." *Bioresource Technology*, no. 91 (2004): 195–200.
- Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A., et al. "Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition." *Journal of Applied Phycology*, 2018.
- ALCUE Net, Latin America, Caribbean and European Union Network. «Oportunidades para la agricultura y la agroindustria.» *Bioeconomía en América Latina y el Caribe*. Santiago de Chile, 2015. 6.
- Aliyu, S., & Bala, M. "Brewer's spent grain: A review of its potencial and applications." *African Journal of Biotechnology* 10, no. 3 (2011): 324-331.
- Altieri, R., & Esposito, A. " Olive orchard amended with two experimental olive mill wastes mixtures: effects on soil organic carbon, plant growth and yield." *Bioresource Technology*. 99, no. 17 (2008): 8390-8393.
- Alvarez, V.A. «Los Biomateriales y los Bioinsumos.» Video clase, dentro del marco del Curso de la BCBA: Bioeconomía Conceptos Generales. Edición 5 (2021)., CCT CONICET , Mar del Plata. Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de materiales (INTEMA), Mar del Plata., 2020.
- An, G.H., Cho, M.H., et al. "Monocyclic Carotenoid Biosynthetic Pathway in the Yeast *phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*)." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88, no. 2 (1999): 189-193.
- Andreozzi, R. M., Canterino, I., et al. "Effect of combined physico-chemical processes on the phytotoxicity of olive mill wastewaters." *Water Research*, 2008: 1684 – 1692.
- Anlló, G. «Comentarios Conceptuales sobre la Bioeconomía.» clase teorica virtual en el marco del Curso de Bioeconomía, de la Bolsa de cereales de C.A.B.A., Grupo de Bioeconomía., Bolsa de Cereales de Buens Aires., Ciudad Autónoma de Bs. As., 2021.
- Aranda, E., Sampedro, I., et al. "Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth." *International Biodeterioration & Biodegradation*, no. 58 (2006): 176-179.
- Arathi, B.P., Sowmya, R.R., et al. "Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects." *Trends in Food Science & Technology.*, no. 45 (2015): 105-117.

## Introducción General

- Ávalos, J., & Limón, M.C. «Biosíntesis de carotenoides en Hongos.» Cap. 15 de *Carotenoides en agroalimentación y salud.*, de A.J. Meléndez-Martínez, 280-311. Madrid: Editorial Terracota, SA de CV., 2017.
- Berbel, J., Gutiérrez-Martín, C., et al. «Valorización de los subproductos de la cadena del aceite de oliva. .» *Mediterráneo Económico.*, nº 32 (06 2018): 273-289.
- Bhosale, P. "Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms." *Appl Microbiol Biotechnol.*, no. 63 (2004): 351–361.
- Bhosale, P.B., & Gadre, R.V. "Production of B-carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*." *Appl Microbiol Biotechnol.* 55 (2001): 423-427.
- Bisang, R., & Trigo, E. *Los Inductores del desarrollo de la Bioeconomía. Bioeconomía Argentina: Modelos de Negocios para una nueva matriz productiva.* Informe Técnico, Grupo de Bioeconomía., Bolsa de Cereales de Buenos Aires. Grupo Bioeconomía. Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación., Ciudad Autónoma de Bs As. (CABA): Bolsa de Cereales de Buenos Aires. Grupo de Bioeconomía. Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación., 2017, 52.
- Bisignano, G., Tomaino, T., et al. "On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol." *J. Pharm. Pharmacol.*, no. 51 (1999): 971-974.
- Borroni, V., Gonzalez, M.T., & Carelli, A.A. "Bioproduction of carotenoid compounds using two-phase olive mill waste as the substrate." *Process biochemistry*, 2016: 1-7.
- Britton, G., & Liaaen-Jensen, S. *Carotenoids*. Vol. 3. Boston, 1998.
- Buzzini, P., & Martini, A. "Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin." *Bioresource Technology* 71 (1999): 41-44.
- Buzzini, P., Innocenti, M., et al. "Carotenoids Profiles of yeast belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*." *Can. J. Microbiol.*, no. 53 (2007): 1024-1031.
- Cabib, E., & Roberts, R. "Synthesis of the yeast cell wall and its regulation." *Ann. Rev. Biochem.*, no. 51 (1982): 763-93.
- Cassamo, U.M., Winterburn, J., et al. "Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms." *Applied Microbiology and Biotechnology.*, no. 103 (2019): 1095–1114.
- Ceci, L.N., Pezzuti, A., et al. «Aceites de oliva vírgenes producidos en la Costa Atlántica Argentina. Calidad Química y Sensorial.» *A&G 2*, nº 115 (2019): 294-302.
- Çelik, G., Saygın, O., et al. "Multistage recovery process of phenolic antioxidants with a focus on hydroxytyrosol." *Separation and Purification Technology.*, 2020.
- Chavarría- Miranda, H. «Comentarios Conceptuales Bioeconomía.» Clase: definición de Bioeconomía. Capacitación: Bioeconomía Conceptos generales. Edición 5. (Bolsa de Cereales de Bs. As.), 2019.
- Cheng, Y.T., & Yang, C.F. "Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.*, no. 61 (2016): 270-275.

## Introducción General

- Choudhari, S.M., Ananthanarayan, I., et al. "Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of b-carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896." *Bioresource Technology*, no. 99 (2008): 3166–3173.
- Coremberg, A. «Medición de la cadena de valor de la bioeconomía en Argentina: Hacia una cuenta satélite.» Informe técnico., Grupo de Bioeconomía, Bolsa de cereales de Bs.As & Secretaría de Agroindustria, Ministerio de producción y trabajo., Ciudad Autónoma de Bs. As. (CABA), 2019, 31.
- Costa, R. «El impacto de la Bioeconomía en Argentina.» Clase virtual, dentro del marco del Curso de la BCBA: Bioeconomía Conceptos Generales. Edición 5 (2021)., Dpto. de Economía., Bolsa de Cereales de Bs. As, Ciudad Autónoma de Bs. As., 2015, 17.
- Cuestas, J.M., Gartner, K., et al. «Análisis del uso potencial del residuo sólido de la producción de aceite de oliva en el cultivo de hongos ligninolíticos.» *I Convención Internacional para la Producción de Hongos Comestibles y Medicinales*. Buenos Aires: Mincyt (Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación Argentina.) CONICET, CERZOS, IIB-INTECH, UNS, UNSAM, 2018. 1.
- Damiani, M.C. «*Haematococcus pluvialis* (CHLOROPHYTA): Biología, ultraestructura y evaluación del contenido lipídico para la obtención de Biodiesel.» *Tesis Doctor en Biología Universidad Nacional del Sur (UNS)*. Bahía Blanca, Buenos Aires: Repositorio Digital (UNS), 05 de Noviembre de 2010.
- D'Annibale, A., Sermanni, G.G., et al. "Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production." *Bioresource technology* 97, no. 15 (2006): 1828-1833.
- Davoli, P., Mierau, V., et al. "Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus*." *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, no. 4 (2004): 392–397.
- de Domingo, H.C. «El mercado del aceite de oliva. Caso especial de su exportación.» Tesis de grado., Facultad de Economía y Empresa, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2019, 42.
- Del Campo, J.A., García-González, M., et al. "Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives." *Appl Microbiol Biotechnol.*, no. 74 (2007): 1163–1174.
- Dellagrecia, M., Monaco, P., et al. "Phytotoxicity of Low Molecular Weight Phenols from Olive Mill Waste Waters." *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, no. 67 (2001): 352–359.
- De Marco, E., Savarese, M., et al. «Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters.» *Food Chemistry (Analytical, Nutritional and Clinical Methods)*, nº 104 (2007): 858-867.
- Dias-Rodrigues, T.V., Amore, T.D., et al. "Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts." *Food Technology & Biotechnology* 3, no. 57 (2019): 388-398.
- dos Santos, T., Morenston, P. et al. "Solid wastes in Brewing process: a Review,." *Journal of brewing and destiling* 5, no. 1 (2014): 1-9.



## Introducción General

- Du, Ch., Li, Y., et al. "The suppression of torulene and torularhodin treatment on the growth of PC-3 xenograft prostate tumors." *Biochem Biophys Res Commun.*, no. 469 (2016): 1146-1152.
- Elfeky, N., Elmahmoudy, M., et al. "Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* with a Combined Cultivation Mode of Nitrogen, Sulfur, and Aluminium Stress." *Applied sciences*, no. 9 (2019): 2-19.
- Elisei, V.R., Aguirre, M.E., et al. «El desafío de la olivicultura en el Sudoeste bonaerense.» *AgroUNS*. (Departamento Agronomía.) IV, nº 7 (2007): 11-14.
- Elizondo, M. *9vo Simposio del Sur al Mundo: "Alimentos e insumos frente a la crisis geopolítica global"*. Buenos Aires, Buenos Aires, 05 de 05 de 2022.
- Esteban-Torrente, S. «Aprovechamiento de los subproductos generados en la industria cervecera.» Tesis de fin de grado, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, España, 2019, 1-20.
- European Regional Development Fund. «Horizonte 2020 – La financiación de la UE de la investigación y el desarrollo tecnológico para el sector agroalimentario.» Informe Técnico, 2013, 8.
- Fermoso, F.G., Serrano, A., et al. "Valuable Compound Extraction, Anaerobic Digestion, and Composting: A Leading Biorefinery Approach for Agricultural wastes." *J. Agric. Food Chem.*, no. 66 (2018): 8451–8468.
- Fernandez-Bolaños, J., Rodríguez, G., et al. "Total Recovery of the Waste of Two-Phase Olive Oil Processing: Isolation of Added-Value Compounds." *J. Agric. Food Chem.* 52, no. 19 (2004): 5849-5855.
- Ferrao, M., & Garg, S. "Studies on effect of media components on growth and carotene production by *Rhodotorula graminis* RC-04." *Journal of cell and Tissue Research* 11, no. 1 (2011): 2551-2556.
- Frengova, G., & Beshkova, D.M. "Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, 2008: 1-43.
- Frengova, G., Simova, E., et al. "Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, no. 18. (1997): 272–277.
- Galanakis, C.M., Tsatalas, P., et al. "Control of microbial growth in bakery products fortified with polyphenols recovered from olive mill wastewater." *Environmental technology & innovation.*, no. 10 (2018): 1-15.
- Gatti, M.G., & González, L.A. *Caracterización de suelos del partido de Coronel Dorrego. Comparación de dos perfiles bajo un mismo cultivo y manejo*. Tesina de Grado: Técnico superior de suelos y agua., Departamento de Agronomía., UNS, Bahía Blanca.: EdiUNS, 2009, 87.

## Introducción General

- Ghilardi, C., Sanmartin-Negrete, P., Carelli, A.A., & Borroni, M.V. "Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*." *Bioresour. Bioprocess.* 7, no. 52 (2020): 2-11.
- Ghilardi, C., Sanmartin-Negrete, P., Rodríguez- Gutierrez, G., et al.,. "Influence of olive mill waste phenolic compounds levels on carotenoid production by *Rhodotorula* spp." *Process Biochemistry*, no. 120 (2022): 275–286.
- Gimenez, M., Rodríguez, M., Montoro, et al., "Two phase olive mill waste valorization. Hydrochar production and phenols extraction by hydrothermal carbonization." *Biomass and Bioenergy*, no. 143 (2020): 105875.
- Gong, M., & Bassi, A. "Carotenoids from microalgae: A review of recent developments." *Biotechnology Advances.*, no. 34 (2016): 1396-1412.
- González, G., Tedesco, L., et al. «Evolución del entorno de negocios y análisis económico de la producción de aceite de oliva virgen extra en el Sudoeste Bonaerense.» *Revista de la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, UNMDP.*, nº 47 (2016): 63-79.
- González-Álvarez, J. «La biorrefinería- Concepto y Tipos. Nivel II. Capacitación: Biorrefinerías.» *Las biorrefinerías: aplicación a materiales y residuos lignocelulósicos. Horizonte 2050.* Editado por Bolsa de Cereales de Bs. As. Ciudad Autónoma de Bs. As., Buenos Aires, 15 de 06 de 2021.
- Guilbert, H. R., Howell, C. E., et al. "Vitamin A requirements of animal species." *Journal of Nutrition.* 19 (1940): 91-103.
- Hernandez-Almanza, A., Montañez-Sáenz, J., et al. "Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation." *Food Bioscience.* 7 (2014): 31–36.
- Hussein, M.S., Abdelhafez, A.A., et al. "Optimization of  $\beta$ -Carotene Production from *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 Growing on Agro-industrial Substrate Using Plackett–Burman Design." *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 4, no. 88 (2018): 1637-1646.
- INDEC, I. (2021). Censo Nacional Agropecuario 2018. Argentina.
- Informe Olivícola 2021. *Elaborado por Federación Olivícola Argentina (FOA).* <http://federacionolivilaargentina.com.ar/informes-anales/> Visitada el 22/02/2023.
- IOC, International Olive Council. *Country Profiles: Argentina.* Economic Affairs & Promotion Unit., Madrid: International Olive Council., 2012, 1-8.
- IOC, International Olive Council. «Estudio Internacional sobre los costes de producción del aceite de oliva: Resultados, Conclusiones y recomendaciones.» Madrid: International Olive Council., 2015, 41.
- IOC, International Olive Council. *Key Figures on the WorldMarket for olive oils.* Madrid: International Olive Council (IOC), 2018, 1.
- IOC, International Olive Council. <https://www.internationaloliveoil.org/el-mundo-del-olivo/el-olivo/> (último acceso el 06-04-2020).
- Jarbouia, R., Baatia, H., et al. "Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginosa*." *Environmental Technology.* 33, no. 8 (2012): 951–960.

## Introducción General

- Kato, S. & Shinomura, T. "Carotenoid Synthesis and Accumulation in Microalgae Under Environmental stress." Chap. 4 in *Pigments from Microalgae Handbook.*, by E. Queiroz, M.I. & Queiroz-Lopes, L. Jacob-Lopes, 635. Cham, : Springer., 2020.
- Kittler, M.G. «Productividad de un olivar de la variedad Nevadillo por diferentes dosis de riego en el sudoeste Bonaerense.» Editado por Matias E. Duval, María R. Landriscini y Liliana Suñer. Juan A. Galantini. *Libro de Actas III Jornadas Nacionales de Suelos de Ambientes Semiáridos y II Taller Nacional de Cartografía Digital.* Bahía Blanca: AACS (Asociación Argentina Ciencia del Suelo)., 2017. 123-129.
- Kot, A.M., Błażejczak, S. & Gientka, I., et al. "Torulene and torularhodin: "new" fungal carotenoids for industry?" *Microb Cell Fact.* 17, no. 49 (2018): 1-14.
- Kotlar, C.E., Ponce, A.G., et al. "Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically." *LWT - Food Science and Technology*, no. 50 (2013): 378-385.
- Lafarga, T., Clemente, I., et al. "Carotenoids from microalgae." Chap. 5 in *Carotenoids: Properties Processing and Applications.*, by M.Ch. Galanakis, 149-187. : Academic Press., 2020.
- Latha, B.V., Jeevaratnam, K., et al. "Influence of growth factors on carotenoid pigment of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source." *Indian Journal of Biotechnology.* 4 (julio 2005): 353-357.
- Latha, V.B., & Jeevaratanm, K. "Thirteen-week oral toxicity study of carotenoid pigment from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY in rats." *Indian Journal of Experimental Biology* 50 (2012): 645-651.
- Libkind, D., & van Broock, M. "Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeast." *World Journal of Microbiology & Biotechnology.*, 2006: 687-692.
- Lin, Y., Jain, R. & Yan J. "Microbial production of antioxidant food ingredients via metabolic engineering." *Current Opinion in Biotechnology*, no. 26 (2014): 71–78.
- Linares, A., Caba, J.M., et al. "Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavido-alba*." *Chemosphere.*, no. 51 (2003): 887–891.
- López-Nieto, M.J., Costa, J., et al. "Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*." *Appl Microbiol Biotechnol.*, no. 66 (2004): 153-159.
- Lopez-Pineiro, A., Albarran, A., et al. "Short and medium Term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and oil properties under semi-arid mediterranean conditions." *sBiores. Technol.*, no. 99 (2008): 79-82.
- Lopez-Pineiro, A., Murillo, S., et al. «Changes in organic matter and residual effect of amendment with two-phase olive-mill waste on degraded agricultural soils.» *Sci. Tot. Environ.*, nº 378 (2007.): 84-89.
- Lynch, M., Steffen, E.J., et al. "Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health." *Institute of Brewing & Distilling*, 2016: 16.
- Maldonado, I.R., Scamparini, A.R., et al. "Selection and characterization of carotenoids-producing yeast from campinas Region, Brazil." *Brazilian Journal of Microbiology.*, no. 38 (2007): 65-70.

## Introducción General

- Malisorn, C. & Suntornsuk, W. "Optimization of B-Carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine." *Bioresource Technology.*, no. 99 (2008): 2281–2287.
- Mannazzu, I., Lopes-da Silva, T., et al. "Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeast of biotechnological interest." *World J Microbiol Biotechnol.*, 2015.
- Margauth, P. & Meydav, S. "Some observations on the carotenogenesis in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*." *Phytochemistry.* 7, no. 5 (1968): 761-766.
- Marova, E., Breierova, E., et al. "Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeast." *Annals of Microbiology* 1, no. 54 (2004): 73-85.
- Marova, M., Carnecka, A., et al. «Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production.» *Journal of Environmental Management* 95 (2012): 338-342.
- Martin, J., Sampedro, I., et al. "Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues." *Soil Biology & Biochemistry* 34 (2002): 1769–1775.
- McNamara, J.Ch., Anastasiou, Ch.C., et al. "Bioremediation of olive mill wastewater." *International Biodeterioration & Biodegradation.*, no. 61 (2008): 127-134.
- McWilliams, A. *The Global Market for Carotenoids*. Economic Report., BCC Research Report Overview., bcc Research LLC, 2018.
- Meléndez-Martínez, A.J. «Carotenoides: Estructura, Propiedades y Funciones.» Cap. 1 de *Carotenoides en agroalimentación y salud.*, de A.J. Meléndez-Martínez, 12-31. Madrid: Editorial Terracota, SA de CV., 2017.
- Mihalcea, A., Ungureanu, C., et al. "The Influence of Operating Conditions on the Growth of the Yeast *Rhodotorula Rubra* ICCF 209 and on Torularhodin Formation." *REV. CHIM.* 62, no. 6 (2011): 1-7.
- Ministerio de Economía de España. «Estrategia española de Bioeconomía. Horizonte 2030.» Informe Técnico., Gobierno de España, Ministerio de Economía. Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación., 2015, 46.
- Moliné, M., Libkind, D., et al. "Production of Torularhodin, Torulene, and  $\beta$ -Carotene by *Rhodotorula* yeast." Chap. 13 in *Microbial Carotenoids from fungi. Methods and Protocols.*, by J.L. Barredo, 285. León: Springer, 2012.
- Monetta, P. & Ibañez, A. "Preliminary Results of Soil Biological and Chemical Properties after land spreading Alperujo in Intensively-Managed Olive Orchards in San Juan, Argentina." Edited by Vita Serman F. et al. *Acta Hort.*, 2014: 693-700.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., et al. "Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes." *Appl. Microbiol. Biotechnology.*, no. 85 (2009): 25-39.
- Mortensen, A. "Carotenoids and other pigments as natural colorants." *Pure and Applied chemistry* 8, no. 78 (2006): 1477-1491.

## Introducción General

- Mussio, D.F., Ceci, L., N., et al. «Recuperación de biofenoles en alperujo con diferentes solventes.» *III Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos (RITEQ)*. Córdoba, 2014. 50-52.
- Mussio, D., Ceci, L.N., et al. «Recuperación de Biofenoles de Alperujo con diferentes solventes.» *XVI CYTAL*. Mar del Plata, Argentina., 2017. 1-7.
- Najafi, E., Castro, E., & Karimi, K. "Biorefining for olive wastes management and efficient bioenergy production." *Energy Conversion and Management*, no. 244 (2021): 114467.
- Nigam, P.S., & Luke, J.S. "Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties." *Current Opinion in Food Science.*, no. 7 (2016): 93–100.
- Nimo, M. «Los alimentos y la Bioeconomía.» Video clase, dentro del marco del Curso de la BCBA: Bioeconomía Conceptos Generales.Edición 5 (2021)., Industrias de Productos Alimenticios (COPAL) y Secretaria Técnica en la Alianza Latinoamericana de Asociaciones de la Industria de Alimentos y Bebidas, Ciudad Autónoma de Bs.As., 2020.
- Ntougias, S., Bourtzis, K., et al. «The Microbiology of Olive Mill Wastes.» *BioMed Research International* 2013 (2013): 1-16.
- Ouzounidou, G., Zervakis, G.I., et al. "Raw and Microbiologically Detoxified Olive Mill Waste and their Impact on Plant Growth." *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology.*, no. 4 (2010): 21-38.
- Panesar, R., Kaur, S., et al. "Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review." *Food Science (Issue on Food bioprocessing)* , no. 1 (2015): 70-76.
- Park, P.K., Cho, D.H, et al. "Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design." *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, no. 21 (2005): 429-434.
- Patermann, Ch. «Una vision Europea de la Bioeconomía.» Video clase, dentro del marco del Curso de la BCBA: Bioeconomía Conceptos Generales.Edición 5 (2021)., Grupo de Bioeconomía, Bolsa de Cereales de Bs.As. , Bonn (Alemania), 2021.
- Patrick, L. "Beta-Carotene: The Controversy Continues." *Alternative Medicine Review.* 5, no. 6 (2000): 530.
- Pereira-Cipolatti, E., Diaz-Remedia, R., et al. "Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.*, no. 20 (2019): 101-208.
- Postemsky, P.D., & Curvetto, N.R. "Solid-state fermentation of cereal grains and sunflower seed hulls by *Grifola gargar* and *Grifola sordulenta*." *International Biodeterioration & Biodegradation.* (Elsevier), no. 100 (2015): 52-61.
- Ranga-Rao, A., Baskaran, V., et al. "In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass-A repeated dose study." *Food Research International*, no. 54 (2013): 711–717.
- Rao, A.V., & Rao, L.G. "Carotenoids and human health." *Pharmacological research* 55, no. 3 (2007): 207-216.

## Introducción General

- Ravindran, R., Jaiswal, S., et al. "A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of Brewer's spent grain." *Bioresource Technology.*, no. 248 (2018): 272–279.
- Rincon, B., Bujalance, L., et al. "Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: Influence of thermal pretreatment on the process kinetics." *Bioresource Technology*, no. 140 (2013): 249–255.
- Rodrigues, D.B., Flores, E.M., et al. "Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes." *Food Research International*, no. 65 (2014): 144–148.
- Rodríguez, A.G., Mondaini, A.O., et al. *Bioeconomía en América Latina y el Caribe. Contexto global y regional y perspectivas. Serie: Desarrollo Productivo.* Santiago de Chile.: Comisión Económica para América Latina (CEPAL), Naciones Unidas., 2017.
- Rodríguez-Concepcion, M., Avalos, J., et al. "A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health." *Progress in Lipid Research.*, no. 70 (2018): 62-93.
- Rodríguez-Gutierrez, G. & Monetta, P. «Subproductos del olivar: Recuperación de compuestos fenólicos. Experiencias en España y Argentina.» *Ciclo virtual de seminarios internacionales: Avances en olivicultura y elaiotecnia.* INTA, CRILLAR-CONICET, CREA, UNDeC, Chile OLIVA, Min. Agric, Gand y Pesca de la Rep.Arg. San Juan, San Juan, 8 de julio de 2021.
- Rubio-Senent, F., Lama-Muñoz, A., et al. "Isolation and Identification of Phenolic Glucosides from Thermally Treated Olive Oil Byproducts." *Journal of Agricultural and food chemistry* 61 (2013): 1235–1248.
- Sánchez-Sánchez, C., González-González, A., et al. "Two-phase Olive mill waste: A circular economy solution to an imminent problem in Southern Europe." *Journal of Cleaner Production*, no. 274 (2020): 1-10.
- Saparrat, M.C., Rocca, M., et al. "Celtis tala and Scutia buxifolia leaf litter decomposition by selected fungi in relation to their physical and chemical properties and lignocellulolytic enzyme activity." *European Journal of Soil Biology.* 44, no. 4 (2008): 400-4007.
- Schneider, T., Graeff-Hönniger, S., et al. "Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents." *Energy*, no. 61 (2013): 34-43.
- Sharma, R., & Ghoshal, G. "Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach." *Biotechnology Reports*, no. 25 (2020).
- Scodelaro, P.G., Damiani, M.C., et al. "Haematococcus pluvialis as a source of fatty acids and phytosterols: potential nutritional and biological implications." *J Appl Phycol.*, 2016.
- Socaci, S.A., Fărcas, A., et al. "Food Wastes as Valuable Sources of Bioactive Molecules." Chap. 4 in *Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*, by N. & Waisundara, V. Shiomi. Rijeka,: ItechOpen, 2017.

## Introducción General

- Suarez, M., Romero, M.P., et al. "Development of a Phenol-Enriched Olive Oil with Phenolic Compounds from Olive Cake." *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010): 10396–10403.
- Subsecretaria de programación Microeconómica. *Informes de cadenas de Valor. Olivicultura. Económico/Productivo.*, Secretaría de Política Económica., Ministerio de Hacienda de la República Argentina., Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA): Presidencia de la Nación., 2018, 23.
- Surai, P.F., Speake, B. K., et al. "Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk." *The Journal of Poultry Science* 1, no. 38 (2001): 1-27.
- Takaç, S., & Karakaya, A. "Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater." *Recent Patents on Chemical Engineering.* 2, no. 3 (2009): 230-237.
- Tedesco, L. & Sofía, M. «El cluster de olivos del sudoeste bonaerense. Caracterización e impacto de la pandemia sobre el sector.» *Cuyonomics. Investigaciones en Economía Regional.* 5, nº 8 (2021): 12-27.
- Thakur, M., & Azmi, W. "Nutraceutical B-carotene from natural non conventional sources and its applications." *Annals of Phytomedicine.* 1, no. 2 (2013): 59-73.
- Trigo, E. J. «Las bases conceptuales de la bioeconomía.» *Clase número 1. Clase virtual Conceptos Básicos de Bioeconomía. Edición 5.* Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Buenos Aires.: Bolsa de cereales de Buenos Aires., 2021. 10.
- Trigo, E., Regúnaga, M., et al. «Distintas situaciones (Países) frente a la Bioeconomía.» *Lectura técnica, Grupo de Bioeconomía., Bolsa de Cereales de Bs.As., Ciudad Autónoma de Bs. As., 2020, 2.*
- Trigo, E.J., Morales, E.V., et al. «Bioeconomía Argentina. Visión desde Agroindustria.» *Técnico,* Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación Argentina., Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2017.
- UE Proyecto BioStep. *Modelando juntos la Bioeconomía.* Editado por B., Griestop, L. & Wirscjing, S. Mannhardt. Berlín: biostep\_project, 2015.
- Ungureanu, C., Ferdes, M., et al. "Torularhodin Biosynthesis and Extraction by Yeast cells of *Rhodotorula rubra*." *REV. CHIM.* 63, no. 3 (2012): 316-318.
- Usaquen-Alvarado, S.M. «Aprovechamiento y valorización del alpeorajo tratado térmicamente como: fertilizante biológico y fuente de Hidroxitirosol.» *Tesis de grado para optar por el título de Microbiólogo Industrial.* Granada, Granada: Pontificia Universidad Javeriana, 10 de Enero de 2008.
- Visioli, F., Poli, A., et al. "Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil." *Medicinal Research Reviews.* 22, no. 1 (2002): 65-75.
- Vivas, A., Moreno, B., et al. «Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial.» *Bioresource Technology* 100 (100 2009): 1319–1326.
- von Braun, J. Video clase, en el marco del Curso de la BCBA: Bioeconomía Conceptos Generales. Edición 5 (2021)., University of Bonn/German Bioeconomy Council., Bonn, Alemania., 2021.

## Introducción General

- Yoo, A.Y., Alnaeeli, M.K., et al. "Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01." *Process Biochemistry.*, no. 51 (2016): 463-473.
- Zapiola, M.L. «Capacitación en Biotecnología 2022. Virtual. ArgenBio.» *Introducción a la biotecnología tradicional y moderna*. Audiovisual. . ArgenBio. Buenos Aires, Buenos Aires, 18 de Mayo de 2022.
- Zoz, L., Carvalho, J.C., et al. "Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics a Review." *Brazilian archives of biology and technology*. 58, no. 2 (2015): 278-288.



# Materiales y Métodos

## Materiales y Métodos

### 1.1. Materiales

Todos los reactivos empleados fueron de la marca Anedra (Buenos Aires, Argentina), excepto los que se listan a continuación. El reactivo de Folin Ciocalteu fue de Biopack (Buenos Aires, Argentina). El hexano, el acetato de etilo, la acetona, el dimetilsulfóxido, el ácido sulfúrico y el hidróxido de sodio fueron de Cicarelli (Santa Fe, Argentina). El tartrato de sodio y potasio y el sulfato cuproso fueron de Mallinckrodt Chemical (Dublin, Irlanda). El extracto de levadura, la peptona de soja y la glucosa bacteriológica fueron de Laboratorios Britania (Buenos Aires., Argentina). El medio agar extracto de lavadura y malta (YM) (extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona de soja 5 g/L, glucosa 10 g/L) fue de Difco, Becton y Dickinson Company (Sparkes, MD, EE. UU.). La antrona, el imidazol, el ácido cafeico, el  $\beta$ -caroteno y la seroalbúmina bovina (BSA) fueron de Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU). El nitrógeno ( $N_2$ ) utilizado en la presente tesis fue suministrado por Air Liquide.

### 1.2. Muestras de Alperujo



**Fig. MyM.1.** A) Olivar en producción. B) Aceitunas de la variedad Arbequina. C) Alperujo fresco generado luego del proceso de extracción, a la salida de la centrifuga horizontal. Campaña Julio de 2017, Establecimiento olivícola RumarOli, Cnel. Dorrego, Prov. Bs. As.

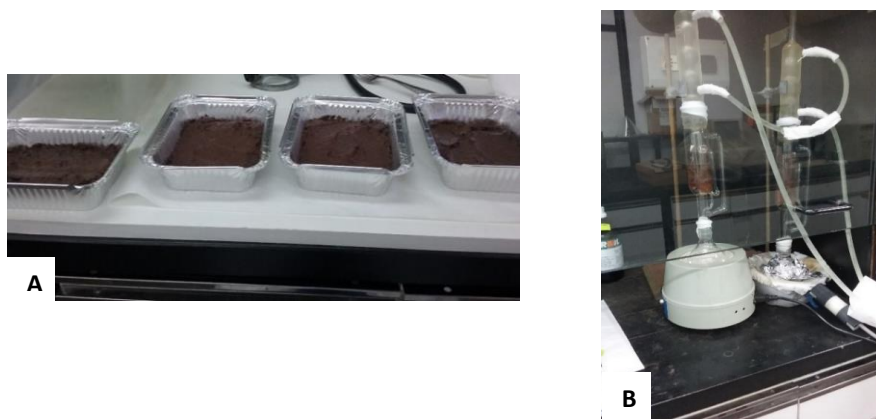
Las muestras de alperujo utilizadas en esta Tesis, fueron provistas por el establecimiento olivícola RumarOli, ubicado sobre la Ruta Nacional 3 Km 591, de la localidad de Cnel. Dorrego, Provincia de Buenos Aires (Fig. MyM.1). El establecimiento

## Materiales y Métodos

se dedica al cultivo del olivo desde el año 2004 (Gatti y González, 2009). La finca es un referente de la productividad olivícola en la zona del SOB (Olio inversiones Glam, 2004). Cuenta con una plantación de 20000 ejemplares, siendo las variedades predominantes: Arbequina, Frantoio y Nevadillo (Olio inversiones Glam, 2004 ; Gatti y González, 2009). Además, cuenta con sistema de riego por goteo (Fig. MyM.1 A), (Gatti y González, 2009). Asimismo, dispone de una moderna almazara (Fig. MyM.1 C) que procesa las aceitunas dentro de las 12 horas de cosecha, obteniendo aceite de oliva virgen extra, de gran reconocimiento a nivel nacional (Olio inversiones Glam, 2004).

Las muestras de alperujo fueron tomadas en las campañas 2017 y 2019, a mediados del mes de junio y julio respectivamente, ya que la cosecha de olivas en el hemisferio sur, se produce durante los meses de abril a julio (IOC, 2015). El alperujo utilizado proviene de aceitunas de la variedad Arbequina, las cuales fueron cosechadas con un índice de madurez de 4,56 y procesadas en el día, a medida que se las recibía desde la finca (Fig. MyM.1 B). La rapidez en el procesamiento disminuye el deterioro hidrolítico de los frutos, un factor que influye negativamente en la calidad del aceite (Ceci et al., 2019).

El alperujo se recolectó en la almazara, en frascos plásticos de 0,5 y 1 kg a la salida de la centrifuga horizontal, en el momento en que se producía el aceite (Fig. MyM.1). Luego las muestras fueron almacenadas a -20 °C para su correcta preservación hasta ser procesadas. Una parte de las muestras, fueron liofilizadas a -41°C y bajo una presión de 0,094 mm de Hg, (Fig. MyM.2 A), para posteriormente ser desaceitadas en un equipo Soxhlet utilizando como solvente *n*-hexano, de grado comercial (Fig. MyM.2 B).



**Fig. MyM.2. A)** Preparación de muestras de alperujo para ser liofilizadas. **B)** Soxhlet utilizado para desaceitar muestras de alperujo previamente liofilizadas.

Para desengrasar las muestras, en primer lugar, se prepararon dos cartuchos de papel Whatman n°4, cada uno con una cantidad de 15 g de alperujo liofilizado. El proceso se llevó a cabo a temperatura de ebullición del hexano y a presión atmosférica, durante 5 horas. Al finalizar, el hexano se evaporó mediante un evaporador rotatorio de laboratorio (Büchi R-300) a una temperatura de 40 °C bajo vacío, en un matraz previamente tarado, a fin de determinar el contenido de aceite extraído. Este procedimiento, permite obtener por un lado la fase oleosa de las muestras y por otro, el solvente que puede ser reutilizado (Rodríguez et al., 2019). A las muestras de alperujo desengrasadas, se las sometió a una corriente de N<sub>2</sub> para eliminar los restos de hexano y luego fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización para preparar los correspondientes extractos acuosos (EA).

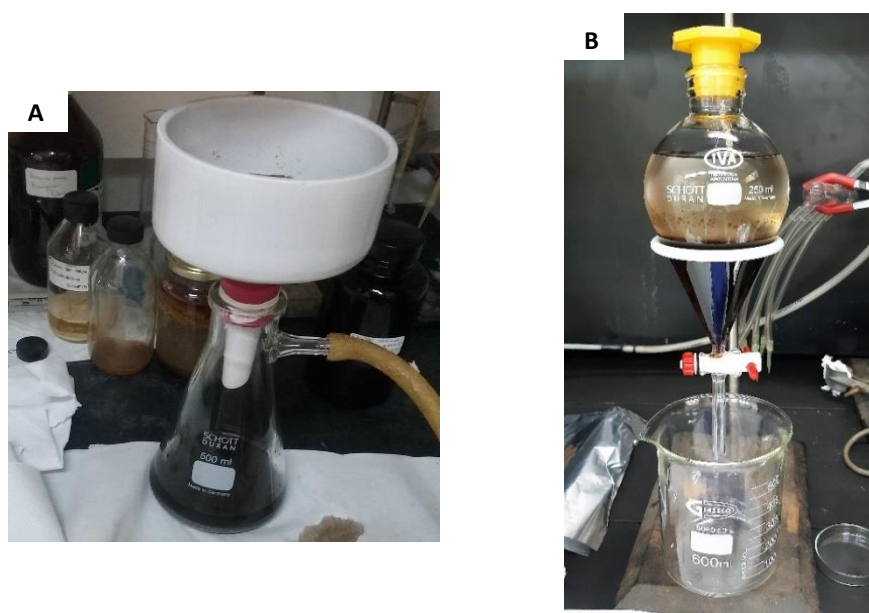
### 1.3. Preparación de medios de cultivo

#### **a. Agua de Alperujo (AA)**

El alperujo presenta un alto contenido de humedad (65% - 75%) (Ouzounidou et al., 2010; Dermeche et al., 2013; Ntougias et al., 2013). De esta manera, se utilizó alperujo fresco, para separar el agua contenida, a fin de ser evaluada como medio de

## Materiales y Métodos

cultivo para el desarrollo de levaduras productoras de carotenoides. En primer lugar, se centrifugó el alperujo a 1372 g durante 20 min, en una centrífuga (Hermle/ Z236K) a 20 °C. La fase líquida (AA) se separó y se filtró por vacío, utilizando un matraz de kitasato y un embudo Büchner, con papel de filtro Whatman n° 2 (Fig. MyM.3 A). Posteriormente, se desaceitó el AA obtenida con n-hexano mediante partición líquido- líquido, empleando una ampolla de decantación (Fig. MyM.3 B). La extracción se repitió dos veces y la relación volumen de AA/solvente fue de 1:1. Por último, se eliminaron los restos de hexano de la muestra bajo flujo de N<sub>2</sub>, después de lo cual, el medio se esterilizó en autoclave (Arcano) a 120 °C durante 15 minutos.



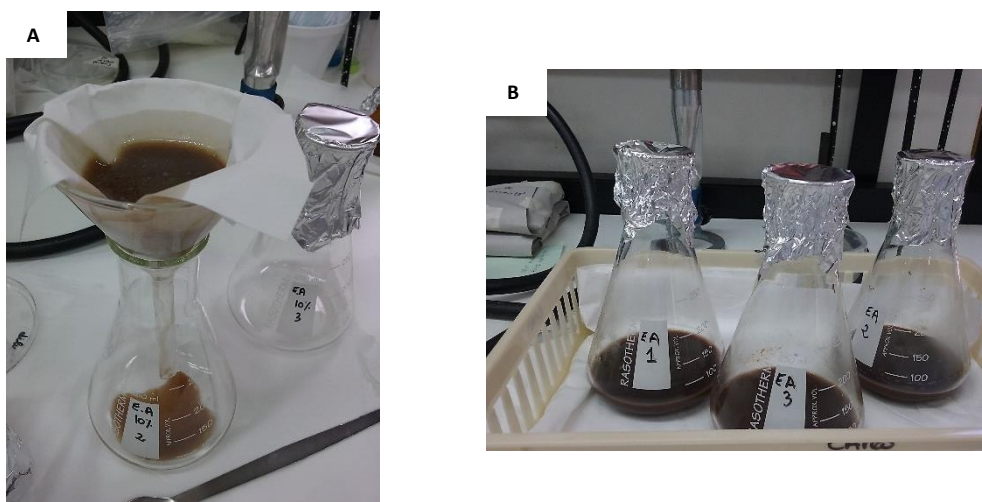
**Fig. MyM.3.** A) Filtración de agua de alperujo utilizando vacío. B) Desaceitado de agua de alperujo utilizando hexano.

### b. Extractos Acuosa de alperujo (EAs)

Se prepararon extractos acuosa (EAs) a partir de alperujo previamente liofilizado y desaceitado, en concentraciones de 5, 10, 20 y 30% (p/V) según Borroni et al., (2017) y Ghilardi et al., (2020). La obtención de los extractos se llevó a cabo a través de agitación continua, durante 2 h a 4 °C, con agua destilada.

## Materiales y Métodos

Posteriormente, los EAs obtenidos se centrifugaron a 1372 g, durante 20 minutos en una centrífuga (Hermle/ Z236K) a 20 °C. Luego se filtraron, utilizando papel de filtro Whatman n° 4 (Fig. MyM.4 A) y finalmente se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 minutos (Fig. MyM.4 B).



**Fig. MyM.4.** A) Etapa de filtrado de Extracto acuoso de alperujo (EA). B) Extractos acuosos listos para esterilizar en autoclave.

### c. Preparación de medios desfenolizados

Una amplia gama de solventes se ha utilizado para la recuperación de los compuestos fenólicos del alperujo, incluyendo agua, etanol (Mussio et al., 2017) y también, acetato de etilo (Soberon, 2012). Este último solvente, se utiliza con frecuencia para extraer biofenoles de matrices acuosas, tales como el alpechín (Mussio et al., 2017). Según Soberon et al., (2012), los EAs se comportan de manera similar a los alpechines en cuanto a la recuperación de compuestos fenólicos. Por lo tanto, es esperable que ocurra lo mismo con el AA por lo cual se utilizó la técnica de extracción partición líquido-líquido, utilizando acetato de etilo.

Un volumen determinado del medio correspondiente (AA y EA 10% y EA30 %) se mezcló con acetato de etilo en una proporción de 3:1 (Mussio et al., 2017 ; Soberon et

## Materiales y Métodos

al., 2012). Se extrajeron los compuestos fenólicos a 20 °C, con agitación magnética durante 2 h. Luego, todo el contenido se transfirió a una ampolla de decantación de 250 mL y la fase acuosa se recolectó en un vaso de precipitados (Fig. MyM.5). La extracción se repitió tres veces y al finalizar, el acetato de etilo remanente en el medio acuoso, se evaporó bajo una corriente de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Por último, los medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Para evaluar la eficiencia del proceso, se determinó la concentración de compuestos fenólicos totales antes y después de la extracción con acetato de etilo, mediante el método de Folin-Ciocalteu.



**Fig. MyM.5.** Separación del medio desfenolizado (fase inferior) del acetato de etilo (fase superior).

### 1.4. Procedimientos analíticos

#### **a. Determinación de pH:**

El pH se midió con un electrodo Altronix TPX-I, previamente calibrado con buffers pH = 4,00 ± 0,02 y pH = 7,00 ± 0,02.

#### **b. Determinación de compuestos fenólicos totales:**

El contenido de compuestos fenólicos totales, se determinó de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido cafeico como estándar (Gutfinger, 1981). La cantidad correspondiente de muestra se llevó a 5 mL con H<sub>2</sub>O destilada, luego se agregaron 500 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, agitándose cada tubo en un vortex (Decalab) a velocidad máxima, durante 3 minutos. Posteriormente, se agregaron 1000 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 35% p/V e inmediatamente se llevó el volumen a 10 mL, con H<sub>2</sub>O destilada. El contenido de cada tubo se agitó nuevamente en el vortex a velocidad

## Materiales y Métodos

máxima, por 30 segundos y finalmente, se incubaron todas las muestras durante 1 h, a temperatura ambiente (20 °C) y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se determinó la absorbancia a 725 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A. La curva de calibrado se realizó entre 0,002-0,01 mg/mL a partir de una solución de ácido cafeico de concentración inicial= 1 mg/mL, obteniéndose un  $r^2=0,998$ .

### c. Determinación de proteínas:

Para determinar la concentración de proteínas, estas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 50% p/V en H<sub>2</sub>O. Para ello se colocó 1 mL de cada muestra en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se agregaron 250 µL de TCA (concentración final = 10% p/V). Los tubos se dejaron reposar a 4 °C durante 30 minutos y luego, se centrifugaron a 10000 g durante 15 minutos, en una microcentrífuga Giumelli Z-127 DF, a 4 °C. Las proteínas precipitadas fueron solubilizadas con 200 µL de NaOH 0,1 N y se homogeneizaron mediante una agitación breve, en un vortex. Nuevamente, se centrifugaron las muestras a 10000 g, durante 15 minutos, a 4 °C y el sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Una alícuota del sobrenadante (entre 25-100 µL de acuerdo a la concentración del EA) se llevó a 400 µL con NaOH 0,1 N y se agregaron 2 mL de Reactivo C (el mismo se obtiene mezclando 50 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% p/V en NaOH 0,1 N + 0,5 mL Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1% p/V + 0,5 mL tartrato de Na y K 2% p/V). Se incubó 10 min a temperatura ambiente y luego se agregaron 200 µL de reactivo de Folin. Se dejó reposar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y finalmente, se determinó la absorbancia a 750 nm mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A. La curva de calibrado se realizó en paralelo para cada experimento utilizando como estándar



## Materiales y Métodos

seroalbúmina bovina (BSA, concentración inicial= 2 mg/mL en NaOH 0,1 N) entre 0,008-0,09 mg/mL obteniéndose en todos los casos un  $r^2 > 0,980$ .

### **d. Determinación de glucosa:**

La glucosa se midió a 505 nm utilizando un kit de glicemia enzimático AA líquida, proporcionado por Wiener Lab (Rosario, Argentina).

### **e. Determinación de azúcares totales:**

El contenido de azúcares totales se determinó de acuerdo con el método de Metahidroxidifenilo (MHDF) utilizando glucosa como estándar (Kintner y Van Buren, 1982). Una vez obtenidas las alícuotas correspondientes a cada medio se llevaron a un volumen de 1,95 mL con H<sub>2</sub>O destilada. Luego, se agregaron a cada muestra 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo (0 °C) durante 2 min. A continuación, se agitaron en vortex, por 30 segundos a velocidad máxima y se colocaron en agua a 100 °C por 5 min. Nuevamente se llevaron las muestras al baño de hielo durante 2 min, luego de lo cual se agregaron 50 µL del reactivo MHDF (0,15% p/V en NaOH 0,5% p/V). Se agitó en vortex a velocidad máxima, durante 30 segundos y se realizó la lectura de absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A a los 5 minutos. La curva de calibrado se realizó en paralelo para cada experimento utilizando como estándar una solución de glucosa (concentración inicial= 1,5 mg/mL en agua destilada) entre 0,075-0,585 mg/mL y obteniéndose en todos los casos un  $r^2 > 0,970$ ).

Para el caso de los medios derivados de alperujo tratado térmicamente, el contenido de azúcares totales se determinó mediante el método de antrona como en (Vázquez-González et al., 2020). A 100 µL de muestra se le agregan 200 µL de antrona al 0,2% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se agitó en un vortex durante 30 segundos y luego se incubaron las

## Materiales y Métodos

muestras a 100 °C durante 5 min. A finalizar la incubación, se leyó la absorbancia a 630 nm.

### **f. Determinación de la composición de azúcares por HPLC:**

La cantidad y tipo de azúcares presentes en los medios se determinaron por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en un equipo Waters Alliance e2695 (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.) con una columna analítica de exclusión iónica Rezex™ RCM-Monosaccharide Ca<sup>+2</sup> (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) mantenida a 60 °C y utilizando un volumen de inyección de 5 µL y un caudal de 0,6 mL / min. Las muestras fueron filtradas con filtros de membrana Durapore de PVDF hidrófila, 0,45 µm (EMD Millipore). La fase móvil consistió en agua desionizada de grado HPLC. Los picos se monitorearon mediante cambios en el índice de refracción con un detector de índice de refracción (RI) Waters 2414 (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.). Se utilizaron curvas de calibración construidas con estándares de pureza mayor al 97% para determinar la concentración de glucosa ( $r^2 = 0,992$ ), fructosa ( $r^2 = 0,996$ ), manitol ( $r^2 = 0,997$ ), estaquiosa ( $r^2 = 0,993$ ) y sacarosa ( $r^2 = 0,983$ ). El límite de detección se calculó a partir de las curvas de calibración de acuerdo con (Hadjikinova et al., 2017) y fue de 0,035 mg/mL para glucosa, 0,020 mg/mL para fructosa, 0,025 mg/mL para manitol, 0,015 mg/mL para sacarosa y 0,013 mg/mL para estaquiosa (Ghilardi et al., 2020).

### **g. Determinación de pigmentos carotenoides:**

#### *g.1. carotenoides totales:*

La cantidad de carotenoides totales extraídos en cada experimento, se determinó midiendo la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A. La curva de calibración ( $r^2 = 0,9985$ ) se realizó midiendo la Absorbancia a 450 nm

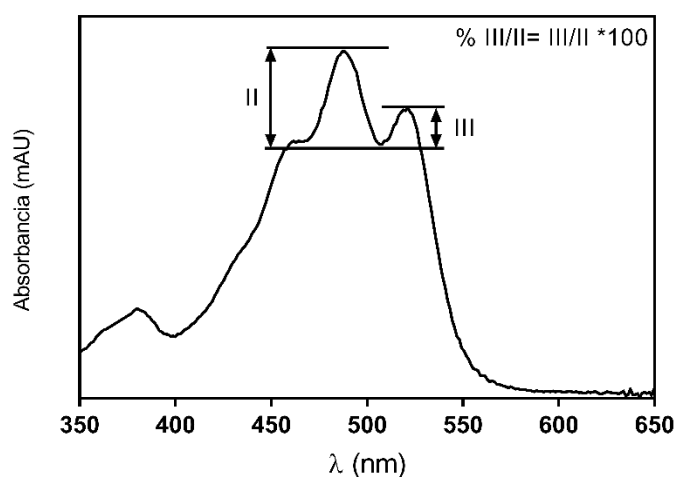
## Materiales y Métodos

de soluciones de distinta concentración de  $\beta$ -caroteno (0,003 – 0,02 mg/mL) en acetona.

El resultado fue expresado como equivalentes de  $\beta$ -caroteno.

### *g.2. perfil de carotenoides y carotenoides individuales:*

La separación de los carotenoides, se realizó mediante un HPLC Waters Alliance e2695 analítico de fase reversa, con una columna C-18 (Waters Spherisorb ODS2 5  $\mu$ m, 4,6 mm  $\times$  250 mm) mantenida a 25  $^{\circ}$ C, utilizando un volumen de inyección de 10  $\mu$ L y un caudal de 1 mL/min. La fase móvil consistió en un gradiente binario de acetona y agua. La composición inicial fue 75% de acetona, que fue aumentado linealmente a 95% de acetona en 10 min. Se mantuvo en esta composición durante 7 min, luego se elevó hasta alcanzar una concentración de acetona de 100% en 3 min, manteniéndose esta concentración durante 10 min. La composición inicial se alcanzó en 5 min (Fernández-Orozco et al., 2013). Los picos se monitorearon a 450 nm y los espectros, se registraron entre 320 y 700 nm con un detector de matriz de fotodiodos Waters 2998. Además, se



preparó una curva de calibración con un estándar de  $\beta$ -caroteno en acetona (0,00375-0,03 mg/mL,  $r^2=0,9966$ ) y la concentración de cada carotenoide se expresó como equivalentes de  $\beta$ -caroteno. La identificación

tentativa, fue realizada comparando el tiempo de retención y los espectros UV-Visibles con datos de la literatura (Weber et al., 2007; Britton y Young, 1993). El % III/II se calculó como la relación entre las alturas máximas de la banda de absorción a longitud de onda

## Materiales y Métodos

más larga (III) y la banda de absorción media (II) tomando como línea de base, el mínimo entre los dos picos (Fig. MyM.8) (Rodríguez-Amaya y Kimura , 2004).

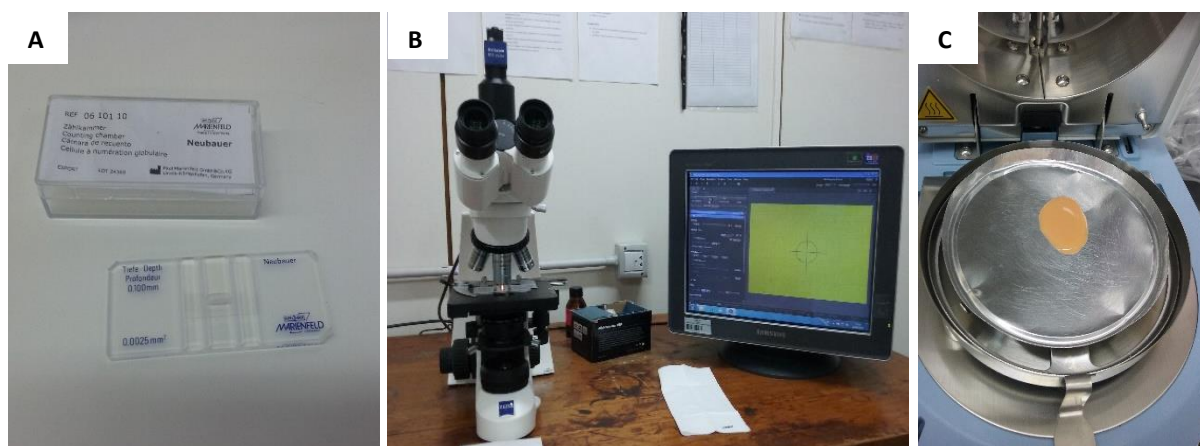
### 1.5. Microorganismo empleado

La cepa *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638 que se utilizó en la presente Tesis fue proporcionada por el Instituto de Botánica “Carlos Spegazzini” y se mantuvo en agar a 4 °C hasta su posterior utilización. La identificación de la misma, fue realizada por el Departamento de Micología, del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos G. Malbrán, mediante pruebas fenotípicas, MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization -Time of Flight) y secuenciación del dominio D1 / D2 del ADN ribosómico 26s.

#### **a. Preparación del Inóculo:**

Para preparar el inóculo a sembrar en los medios derivados del alperujo, se utilizó un medio con la siguiente composición: 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona de soja y 20 g/L glucosa. Luego este medio fue esterilizado en el día, en autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se sembró la levadura con un ansa ( $\sim 1 \times 10^6$  UFC /mL) y se incubó durante 2 días a 30 °C, con agitación continua (150 rpm), en un agitador orbital construido por el Laboratorio de Electrónica y el Laboratorio de Tornería y Metalurgia de la UAT, CONICET Bahía Blanca. Luego, el medio fue centrifugado en condiciones de esterilidad a 1372 g durante 20 minutos, recuperándose el pellet de levaduras. El mismo, fue resuspendido en 5 mL de agua peptonada y esta suspensión se utilizó para inocular los medios derivados del alperujo. Con este procedimiento se obtuvieron aproximadamente, entre  $1-3 \times 10^7$  células/mL.

## Materiales y Métodos

**b. Determinación de biomasa:**

**Fig. MyM.6.** A) Cámara Neubauer. B) Imágenes tomadas mediante microscopio invertido Zeiss Primo Star. C) Termobalanza con muestra para determinar peso seco.

*b.1. Recuento de levaduras:*

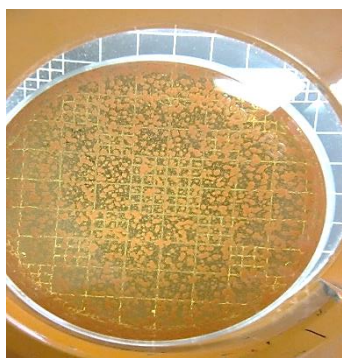
El número de levaduras se contabilizó mediante cámara Neubauer (Fig. MyM. 6 A), utilizando un microscopio óptico invertido Zeiss Primo Star Carl Zeiss, Alemania, (Fig. MyM.6 B).

*b.2. Determinación de la biomasa:*

El peso seco se determinó a 85 °C utilizando una termobalanza Kern DLB 160-3 A Kern, Alemania, (Fig. MyM.6 C).

*b.3. Recuento de viables:*

En los experimentos utilizando medios derivados del alperujo tratado térmicamente, se realizó el recuento de levaduras viables, empleando la técnica de



**Fig. MyM.7.** Recuento de viables, utilizando la técnica de recuento en placa.

recuento en placa (Fig. MyM.7). Para ello, se sembraron muestras adecuadamente diluídas en placas con agar YGC (Extracto de levadura, Glucosa, Cloranfenicol). Luego, se incubaron aeróbicamente en oscuridad a 30 °C durante 48 h para posteriormente, contabilizar las colonias de levadura. Se calcularon las unidades

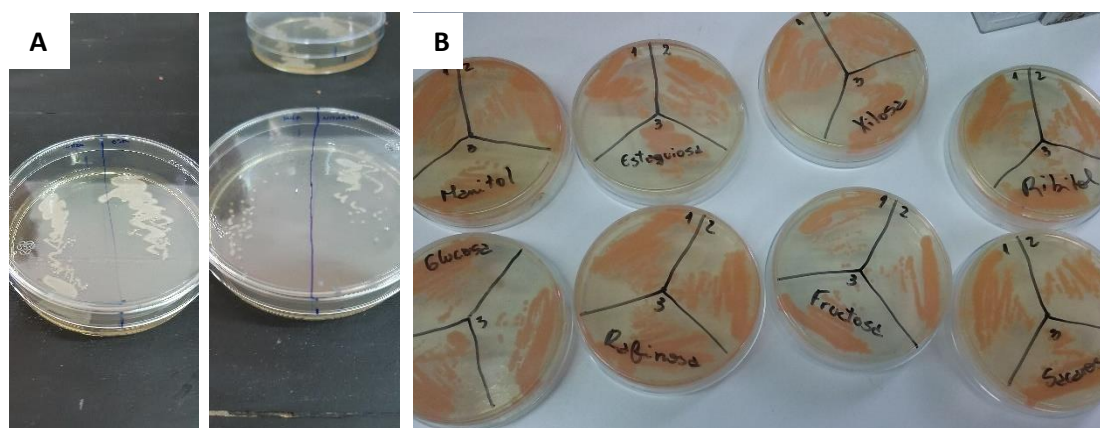
## Materiales y Métodos

formadoras de colonias por mL (UFC / mL) en función del tiempo y las constantes de inactivación ( $k$ ,  $h^{-1}$ ), en cada medio. Estas últimas se obtuvieron con el complemento de Excell GinaFit, utilizando el modelo de regresión log-lineal descrito por (Geeraerd et al., 2000; Geeraerd et al., 2005).

### 1.6. Prueba de asimilación de nutrientes en *Rh. mucilaginoso* LPSC 638

La prueba de asimilación de nitrógeno se llevó a cabo, utilizando un medio mínimo con glucosa, suplementado con  $NaNO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ , peptona de soja, urea o BSA, como única fuente de nitrógeno a una concentración de 1 g/L según (Wickerham, 1946). Las soluciones correspondientes de las cuatro fuentes de N, se distribuyeron cada una en tubos de ensayo. Además, se realizó un control negativo consistente en 3 tubos con un medio mínimo de glucosa, sin el agregado de ninguna fuente de nitrógeno. Luego, todos los tubos se inocularon con una ansada de levadura y posteriormente, se incubaron a 30 °C en estufa de cultivo con agitación.

De manera similar, la prueba de asimilación de carbohidratos se realizó utilizando un medio de nitrógeno mínimo (5 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,875 g/L  $KH_2PO_4$ , 0,125 g/L  $K_2HPO_4$ ,



**Fig. MyM 9.** Desarrollo de *Rhodotorula mucilaginoso* LPSC 638 obtenida de los tubos del ensayo de asimilación **A)** de fuentes de Nitrógeno. **B)** de azúcares que fueron hallados mediante HPLC en los EAs y AA.

## Materiales y Métodos

MgSO<sub>4</sub> 0,75 g/L, KCl 2.3 g/L y 0,25 g/L CaCl<sub>2</sub>), suplementado con estaquiosa, rafinosa, sacarosa, glucosa, fructosa o manitol como única fuente de carbono a una concentración de 20 g/L, según (Wickerham y Burton, 1948). El control negativo consistió en 3 tubos con medio mínimo sin el agregado de ninguna fuente de carbono. Se realizó el mismo procedimiento descrito que para el ensayo de metabolismo de nitrógeno. Es importante destacar que se escogieron los azúcares antes mencionados, porque fueron los encontrados mediante HPLC tanto en EAs como en AA.

El crecimiento de la levadura en ambos tipos de ensayos, se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A) midiendo la densidad óptica a 600 nm, contra el correspondiente control negativo. Luego de la lectura de densidad óptica, se realizaron placas con medio de cultivo peptonado y agar, dónde se sembró la levadura desarrollada en cada tubo, para verificar que el desarrollo observado fuera únicamente de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 (Fig. MyM.9 A-B).

Asimismo, en todos los experimentos se incluyó un tubo con medio completo para verificar la viabilidad de la levadura que se tomó como referencia (100 % de crecimiento).

### 1.7. Producción y extracción de pigmentos carotenoides

#### **a. Medios AA y EAs (5, 10, 20 y 30%):**

Para evaluar la producción de carotenos en los distintos medios de cultivo, se procedió como se describe a continuación. Se prepararon cinco matraces erlenmeyer de 250 mL por experimento, en dónde cada uno de ellos contenía 50 mL de medio de cultivo. Tres de los erlenmeyers se inocularon con  $\sim 6 \times 10^5$  levaduras/mL, mientras que

## Materiales y Métodos

los dos restantes, no se inocularon y actuaron como control. Los medios inoculados se incubaron durante 5 días, a 30 °C con agitación orbital (150 rpm).

De cada erlenmeyer, se tomaron muestras de 2 mL en esterilidad los días 0, 1, 2, 3, 4 y 5. Las muestras fueron centrifugadas a 1372 g durante 20 min, separándose el pellet de levadura del sobrenadante, para realizar las determinaciones correspondientes. Cada condición de cultivo se realizó como mínimo por triplicado.

Para la extracción de carotenoides, las células se incubaron con dimetilsulfóxido a 50 °C durante 30 min y posteriormente fueron extraídas con 3 mL de acetona, repitiéndose esta operación hasta que los sedimentos celulares fueran incoloros. El sobrenadante se separó por centrifugación a 1372 g durante 15 min y los extractos de acetona fueron combinados según el medio de dónde se extrajeron. El solvente se evaporó bajo flujo continuo de N<sub>2</sub> y luego, los carotenoides se resuspendieron en 3 mL de acetona según (Colet et al., 2015), para su determinación espectrofotométrica. Una alícuota de esta solución fue centrifugada a 10000 g en microcentrífuga durante 15 minutos y utilizada para la determinación de los carotenoides individuales mediante HPLC.

### **b. Medios desfenolizados vs. sin desfenolizar: AA y EAs (10% y 30%):**

Se prepararon cinco matraces erlenmeyer de 125 mL por experimento, en dónde tres de ellos contenían 20 mL de medio de cultivo desfenolizado mientras que los dos restantes, contenían 20 mL de medio de cultivo con la cantidad normal de compuestos fenólicos. El pH de los medios se ajustó, a 5,5 cuando fue necesario. Los medios fueron inoculados con  $\sim 6 \times 10^5$  levaduras/mL. Los cultivos se incubaron durante 4 días, a 30 °C, con agitación orbital (150 rpm). Asimismo, se tomaron muestras de 1 mL los días 0, 1, 2,



## Materiales y Métodos

3 y 4, las cuales se centrifugaron a 1372 g durante 20 min, separándose la biomasa del sobrenadante. Este se filtró y almacenó a - 20 °C hasta su posterior utilización. Cada condición de cultivo se realizó como mínimo por triplicado.

El sedimento de levaduras fue liofilizado a -40°C durante 48 horas para realizar la extracción de carotenoides. Estos pigmentos, se extrajeron mediante un molino de bolas de laboratorio, fabricado por el Laboratorio de Electrónica y Torneado - Metalurgia UAT, Conicet Bahía Blanca. En primer lugar, se pesaron muestras de biomasa previamente liofilizadas (~ 20 mg) en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se añadieron tres bolas de acero inoxidable de 5 mm de diámetro. Se realizaron tres ciclos de molienda consecutivos, a 25 Hz y 60 segundos de duración cada uno. Finalmente, se agregaron 500 µL de acetona y se llevó a cabo un ciclo de molienda final. Luego, los tubos se dejaron reposar durante 30 minutos en oscuridad y se centrifugaron a 10000 g durante 5 minutos, a 4 °C. El sobrenadante que contenía los carotenoides, se separó y colocó en tubos Eppendorf limpios. Nuevamente se centrifugó a 10000 g y finalmente una alícuota de la suspensión de carotenos, se transfirió a un vial de HPLC para su análisis inmediato. Otra alícuota fue llevada a 3 mL de acetona y traspasada a una cubeta de cuarzo, para medir su absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro. Todas las muestras se extrajeron por duplicado.

Es necesario señalar que, en todos los casos, tanto la extracción como la lectura espectrofotométrica se realizó bajo luz tenue para evitar la isomerización y fotodegradación de los carotenoides (Fernández- Orozco et al., 2013).

### 1.8. Efecto del Imidazol sobre la producción de carotenoides

Para evaluar el efecto del imidazol sobre la producción de carotenoides, se trabajó con el EA 30%. Se escogió esta concentración ya que con ella se obtiene una relación  $\mu\text{g}$  de carotenos/g de levadura mayor que con las demás concentraciones (Ghilardi et al., 2020).

Se diseñó un ensayo en el que varió la concentración de imidazol de manera creciente: 250 ppm, 500 ppm y 1000 ppm, (López-Nieto et al., 2004; Hernández Almanza et al., 2014). Cada experimento se realizó por triplicado, colocando 50 mL de EA 30% en cinco erlenmeyers de 250 mL e inoculando con  $\sim 6 \times 10^5$  levaduras/mL. Tres de los erlenmeyers de cada tratamiento contenían imidazol en las concentraciones indicadas, mientras que los otros dos representaron las muestras control. Cada ensayo tuvo una duración de tres días y se tomaron muestras en donde se midió pH y glucosa. Asimismo, se realizó el recuento celular mediante cámara Neubauer, se determinó el peso seco a 85 °C y se liofilizó la biomasa. La extracción, cuantificación y separación de los carotenoides producidos, se realizó siguiendo los mismos métodos y con el mismo equipamiento descrito anteriormente (ver seccies 1.7 b y 1.4, g2). Cada condición de cultivo se realizó por triplicado.

### 1.9. Fitotoxicidad

La fitotoxicidad de los EAs y AA, fue evaluada mediante el cálculo de diferentes índices de germinación como: germinación total GT %, (Hoekstra 2002), Velocidad de germinación ( $n^\circ$  semillas/día), (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996) y de crecimiento relativo de radícula (%), (Hoekstra 2002). Los cuales, se definen a continuación, con sus respectivas fórmulas:

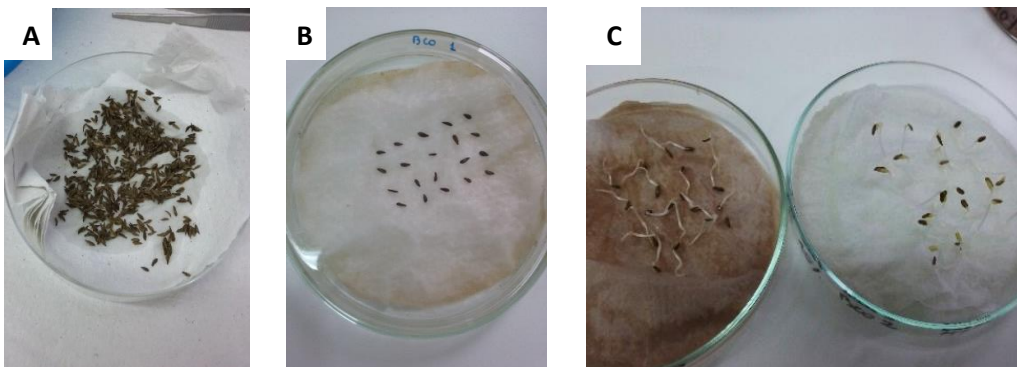
## Materiales y Métodos

$$GT (\%) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de semillas germinadas en EAs}}{\text{n}^\circ \text{ de semillas germinadas en Control}} \times 100$$

$$\text{Vel. Germ.} = \sum \frac{\text{n}^\circ \text{ semillas germinadas día } i}{\text{tiempo de germinación (días)}}$$

$$\text{Crec. Relativo radicular (\%)} = \frac{\text{media long de radículas semillas de los EAs}}{\text{media long de radículas del control}}$$

Para los ensayos de germinación, se emplearon placas de Petri de vidrio de 100 mm de diámetro, con papel de filtro Whatman N° 1 (Fig. MyM.10 A-C). El papel fue humedecido con 5 mL del medio correspondiente (AA o EAs,) o H<sub>2</sub>O destilada como control. Previo al ensayo, las placas con el medio se esterilizaron mediante autoclave a 120 °C durante 15 min.



**Fig. MyM.10.** A) Semillas de *Lactuca sativa* prelavadas B) Semillas ubicadas en la caja de Petri. C) Semillas germinadas luego de 6 días de incubación. A la izq., semillas germinadas en medio derivado de alperujo y a la der., semillas germinadas de la placa control.

Los medios fueron evaluados antes y después del desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Se sembraron en cada placa 20 semillas de *Lactuca sativa* L. y se mantuvieron durante 72 h bajo condiciones de oscuridad a 20 °C. *Lactuca sativa* L, es ampliamente

### Materiales y Métodos

utilizada para este tipo de ensayos, debido a su alta sensibilidad a compuestos fitotóxicos (Sánchez- Sánchez, 2015). Además, presenta una rápida germinación y un tamaño de semilla que facilita su manipulación (Martin et al., 2002). En todos los casos, los ensayos se realizaron por triplicado, incluyendo en cada uno de ellos el control con H<sub>2</sub>O destilada.



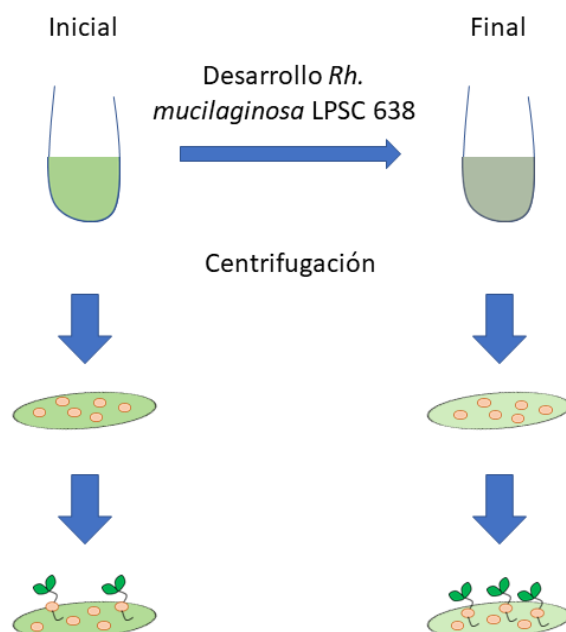
**Fig. MyM.11.** Medición de radícula en embrión, luego de 6 días de germinación.

Cada día se contabilizó el número de semillas germinadas y se determinó su germinación por observación con lupa, considerando que una semilla germina cuando la raíz emerge de la cubierta seminal y presenta una longitud mayor a 1 mm (Di Salvatore et al., 2008; Ranal y Garcia-deSantana, 2006; Francáková et al., 2012). Además, en el último día del ensayo (t=6 días), se midieron las longitudes de las radículas de las semillas germinadas (Fig. MyM.11).

Para el análisis de fitotoxicidad de AA y EAs con la concentración normal de compuestos fenólicos, utilizamos el diseño experimental mostrado en la Fig. MyM.12. Los medios derivados del alperujo fueron utilizados antes (**Inicial**) y después (**Final**) del desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. El único procedimiento realizado sobre los

## Materiales y Métodos

medios fue una centrifugación para remover la levadura. Por otra parte, el pH del medio no fue ajustado.



**Fig. MyM.12.** Diseño experimental utilizado para evaluar la fitotoxicidad de medios derivados del Alperujo con concentración normal de compuestos fenólicos.

### 1.10. Desarrollo y producción de carotenoides por tres especies del género *Rhodotorula*, empleando como sustrato la fracción líquida del alperujo (L) tratada hidrotermalmente.

#### **a. Especies del género *Rhodotorula*:**

Las especies empleadas fueron, *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, *Rh. glutinis* Y52 y *Rh. graminis* Y54. *Rh. glutinis* Y52 y *Rh. graminis* Y54, se aislaron de fermentaciones de aceitunas de mesa (Arroyo-López et al., 2006) y pertenecen a la Colección Microbiana de Oliva de Mesa, del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla, España). Las 3 especies fueron mantenidas en medio YM, hasta su posterior utilización.

#### **b. Muestras de alperujo:**

Se utilizó una mezcla de alperujo compuesto por tres variedades de aceituna diferentes: picual, hojiblanca y arbequina, proporcionado por Oleícola El Tejar Nuestra Señora de Araceli S.C en 2018 (Córdoba, España).

## Materiales y Métodos

### **c. Medios de cultivo:**

El alperujo obtenido de la empresa Oleícola El Tejar Nuestra Señora de Araceli S.C, fue tratado hidrotermalmente en un prototipo de reactor de 100 L de capacidad, diseñado por investigadores del Instituto de la Grasa (CSI), ubicado en Sevilla, España (Lama-Muñoz et al., 2011). El tratamiento consiste en el calentamiento directo (vapor) e indirecto, a 180 °C durante 60 min y a una presión de 0,6-1 MPa. El material obtenido se centrifugó a 4.700 x g (Comteifa, SL, Barcelona, España) para separar las fases sólidas (S) y líquidas resultantes (L). La fase líquida (L) se utilizó como medio de cultivo, antes y después de someterla a una (L1) o dos pasadas (L2) a través de un sistema cromatográfico patentado, diseñado para extraer compuestos fenólicos (Fernandez-Bolaños et al., 2002). Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 min antes de su uso.

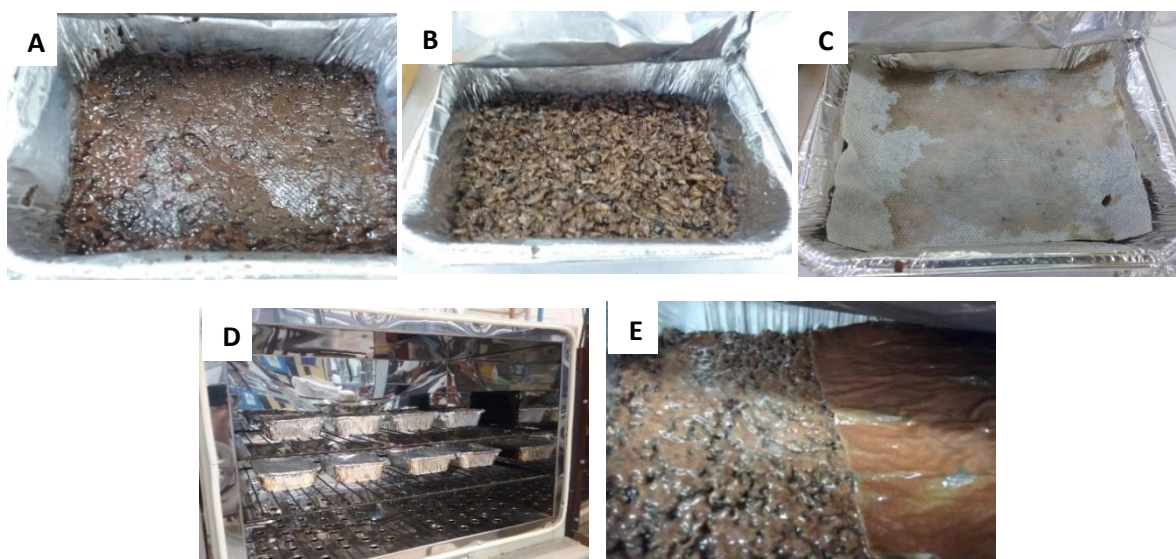
### **d. Producción de carotenos:**

Para evaluar la producción de carotenos en L, L1 y L2, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo cada uno, 50 mL del medio correspondiente. Los matraces se inocularon con  $\sim 1 \times 10^6$  UFC / ml de *Rh. glutinis* Y54, *Rh. graminis* Y52 o *Rh. mucilaginoso* LPSC 638. Se emplearon 3 Erlenmeyer por cepa, por experimento. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 30 °C con agitación orbital (150 rpm). Cada condición de cultivo se realizó por triplicado. La biomasa final fue liofilizada y una masa de  $\sim 20$  mg, fue extraída con un molino a bolas (Retsch MM 200) para separar y analizar los carotenoides utilizando un procedimiento similar al descrito en las secciones 1.7 b y 1.4, g2.

### 1.11. Desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre alperujo y bagazo de cebada

El bagazo de cebada se obtuvo a partir de la elaboración de cervezas realizadas por la cátedra del Laboratorio de Procesamiento de Alimentos, (Dpto. de Ingeniería Química- UNS), dónde se emplearon maltas de la variedad Pilsen y Viena. La humedad de este subproducto fue de  $60,7 \pm 0,35\%$ . Posteriormente, fue almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su correcta preservación. El alperujo utilizado fue de la variedad Arbequina (campaña 2019). Como sustrato de cultivo se evaluaron bagazo de cebada, alperujo y una mezcla de alperujo + bagazo (50/50 p/p). Cada condición se realizó por duplicado.

Se emplearon 9 bandejas de aluminio descartables de 750 mL, conteniendo aproximadamente 60 g de cada sustrato (balanza Mettler PC 180) homogeneizado manualmente. Sobre el sustrato sólido, se dispusieron lienzos de 12 x 9,6 cm en cada una de las bandejas (Fig. MyM.13 A-C). Previamente, estos géneros fueron lavados con detergente y enjuagados con abundante agua corriente.



**Fig. MyM.13.** A) Bandeja de aluminio con mezcla: alperujo + bagazo. B) Bandeja con bagazo de cebada. C) Sustrato con lienzo en su superficie donde se inoculó la levadura. D) Estufa de cultivo con bandejas ya inoculadas. E) Bandeja con desarrollo notable de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre su superficie.

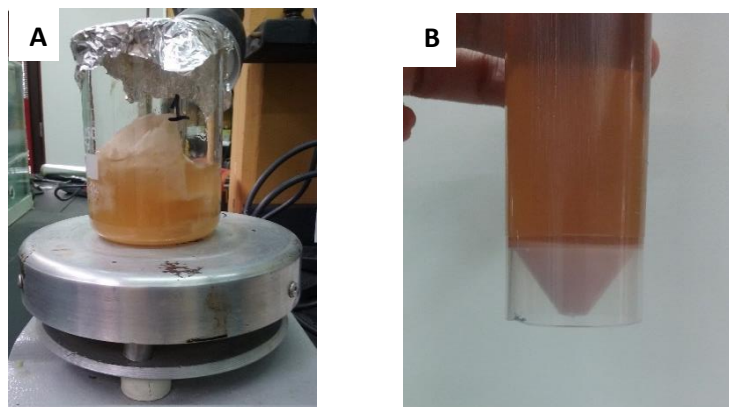
## Materiales y Métodos

En un ensayo preliminar se probaron tres tipos de género, con la finalidad de evaluar cuál de ellos era el más adecuado para permitir el crecimiento y recuperación de las levaduras. Las telas que se utilizaron fueron: friselina de 80 g, friselina de 40 g y modal. La friselina es una tela no tejida, de polipropileno. Es fina, maleable y biodegradable, pero a la vez resistente. La diferencia entre los dos tipos de friselina usadas, es su densidad. A su vez, el modal es una fibra artificial de celulosa regenerada, que es muy resistente y absorbente.

Las bandejas preparadas con sustrato y tela, se cubrieron en su parte superior con papel de aluminio y se llevaron a esterilizar en autoclave a 120 °C, durante 15 minutos. El inóculo se preparó como se describió previamente, pero en este caso el pellet se resuspendió en 50 mL de agua peptonada estéril. De esta suspensión se sembraron 5 mL ( $\sim 3 \times 10^5$  levaduras/mL) en cada bandeja y se incubaron en estufa de cultivo a 30 °C, durante 7 días (Fig. MyM.13 D-E).

Al finalizar la incubación, se retiró la tela con una pinza y se colocó el género en un vaso de precipitados de 250 mL, con 100 mL de agua destilada, sobre una placa con agitación magnética (FBR Decalab) a 1500 rpm, durante 15 min (Fig. MyM.14 A). Posteriormente, el líquido de lavado conteniendo las levaduras, se retiró de a 50 mL y se trasvasó a un tubo Falcon, el cual se centrifugó a 1372 g durante 15 min (Presvac DSC 16 RV). Luego, se apartó el sobrenadante libre de levaduras, el cual se utilizó para hacer un nuevo lavado de la tela. Finalmente, después de la última centrifugación se descartó el sobrenadante, y el pellet de levaduras se utilizó para realizar el recuento y la extracción de carotenos (Fig. MyM.14 B).





**Fig. MyM.14.** A) Lavado de tela con levaduras. B) Pellet obtenido luego de la centrifugación del líquido de los lavados

Para realizar el recuento celular se resuspendió cada pellet en 5 mL de agua peptonada y se tomó una alícuota de esta suspensión (5  $\mu$ L) que se colocó en un tubo Eppendorf y se diluyó convenientemente. El recuento se realizó en cámara Neubauer, como se indicó con anterioridad. Con respecto a la extracción, cuantificación y separación de carotenoides producidos, se utilizaron los mismos métodos y equipamiento descritos con anterioridad (ver sección 1.7 b y 1.4, g2).

### 1.12. Análisis Estadístico

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey. Para ello, se utilizó el software GraphPad Prism versión 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Se estableció un umbral de  $p = 0,05$  como nivel de significancia para comparar medias.

Finalmente, a modo de conclusión, en la Tabla MyM.1, se resumen los medios de cultivo derivados del alperujo y las cepas de levaduras del género *Rhodotorula*, que fueron utilizados en los diferentes ensayos que componen esta Tesis.

Medio	Descripción	Cepa de <i>Rhodotorula</i> spp.	Capítulo
Agua de Alperujo (AA)	Fase acuosa del alperujo fresco separada por centrifugación.	<i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638	Cap. 1, 2 y 4
Extracto Acuoso de Alperujo (EA)	Alperujo liofilizado, rehidratado a distintas concentraciones, filtrado y centrifugado.	<i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638	Cap. 1, 2 y 4
AA Desfenolizado	Agua de alperujo desfenolizada con acetato de etilo.	<i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638	Cap. 1, 4 y 5
EA Desfenolizado	Extracto acuoso desfenolizado con acetato de etilo.	<i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638	Cap. 1, 4 y 5
L	Fase líquida obtenida del alperujo tratado hidrotermalmente separado por centrifugación.	<i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638 <i>Rh. glutinis</i> Y54 <i>Rh. graminis</i> Y52	Cap. 5
L1	Fase líquida desfenolizada mediante un paso a través de una columna cromatográfica	<i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638 <i>Rh. glutinis</i> Y54 <i>Rh. graminis</i> Y52	Cap. 5
L2	Fase líquida desfenolizada mediante dos pasos a través de columna cromatográfica.	<i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638 <i>Rh. glutinis</i> Y54 <i>Rh. graminis</i> Y52	Cap. 5
Alp + BSG	Mezcla de Alperujo fresco sólido y grano de cerveza agotado	<i>Rh. mucilaginosa</i> LPSC 638	Cap. 3

**Tabla MyM.1.** Medios de cultivo y cepas de levaduras del género *Rhodotorula* utilizadas en los ensayos que componen esta Tesis.

## Bibliografía

- Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., et al. "Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives." *Food Microbiology*, no. 23 (2006): 791–796.
- Borroni, M.V., Gonzalez, M.T., & Carelli, A.A. "Bioproduction of carotenoid compounds using two-phase olive mill waste as the substrate." *Process biochemistry*, 2017: 1-7.
- Britton, G., & Young, A. *Methods for the isolation and analysis of carotenoids*. Vol. 1, in *Carotenoids in photosynthesis*, by G. Britton, 409–457. Berlin,: Springer, Dordrecht, 1993.
- Ceci, L.N., Pezzuti, A., et. al. «Aceites de oliva vírgenes producidos en la Costa Atlántica Argentina. Calidad Química y Sensorial.» *A&G 2*, nº 115 (2019): 294-302.
- Colet, R., Di Luccio, M., et al. "Fed-batch production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636): kinetic and stoichiometric." *Eur Food Res Technol* 240 (2015): 173–182.
- Daâssi, D., Belbahri, L., et al. "Enhanced reduction of phenol content and toxicity in olive mill wastewaters by a newly isolated strain of *Corioliopsis gallica*." *Environ Sci Pollut Res*. 21 (2014): 1746–1758.
- Dermeche, S., Nadour, M., et al. "Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization." *Process Biochemistry* 48 (2013): 1532–1552.
- Di Salvatore, M., Carafa, A. M., et al. "Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates." *Chemosphere*. 73, no. 9 (2008): 1461-1464.
- Díaz, N.A., Bárcena- Ruiz, J.A., et al. «Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas.» *Sitio web de la Universidad de Cordoba (UCO)*. España. 2010. [http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETR% C3% 8DA. pdf](http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf) (último acceso: 12/08/2020).
- Fernandez-Bolaños, J., Rodríguez, G., et al. «Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid–solid waste of the two-phase olive oil processing or ‘alperujo’.» *J Agric Food Chem*, nº 50 (2002): 6804–681.
- Fernández-Orozco, R., Gallardo-Guerrero, L., et al. "Carotenoid profiling in tubers of different potato (*Solanum sp*) cultivars: Accumulation of carotenoids mediated by xanthophyll esterification." *Food Chemistry*. 141 (2013): 2864–2872.
- Francáková, H., Lisková, M., et al. "Germination Index as an Indicator of Malting Potential." *Czech J. Food Sci*. 30, no. 4 (2012): 377–384.
- Gatti, M.G., & González, L.A. *Caracterización de suelos del partido de Coronel Dorrego. Comparación de dos perfiles bajo un mismo cultivo y manejo*. Tesina de Grado: Técnico superior de suelos y agua., Departamento de Agronomía., UNS, Bahía Blanca.: EdiUNS, 2009, 87.

## Materiales y Métodos

- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., et al. "Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment." *International Journal of Food Microbiology*, no. 59 (2000): 185–209.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., et al. "GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves." *Journal of Food Microbiology International*, no. 102 (2005): 95–105.
- Ghilardi, C., Sanmartin-Negrete, P., Carelli, A.A., & Borroni, M.V. "Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*." *Bioresour. Bioprocess.* 7, no. 52 (2020): 2-11.
- González-Zertuche, L. & Ürozco-Segovia, A. «Métodos de Análisis de datos en la Germinación de semillas un ejemplo: MANFREDA BRACHYSTACHYA.» *Bol. Soc. Bol. México*, (1996): 15-30.
- Gutfinger, T. «Polyphenols in olive oils.» *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58, nº 11 (1981): 966-968.
- Hadjikinova, R., Petkova, N., et al. "Development and Validation of HPLC-RID method for Determination of Sugars and Polyols." *J. Pharm. Sci. & Res.* 9, no. 8 (2017): 1263-1269.
- Hoekstra, N.J. Bosker, T., Lantinga, E.A. "Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.)." *Agriculture, Ecosystems and Environment*, no. 93 (2002): 189–196.
- Hornero-Méndez, D. "A Routine Method for the Extraction and HPLC-DAD Profiling of Major Plant and Food Carotenoids." Chap. 9 in *Plant and food carotenoids.*, by M. & Welsh, R. Rodríguez-Concepción, 414. New York, New York.: Humana Press.(Springer), 2020.
- IOC, International Olive Council. «Estudio Internacional sobre los costes de producción del aceite de oliva: Resultados, Conclusiones y recomendaciones.» Madrid: International Olive Council., 2015, 41. (último acceso: 4/06/2020).
- Kintner, P.K., & Van-Buren, J.P. "Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenyl method." *Journal of food Science.* 47, no. 3 (1982): 756-759.
- Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutierrez, G., et al. "New Hydrothermal Treatment of Alperujo Enhances the Content Bioactive Minor Components in Crude Pomace Olive Oil." *J. Agric. Food Chem.*, no. 59 (2011): 1115–1123.
- López-Nieto, M. J., Costa, J., et al. «Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*.» *Applied microbiology and biotechnology.* 2, nº 66 (2004): 153-159.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., et al. «Protein measurement with the Folin phenol reagent.» *Journal of biological chemistry*, 1951: 265-275.
- Martin, J., Sampedro, I., et al. "Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues." *Soil Biology & Biochemistry* 34 (2002): 1769–1775.

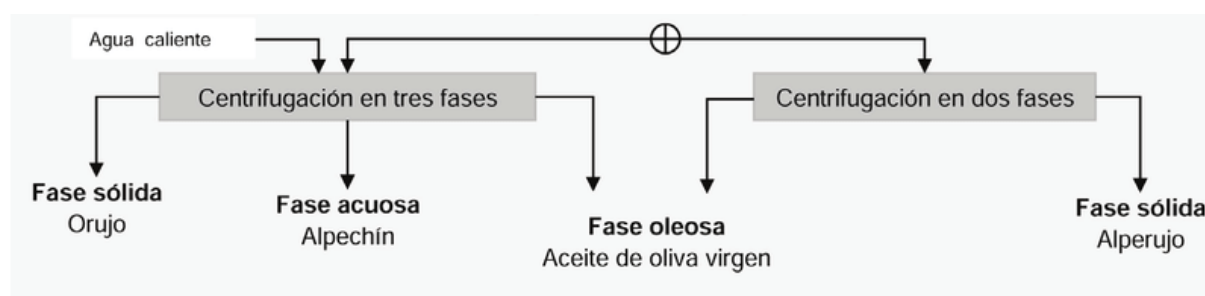
## Materiales y Métodos

- Mussio, D., Ceci, L.N., et al. «Recuperación de Biofenoles de Alperujo con diferentes solventes.» XVI CYTAL. Mar del Plata, Argentina., 2017. 1-7.
- Nimo, M. «Los alimentos y la Bioeconomía.» Video clase, dentro del marco del Curso de la BCBA: Bioeconomía Conceptos Generales. Edición 5 (2021)., Industrias de Productos Alimenticios (COPAL) y Secretaria Técnica en la Alianza Latinoamericana de Asociaciones de la Industria de Alimentos y Bebidas, Ciudad Autónoma de Bs.As., 2020.
- Ntougias, S., Bourtzis, K., et al. «The Microbiology of Olive Mill Wastes.» *BioMed Research International* 2013 (2013): 1-16.
- OlioInversiones Glam, S.A. *Acerca de nosotros: Finca Rumaroli*. 2004. <https://fincarumaroli.com/finca-rumaroli/> (último acceso: 19/05/2022).
- Ouzounidou, G., Zervakis, G.I., et al. "Raw and Microbiologically Detoxified Olive Mill Waste and their Impact on Plant Growth." *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*., no. 4 (2010): 21-38.
- Ranal, M.A. & Garcia-deSantana, D. "How and why to measure the germination process?" *Revista Brasil. Bot* 29, no. 1 (2006): 1-11.
- Rodríguez, L.M. *Aplicación de enzimas en la obtención de aceite de girasol con solventes renovables: Impacto del procesamiento en la composición y calidad de aceites y harinas*. Tesis de Doctor en Ciencia y Tecnología de alimentos. , Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos., Universidad Nacional del Sur, Bahí Blanca: Universidad Nacional del Sur (UNS), 2019, 205.
- Rodríguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Vol. 2. Washington.: International Food Policy Research Institute (IFPRI)., 2004.
- Sánchez-Sánchez, R. «Relaciones entre diversidad microbiana y parámetros ambientales durante el compostaje de alperujo.» Tesis de Grado, Facultad de Ciencias- Escuela de Pregrado. , Universidad de Chile, Santiago de Chile, 2015, 1-85.
- Soberon, L.F., González, M.T., et al. «Recuperación de biofenoles de alperujo de Arbequina a escala laboratorio.» *IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Cordoba, 2012. 1-4.
- Vázquez-González, M., Fernández-Prior, Á., et al. "Utilization of strawberry and raspberry waste for the extraction of bioactive compounds by deep eutectic solvents." *LWT*, no. 130 (2020): 109 -645.
- Weber, R.W., Anke, H., et al. "Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of arotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi)." *Chromatogr A* 1145 (2007): 118–122.
- Wickerham, L. J. "A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeast." *J Bacteriol.* 52, no. 3 (1946): 293–301.
- Wickerham, L.J., & Burton, K.A. "Carbon assimilation test for the classification of yeast." *J Bacteriol.* 56, no. 3 (1948): 363–371.

# Capítulo 1: Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

### 1.1. Introducción

Se entiende por aceite de oliva, al obtenido de los frutos de *Olea europaea* L. Asimismo, se denominan aceites de oliva vírgenes, a aquellos extraídos exclusivamente por procedimientos mecánicos y técnicos adecuados; que sean purificados únicamente por lavado, sedimentación, filtración o centrifugación (Código Alimentario Argentino, 1969). Actualmente, la extracción del aceite de oliva, se realiza mediante procesos continuos de centrifugación (Dermeche et al., 2013); que pueden ser de dos o tres fases, obteniéndose, además del aceite, diferentes residuos de acuerdo al sistema de producción utilizado (Roca et al., 2017; Lesage-Meessen et al., 2001) (Fig. 1.1).



**Fig. 1.1.** Esquema del proceso de obtención del aceite de oliva: Sistemas de tres fases y dos fases. (Roca et al., 2017).

El sistema de centrifugación de dos fases, genera un único residuo semisólido húmedo, denominado “alperujo” (Lama-Muñoz et al., 2019; Dermeche et al., 2013). Este residuo, está constituido por el agua de vegetación, la pulpa y carozos de las aceitunas (Rodríguez et al., 2018; Aguirre et al., 2010). España fue el primer país donde se utilizó el sistema de dos fases y desde allí esta tecnología se instaló en todo el mundo (Borja et al., 2006).

La industria olivícola argentina ha adoptado el sistema de extracción de dos fases, el cual genera aproximadamente 80 toneladas de alperujo por cada 100 toneladas de aceitunas procesadas (Soberón et al., 2019), lo que equivale a 213000 ton de alperujo

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

por año (Monetta e Ibañez, 2014). Particularmente, en la región del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (SOB), se producen aproximadamente 3100 ton de alperujo por año (Moisés et al., 2018).

El alperujo como residuo, posee una composición variable que depende de factores tales como, la región de origen, la variedad del olivar, las condiciones climáticas, el tiempo de cosecha y el procesamiento de las olivas (Allouche et al., 2004; Artajo et al., 2007; Usaquen-Alvarado, 2008; Ouzounidou et al., 2010; Soberón et al., 2019; IOC, 2021).

Este residuo es semisólido, presenta un alto contenido de agua (65 % - 75 %), un pH ligeramente ácido (4,9 - 6), una baja actividad de agua ( $a_w$ ) y elevada concentración de minerales como K, Ca y Na (Laurent y Suñer, 2015; Ntougias et al., 2013; Dermeche et al., 2013; Ouzounidou et al., 2010; Usaquen-Alvarado, 2008). El 90 % de su peso seco es materia orgánica, compuesta principalmente por lignina (46 %), hemicelulosa (38 %) y celulosa (21 %), además de ácidos grasos y carbohidratos (Aguirre et al., 2010; Ntougias et al., 2013). Dentro de los carbohidratos identificados se encuentran: glucosa, manitol, fructosa, manosa y sacarosa (McNamara et al., 2008; Usaquen-Alvarado, 2008). Por otro lado, el alperujo presenta alta capacidad buffer, un sistema redox complejo (conductividad: 6000-16000  $\mu\text{S}$ ) (Ouzounidou et al., 2010) y una concentración alta de compuestos fenólicos (Lama-Muñoz et al., 2019; Usaquen-Alvarado, 2008; Borja et al., 2006), siendo los más abundantes los ácidos fenólicos, secoiridoides y flavonoides, (Çelik et al., 2020; Mussio et al., 2017; Dermeche et al., 2013; Suarez et al., 2010; Borja et al., 2006; Obied et al., 2005; Romero et al., 2002; Lesage-Meessen et al., 2001).



## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

Ciertos compuestos fenólicos como: flavonoides, lignanos, ácidos fenólicos y estilbenos, a los que se le suman los presentes en el alperujo (hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína) presentan una importante actividad antioxidante (Fernández-Prior et al., 2020; Dauber et al., 2022; Collado-González, 2011; Fernandez-Bolaños et al., 2004; Bendini et al., 2007; Visioli et al., 2002). Estos compuestos, en la naturaleza protegen a las plantas y semillas de enfermedades y del daño generado por la luz ultravioleta (Suarez et al., 2010; Collado-González, 2011; Takaç y Karacaya, 2009).

Por otra parte, su incorporación en la dieta protege al organismo contra agentes oxidantes (especies reactivas del oxígeno y radicales libres), que están involucrados en la etiología de enfermedades como ciertos tipos de cáncer y la aterosclerosis (Bucciantini et al., 2021; IOC, 2021; Petrella et al., 2021; Mehmood et al., 2020). A su vez, previenen la disfunción endotelial al disminuir la expresión de moléculas de adhesión celular, aumentando la producción de óxido nítrico y removiendo radicales libres intracelulares del endotelio vascular (Bendini et al., 2007). También, inhiben la agregación plaquetaria (Bendini et al., 2007 ; Visioli et al.,2002), el crecimiento bacteriano y la oxidación de LDL (lipoproteínas de baja densidad), (Visioli et al., 2002). Presentan acción hipotensora y permiten el aumento de la capacidad antioxidante del plasma sanguíneo (Visioli et al., 2002).

Además, se están utilizando en la industria alimentaria compuestos fenólicos provenientes de desechos de la industria olivícola para prolongar la vida útil de productos de panadería (Galanakis et al., 2018). En efecto, estos compuestos pueden tolerar mejor las temperaturas de horneado, en comparación a otros antioxidantes naturales y, por otra parte, son buenos agentes antimicrobianos contra *Staphylococcus*

### Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

*aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureaginosa* (Galanakis et al., 2018). Asimismo, protegen a los nutrientes de los alimentos del deterioro oxidativo y son capaces de formar quelatos e inhibir la acción de metales pro-oxidantes (Leouifoudi et al., 2014).

Debido a todas las propiedades mencionadas, es que se sugiere el uso potencial de los compuestos fenólicos del alperujo y alpechines, como aditivos para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica (Suarez et al., 2010; Usaquen-Alvarado, 2008; Aguirre et al., 2010). En la actualidad, se están desarrollando nuevos métodos de extracción de estos compuestos aromáticos desde alperujo y alpechines (Dauber et al., 2022; Fernández-Prior et al., 2020; Rodríguez et al., 2018; Fernández-Bolaños et al., 2008; Lama-Muñoz et al., 2019).

Dado que los compuestos fenólicos presentes en las aceitunas poseen coeficientes de partición aceite/agua bajos (Obied et al., 2005), solo una pequeña fracción entra en la fase oleosa permaneciendo en su mayoría (> 98%) en los residuos olivícolas (Soberon et al., 2019; Çelik et al., 2020; Mussio et al., 2014; Takaç y Karacaya, 2009; Artajo et al., 2007; McNamara et al., 2008). En consecuencia, el alperujo y el alpechín son considerados fuentes de antioxidantes naturales con gran potencial y creciente interés bioeconómico (Çelik et al., 2020; Soberón et al., 2019; Leouifoudi et al., 2014; Lesage-Meessen et al., 2001; Takaç y Karacaya 2009).

Con el fin de recuperar estos compuestos, se han propuesto diferentes métodos tanto individuales como combinados (Takaç y Karacaya, 2009) que comprenden procedimientos de extracción (fluidos supercríticos y solventes), separación por membranas, centrifugación o técnicas cromatográficas (Obied et al., 2005; Sayadi et al.,

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

2000; Allouche et al., 2004; Soberón et al., 2019; Takaç y Karacaya, 2009; Çelik et al., 2020; De Marco et al., 2007; Leouifoudi et al., 2014; Lesage-Meessen et al., 2001; Mussio et al., 2017; Andreozzi et al., 2008; Romero et al., 2002; Fernandez-Bolaños et al., 2002).

Con respecto a los procedimientos de extracción, se han utilizado una amplia gama de solventes incluyendo acetato de etilo y mezclas de agua/metanol o agua/etanol (Obied et al., 2005; Soberón et al., 2019; Mussio et al., 2014; Allouche et al., 2004; Çelik et al., 2020; De Marco et al., 2007). El acetato de etilo se utiliza con frecuencia para extraer compuestos fenólicos de matrices acuosas tales como el alpechín y extractos de alperujo (Obied et al., 2005; De Marco et al., 2007; Borja et al., 2006; Takaç y Karakaya, 2009; Soberón et al., 2019; Mussio et al., 2014). Asimismo, el uso de solventes orgánicos, como el acetato de etilo y etanol, representan una opción más económica con respecto a las demás técnicas de extracción mencionadas (Lama-Muñoz et al., 2019).

En nuestro país, la generación del alperujo es significativa, debido a que Argentina es el principal productor y exportador de aceite de oliva de América del sur y ocupa el décimo puesto, a nivel mundial (Rodríguez et al., 2018; Monetta Y Ibañez, 2014; IOC, 2012). Los compuestos fenólicos pueden permanecer en el ambiente durante un tiempo prolongado, debido a su estabilidad y capacidad de bioacumulación (Jarboui et al., 2012). Junto con las sales, se los relaciona a los efectos fitotóxicos y antimicrobianos que genera el alperujo aplicado sin tratamiento previo, en grandes cantidades y durante tiempos prolongados sobre el suelo (Albuquerque et al., 2004; Ntougias et al., 2013; Federici et al., 2011; Fangueiro et al., 2014; Sánchez-Sánchez et al., 2020). Además, a los compuestos fenólicos de alto peso molecular, se los considera responsables del color

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

marrón oscuro característico del alperujo y del agua que se extrae del mismo (Daâssi et al., 2014; Sayadi et al., 2000). Todo esto, obliga a repensar mecanismos que permitan optimizar el manejo de este residuo, de manera de valorar su aptitud de uso (Aguirre et al., 2010).

Entre los tratamientos para remediar el alperujo, se encuentra su utilización como sustrato de bajo costo para el crecimiento de microorganismos (Borroni et al., 2017; Morillo et al., 2009; Aguirre et al., 2010; Usaquen-Alvarado, 2008; McNamara et al., 2008). Esta estrategia, por un lado, brinda la posibilidad de generar productos de alto valor agregado (pigmentos carotenoides, biopolímeros, surfactantes, enzimas); y, por otro lado, permite reducir el impacto negativo que genera en el ambiente la aplicación directa y en grandes cantidades de este tipo de desechos (Fazari, 2020; Hussein et al., 2018; Aguirre et al., 2010; Marova et al., 2012; Davoli et al., 2004; Buzzini y Martini, 1999). En el caso de la obtención de pigmentos carotenoides utilizando levaduras, una de las ventajas que brindan estos microorganismos, es que pueden utilizar fuentes simples de C y N, siendo aptos para desarrollarse sobre sustratos económicos, como el alperujo (Pereira-Cipolatti et al., 2019). Como primer paso para evaluar posibles usos de medios derivados de alperujo, es necesaria una caracterización apuntando a los factores que determinan el crecimiento de estos microorganismos.

### Objetivo General

Preparar y caracterizar extractos acuosos de alperujo (EAs) y agua de alperujo (AA) con distintas concentraciones de biofenoles, para utilizarlos como medios de cultivo de la levadura productora de carotenoides, *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638.

### Objetivos específicos

- Determinar en los extractos acuosos (EAs) y el agua de alperujo (AA) parámetros fisicoquímicos importantes para el crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 como: pH, compuestos fenólicos totales, glucosa, azúcares totales y proteínas.
- Identificar y cuantificar mediante HPLC los azúcares presentes en los EAs y AA.
- Evaluar la capacidad de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 para utilizar los nutrientes presentes en los medios derivados del alperujo.

## 1.2. Resultados y Discusión

### 1.2.1. Medios sin desfenolizar (EAs y AA)

El alperujo previamente liofilizado fue desaceitado mediante extracción sólido-líquido (ver Materiales y Métodos, sección 1.2 Muestras de alperujo), para luego preparar los Extractos acuosos (EAs). En el caso del agua de alperujo (AA), el aceite fue separado con hexano mediante extracción líquido-líquido (ver Materiales y Métodos, sección 1.3 Preparación de medios de cultivo). La cantidad de aceite residual que se obtuvo a partir del alperujo, fue de 14,7 g /100 g de alperujo (b.s) coincidiendo con el trabajo de Mussio et al., (2014), donde reporta un contenido de aceite de 14,3 g /100 g de alperujo (b.s.) en alperujos de la variedad arbequina, la misma que se utilizó en este trabajo.

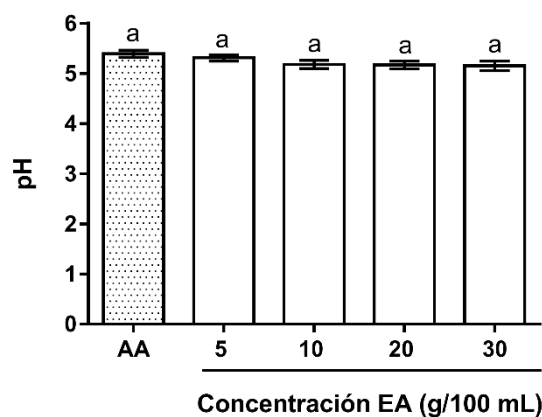
El valor de aceite obtenido, también se encuentra dentro del rango reportado en la bibliografía, para alperujos obtenidos en España (7,8 – 19,5 g/100 g de alperujo b.s.) (Alburquerque et al., 2004).

En países con gran tradición olivícola, como España, se aprovecha el aceite remanente del alperujo (Molí de la Vall , 2000). Por lo tanto, este subproducto es sometido a una segunda extracción mediante la aplicación de calor y solventes como el hexano (Usaquen-Alvarado, 2008; Molí de la Vall , 2000). Esta operación se realiza en las extractoras u orujeras, que usualmente están ubicadas en un lugar distinto al de la almazara (Usaquen-Alvarado, 2008). No obstante, este aceite para ser comestible debe refinarse (Molí de la Vall, 2000). Los productos resultantes de este proceso son, por un lado, un aceite de menor calidad, pero apto para consumo humano y, por otro lado, un alperujo más seco (10 - 13% de humedad) y extractado, denominado orujillo (Usaquen-Alvarado, 2008). Este último subproducto, se lo reutiliza como biomasa en las almazaras

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

para la generación de energía eléctrica y térmica, mediante combustión (Molí de la Vall, 2000; Usaquen-Alvarado, 2008); debido a que presenta un poder calorífico de, aproximadamente, 400 kcal/kg (Usaquen-Alvarado, 2008).

Como se observa en la Fig. 1.2, tanto el AA como los EAs analizados, son ligeramente ácidos (pH entre 5,15 - 5,39), coincidiendo con la bibliografía (Albuquerque et al., 2004; Ouzounidou et al., 2010; Ntougias et al., 2013; Ben-Sassi et al., 2006; Soberón et al., 2019). No se hallaron diferencias significativas entre los valores de pH de los diferentes EAs estudiados.



**Fig. 1.2.** Valores de pH hallados en Extractos acuosos (EAs) de alperujo, en sus diferentes concentraciones y en Agua de alperujo (AA). Letras minúsculas iguales, indican que no hay diferencias significativas entre las medias (Test Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Los valores bajos de pH junto con el estrés osmótico causado por la presencia de sales, pueden influir en la toxicidad que exhiben los desechos olivícolas, repercutiendo sobre la germinación de semillas y el crecimiento inicial de las plántulas (Ntougias et al., 2013; Ben-Sassi et al., 2006).

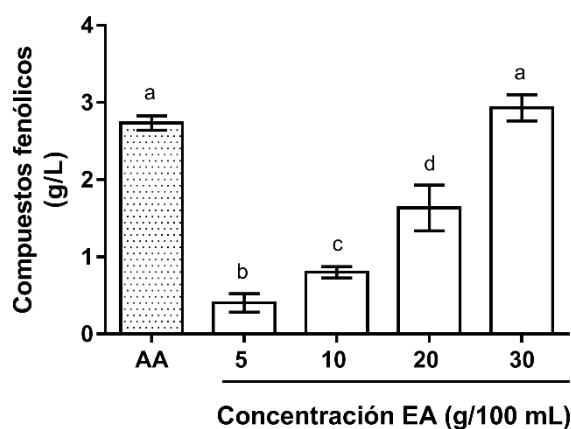
Por otro lado, un rango de pH entre 5 a 6, es óptimo para el crecimiento y la producción de carotenoides, en levaduras del género *Rhodotorula* (Aksu y Eren, 2007; Schneider et al., 2013). Por el contrario, un aumento por encima de 7 (pH= 8 - 9) como así también, una disminución por debajo de 5 (pH= 3 - 4), da como resultado un descenso

### Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

marcado en la tasa de producción de carotenoides y en el crecimiento de la levadura (Cheng y Yang, 2016; Aksu y Eren, 2007). Por consiguiente, los pH hallados en los EAs y AA, están dentro del rango óptimo tanto para el crecimiento, como para la producción de pigmentos carotenoides de este género de levaduras, y por lo tanto, no sería necesario ajustarlo.

En cuanto a los compuestos fenólicos totales hallados, como se muestra en la Fig. 1.2, la concentración más elevada se reportó en AA y en el EA 30 %. Los valores para ambos medios fueron:  $2,73 \pm 0,09$  g/L y  $2,93 \pm 0,16$  g/L, respectivamente. Dado que el alperujo tiene un contenido de agua de aproximadamente 65% se espera que el AA, que es su fracción líquida, sea similar en composición química al EA 30 %.

Con respecto a los demás EAs, la concentración de compuestos fenólicos se incrementa conforme aumenta la de los EAs (Fig. 1.3). De esta manera, el EA 5 % presenta la menor concentración de estos compuestos aromáticos, mientras que el EA de 30 %, presenta la mayor concentración. Los valores hallados para EA 30 % y AA, se encuentran por debajo de lo reportado para alpechines obtenidos mediante el sistema trifásico (Ben-Sassi et al., 2008).



**Fig. 1.3.** Concentración de compuestos fenólicos (g/L) en AA y EAs. Las letras minúsculas distintas, indican que existen diferencias significativas entre medias (Test Tukey,  $p \leq 0,05$ ).



## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

En el alperujo de la variedad Arbequina cultivada en el SOB, la oleuropeína y el ligustrósido son los secoiridoides preponderantes (Mussio et al., 2017). Además, en las corrientes sólidas de este varietal se halla un mayor contenido de hidroxitirosol, luteolina, luteolina-7-glucósido y rutina, en comparación a las corrientes sólidas de la variedad Frantoio (Mussio et al., 2014). Es importante recordar que las variedades Arbequina y Frantoio, son dos de los varietales que se cultivan con mayor frecuencia en el SOB (Ceci et al., 2019; IOC, 2011).

Como se mencionó anteriormente, las clases más importantes de compuestos fenólicos en EAs de alperujo de la variedad Arbequina, incluyen ácidos y alcoholes fenólicos, secoiridoides y flavonoides (Mussio et al., 2014). El hidroxitirosol y el tirosol son los alcoholes fenólicos más abundantes, mientras que la oleuropeína y el ligustrósido son los secoiridoides predominantes (Mussio et al., 2014; Mussio et al., 2017). Otro grupo presente, lo constituyen los flavonoides (luteolina, rutina y apigenina) y sus glucósidos (luteolina-7-O-glucosido y apigenina-7-O-glucósido) (Mussio et al., 2014).

Por otro lado, el contenido de compuestos fenólicos en el alperujo puede ser afectado también por las condiciones de extracción del aceite como, por ejemplo: el sistema de procesamiento, la temperatura y la duración de la etapa de batido, así como por la variedad de aceituna que se procesa y el año de cosecha (Soberón et al., 2019; Artajo et al., 2007).

Varios autores aislaron desde el alperujo diversos microorganismos como levaduras, hongos y bacterias (Melo et al., 2021; Borroni et al., 2017; Castro et al., 2015; Daâssi et al., 2014; McNamara et al., 2008).

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

En cuanto a las levaduras, algunos autores como Ntougias et al., (2013) y Santos y Linardi, (2001) documentan su capacidad de reducir compuestos fenólicos en especial, de especies de los géneros *Candida*, *Pichia* y *Rhodotorula*. Algunas de estas levaduras aisladas desde este subproducto, presentaron actividad  $\beta$ -glucosidasa y peroxidasa que podrían contribuir a la degradación de compuestos fenólicos (Romo-Sanchez et al., 2010; Ntougias et al., 2013).

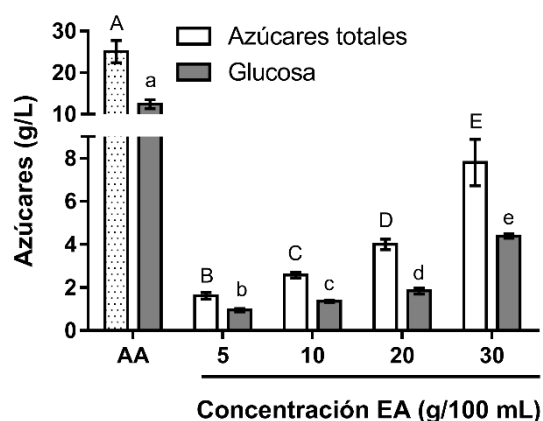
Por otra parte, Gonçalves et al., (2009) demuestran que algunas cepas de levaduras lipolíticas como *Candida rugosa* (PYCC 3238 y CBS 2275), *Candida cylindracea* (CBS 7869) y *Yarrowia lipolytica* (W29) pueden crecer en un medio adicionado con compuestos fenólicos comúnmente encontrados en residuos olivícolas (catecol, hidroxitirosol, ácido cafeico, tirosol y oleuropeína), en concentraciones de hasta 1 g/L. En todos estos casos, se obtuvo una menor cantidad de biomasa final (comparada con el medio control) y en particular, con ácido cafeico y catecol, se produjo una significativa disminución del crecimiento.

Sin embargo, estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, no encontraron ácido cafeico ni catecol entre los biofenoles extraídos del alperujo (Mussio et al., 2014; Mussio et al., 2017). En el caso del ácido cafeico, solo se lo halló en el aceite analizado y las concentraciones encontradas de hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína fueron:  $2,222 \pm 26$ ,  $163 \pm 16$  y  $404 \pm 88$  mg/Kg de alperujo (b.s.), respectivamente (Mussio et al., 2014). Estimando la preparación de un EA al 30 % esto daría concentraciones de 0,75, 0,04 y 0,12 g/L. Estos valores se hallan por debajo de lo reportado como inhibitorio para *Candida spp.* y *Yarrowia spp.* (Gonçalves et al., 2009).

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

Por otro lado, Santos, (2001) documenta que levaduras del género *Rhodotorula spp.*, presentan la capacidad de degradar fenol hasta 0,7 g/L. Sin embargo, este compuesto presenta un efecto inhibitor en levaduras de este género, cuando en el medio de cultivo existen concentraciones superiores a 1 g/L, lo que resulta en una reducción de las tasas de crecimiento (Santos y Linardi, 2001). De esta manera, la tasa de degradación de los compuestos fenólicos y su efecto inhibitor, depende de la especie de levadura, el tiempo de incubación y de las concentraciones iniciales de estos compuestos que contenga el medio de cultivo (Santos y Linardi, 2001).

El alperujo presenta, además, una gran concentración tanto de azúcares simples, como complejos (Daâssi et al., 2014; Fernandez-Bolaños et al., 2004; Ouzounidou et al., 2010 ; Ben-Sassi et al., 2006; D'Annibale et al., 2006). Estos carbohidratos, se hallan en diferentes concentraciones, según la variedad de las aceitunas y las condiciones climáticas durante su desarrollo (Borja, et al., 2006).



**Fig. 1.4.** Concentración de azúcares totales y glucosa (g/L) en Agua de Alperujo (AA) y Extractos Acuósos (EAs). Las Letras mayúsculas diferentes expresan diferencias significativas entre medias de Azúcares totales y las letras minúsculas respecto a la concentración de Glucosa (Test Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

En particular, los azúcares simples, al ser solubles en agua se transfieren a los EAs y quedan en el AA. De esta manera, como se puede observar en la Fig. 1.4, en AA se

### Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

hallaron  $12,43 \pm 1,06$  g de glucosa y  $25,05 \pm 2,67$  g de azúcares totales, que representan cantidades significativamente superiores, en comparación a las halladas en todos los EAs.

Es importante destacar que, al igual que sucede con los compuestos fenólicos, conforme aumenta la concentración de los EAs, se incrementa la concentración de los carbohidratos presentes (Fig. 1.4). Es así que, se encontraron diferencias entre las distintas concentraciones de azúcares totales y glucosa, entre los EAs. Asimismo, los resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos a partir de los análisis por HPLC realizados en AA y EAs, (Tabla 1.1 y Fig. 1.5), demuestran la variedad de azúcares solubilizados.

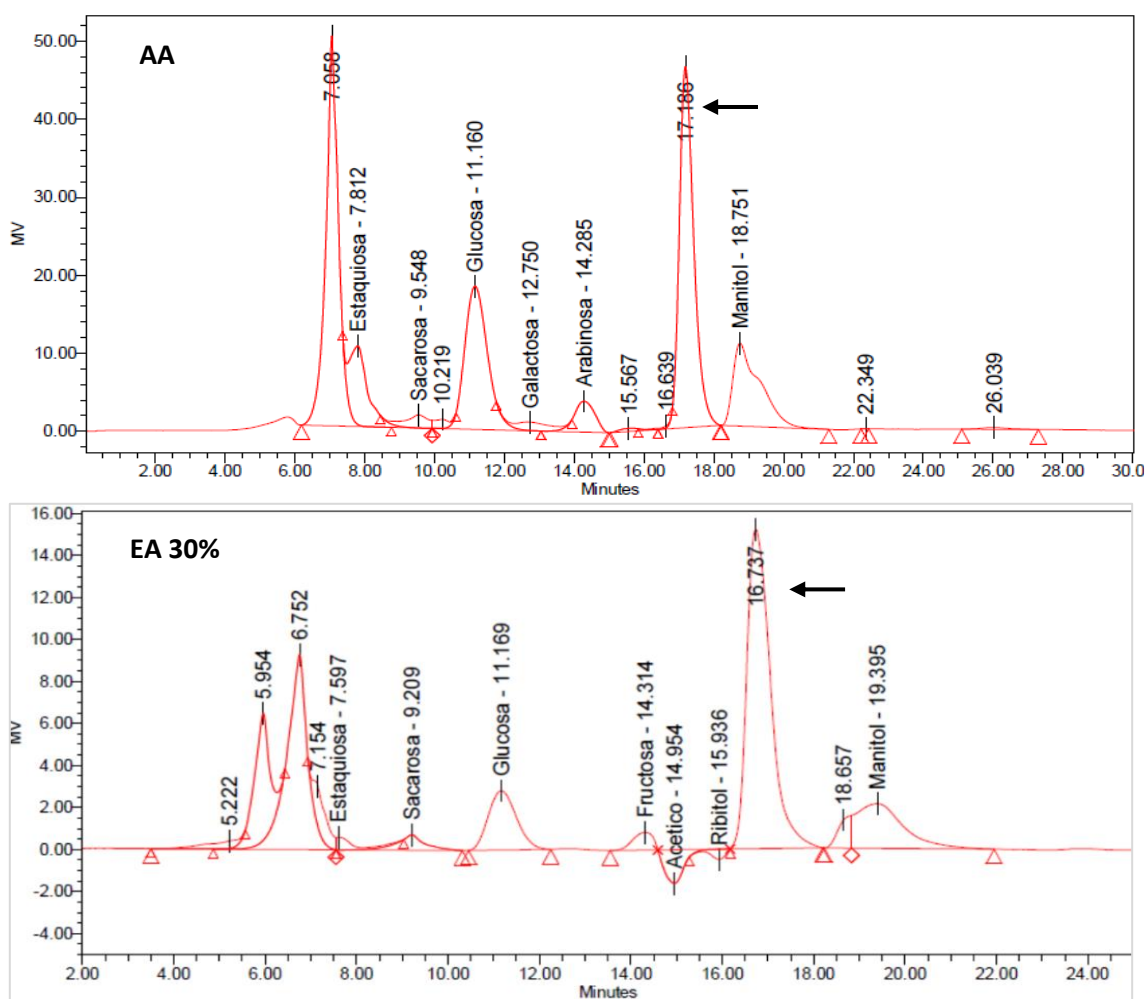
Azúcar (g/L)	EA 5 %	EA 10 %	EA 20 %	EA 30 %	Agua de Alperujo
Estaquiosa	$0,162 \pm 0,002^*$	$0,258 \pm 0,006^*$	$0,523 \pm 0,05^*$	$1,23 \pm 0,05^*$	$3,45 \pm 1,25^*$
Sacarosa	-----	$0,056 \pm 0,002^*$	$0,19 \pm 0,03^*$	$0,816 \pm 0,002^*$	$1,64 \pm 0,90^*$
Glucosa	$0,952 \pm 0,07^*$	$1,59 \pm 0,05^*$	$1,84 \pm 0,14^*$	$4,38 \pm 0,10^*$	$12,4 \pm 1,07^*$
Fructosa	$0,217 \pm 0,08^*$	$0,31 \pm 0,03^*$	$0,44 \pm 0,01^*$	$1,07 \pm 0,01^*$	$2,26 \pm 0,22^*$
Manitol	$0,146 \pm 0,001^*$	$0,33 \pm 0,06^*$	$0,97 \pm 0,08^*$	$1,99 \pm 0,01^*$	$5,28 \pm 1,11^*$

**Tabla 1.1.** Azúcares hallados en Agua de Alperujo (AA) y en Extractos Acuosa (EAs) mediante HPLC. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  S.D., n=3. La concentración de cada azúcar fue comparada entre muestras \* indica diferencias estadísticamente significativas,  $p < 0,05$ .

En el análisis por HPLC del AA, (Tabla 1.1, Fig. 1.5 A), se encontró que el azúcar de mayor concentración fue glucosa, seguida de manera descendente por manitol, estaquiosa, fructosa y sacarosa, concordando con Ben-Sassi et al., (2006) y Fernandez-Bolaños et al., (2004). Por otro lado, en los EAs (Tabla 1.1, Fig. 1.5 B), los carbohidratos

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

encontrados fueron: glucosa, seguida de manera descendente por manitol, estaquiosa y fructosa, detectándose en menor concentración, sacarosa.



**Fig. 1.5.** Cromatogramas mostrando los azúcares hallados en **A)** Agua de Alperujo y **B)** Extracto Acuoso 30 %.

Es de destacar, que en algunas muestras se hallaron trazas de otros azúcares como: rafinosa, xilosa, galactosa, ribitol e inositol. Estos carbohidratos se encontraron en concentraciones muy bajas y no se detectaron en todas las muestras, por lo cual, no se tomaron en cuenta para el análisis de datos. A pesar de que cualitativamente los cromatogramas no mostraron grandes discrepancias, sí se encontraron diferencias cuantitativas en los azúcares hallados entre EAs y AA. Es así que, como se muestra en Tabla 1.1, el AA posee una mayor concentración de todos los azucares hallados. Es

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

necesario aclarar que, el pico que se observa aproximadamente a los 16 minutos en ambos cromatogramas de la Fig. 1.5 (indicado con una flecha), corresponde a un remanente de alcohol etílico, que se utilizó para el lavado de la jeringa, durante la filtración de las muestras, antes de ser introducidas en los viales del HPLC.

Sacarosa y glucosa son dos de los carbohidratos, que se encuentran de manera universal en todo el reino vegetal (Lee et al., 1970). La glucosa está por lo general, asociada estrechamente a la xilosa, mediante uniones glicosídicas (Lee et al., 1970 ; McKee y McKee, 2008). Por el contrario, la manosa a diferencia de glucosa, es menos abundante en las plantas, hallándose solo en trazas (Lee et al., 1970). Sin embargo, la reducción del monosacárido manosa, produce manitol y este polialcohol se encuentra presente tanto en frutos como en semillas (McKee y McKee, 2008). Junto con la glucosa, es el principal azúcar soluble presente en la pulpa de la aceituna (Fernandez-Bolaños et al., 2004). Como ya se indicó, los azúcares son solubles en agua, es esperable que se encuentren en el alperujo y se extraigan de la fase acuosa al preparar los EAs o separar el AA, así como en los desechos generados por el sistema de extracción trifásico (alpechín), (Mechri et al., 2011). De esta manera, es posible la utilización del alperujo como fuente de manitol y de azúcares fermentables (Fernandez-Bolaños et al., 2004; Fernández-Bolaños et al., 2008).

La fructosa también es un azúcar ampliamente distribuido en el reino vegetal (Lee et al., 1970). Si bien puede encontrarse como azúcar libre (Lee et al., 1970), también se lo puede hallar asociado a través de enlaces glicosídicos, formando el disacárido sacarosa (Lee et al., 1970). De esta manera, la hidrólisis de la sacarosa, favorecida por el

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

medio ácido de los EAs o el AA, contribuiría a la concentración tanto de fructosa como de glucosa en solución (Lee et al., 1970 ; McKee y McKee, 2008).

En cuanto a la estaquiosa, es un tetrasacárido que se halla presente en las plantas. Está formado por dos unidades de galactosa y una de sacarosa (Lee et al., 1970) y su hidrolisis, puede escindir unidades de fructosa y glucosa (Lee et al., 1970; McKee y McKee, 2008), aumentando de esta manera, la concentración de estas hexosas en los EAs y en el AA.

Con respecto a los carbohidratos minoritarios como la xilosa, que se halló en algunas muestras de AA y EAs, se puede justificar su presencia ya que se encuentra de manera universal en las plantas vasculares superiores (Lee et al., 1970). En este grupo de plantas, es el componente más importante que constituye el material lignocelulósico de las paredes celulares (Lee et al., 1970). Se lo halla de manera libre como traza, pero también se lo puede encontrar unido a la glucosa (Lee et al., 1970).

La presencia de rafinosa, es el trisacárido más abundante encontrado en la naturaleza y ampliamente hallado en el reino vegetal (Lee et al., 1970). Además, se puede hidrolizar aportando hexosas como glucosa y galactosa, también presentes en este medio. Además, Mechri, et al. (2011) documenta la presencia de galactosa y del polialcohol inositol, en residuos olivícolas provenientes de los sistemas continuos de centrifugación. Con respecto al ribitol es un polialcohol formado por la reducción de la ribosa y se lo puede encontrar en forma natural en pequeñas trazas en el reino vegetal (McKee y McKee, 2008).

Como se ha mostrado, el AA contiene una concentración mayor de azúcares que los EAs. Esto podría deberse a que el AA es un medio fresco obtenido por centrifugación,

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

mientras que los EA se obtienen haciendo una extracción con agua del alperujo liofilizado. De esta manera, la liofilización, podría provocar cambios sobre la estructura del alperujo que dificultarían la solubilización de los azúcares. La liofilización es un proceso de deshidratación basado en la sublimación del hielo contenido en el material (Marques y Freire, 2005). A pesar de que, los productos liofilizados mantienen sus características estructurales de forma superior a los que son secados mediante técnicas convencionales, pueden sufrir ciertos daños estructurales y químicos, debido a que el proceso se lleva a cabo a temperaturas muy bajas (Marques y Freire, 2005). En efecto, la liofilización puede reducir la disponibilidad de sólidos solubles (Yamashita et al., 2017), lo que explicaría la menor cantidad de azúcares en los EAs con respecto al AA.

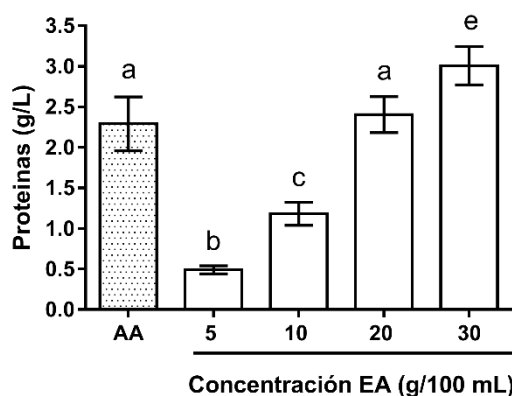
Con el objetivo de establecer posibles fuentes de nitrógeno empleadas por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en los medios analizados, se determinó la concentración de proteínas. La capacidad de las levaduras de este género para producir pigmentos carotenoides, se ve afectada por distintos parámetros ambientales (Voaides y Dima, 2012). Según Voaides y Dima, (2012), la composición del medio de cultivo, demuestra tener una influencia significativa respecto a la acumulación de biomasa y producción de carotenoides en el género *Rhodotorula*, especialmente el efecto de la fuente de nitrógeno. De esta manera, Voaides y Dima, (2012) obtienen un incremento en el crecimiento y la producción de carotenoides en levaduras del género *Rhodotorula*, cuando se desarrollan en medios de cultivos adicionados con fuentes nitrogenadas como: nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Además, de la adición de ciertos aminoácidos como, ácido glutámico ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ) y treonina ( $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$ ).



## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

Se hallaron concentraciones significativas de proteínas tanto en AA como en los EAs, coincidiendo con Alburquerque et al., (2004); Dermeche et al., (2013); Morillo et al., (2009) y Maass et al., (2016). Estos autores reportan cantidades de proteínas en alperujo de entre 7 – 9 % (p/p) de la materia orgánica total.

En este trabajo, se halló  $2,3 \pm 0,3$  g/L para el AA y  $3,0 \pm 0,2$  g/L, para el EA 30 % (Fig. 1.6). Estos valores son ligeramente más altos a los reportados para alpechín, en donde se encontró una cantidad de proteína entre 0,8 -1,3 g/L (Gonçalves et al., 2009).



**Fig. 1.6.** Concentración de Proteínas (g/L BSA) hallada en Agua de Alperujo (AA) y en Extractos Acuoso (EAs) en sus diferentes concentraciones. Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas entre medias (Test Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Comparando la cantidad hallada de proteína entre los EAs, podemos observar, que conforme aumenta su concentración, se incrementa la cantidad de proteínas (Fig. 1.6). Por otro lado, es importante señalar que, el EA 20 % presenta la misma concentración de proteínas que el AA. A su vez, la concentración de proteínas del EA 30% fue mayor que la del AA.

La matriz lignocelulósica consiste principalmente en tres tipos diferentes de polímeros vegetales: celulosa, hemicelulosas y lignina. Estos componentes, se hallan estrechamente asociados entre sí (Hendriks y Zeeman, 2009) mediante diferentes tipos de enlaces covalentes (Lawther et al., 1996).

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

De esta manera, la fibra alimentaria constituye una de las fracciones más importantes de los residuos de origen vegetal, como el alperujo (Valiente et al., 1995). En el caso de este subproducto olivícola, presenta una mayor proporción de lignina (Molina Alcaide et al., 2003). Por otra parte, una característica que presenta el alperujo es que contiene proteína asociada a los componentes de la fibra, la cual representa aproximadamente el 80% del total de las proteínas presentes (Valiente et al., 1995; Molina Alcaide et al., 2003). Mientras que, las proteínas de la pared celular, solo representan una pequeña proporción de las proteínas totales del alperujo (Valiente et al., 1995). Sin embargo, dado que la fracción lignocelulósica no es soluble en agua, las proteínas asociadas a ella, no se solubilizarían fácilmente en soluciones acuosas, por lo cual no contribuirían a las proteínas totales halladas en los EA o AA (Molina-Alcaide et al., 2008; Alburquerque et al., 2004; Valiente et al., 1995). Es decir, que las proteínas halladas tanto en AA como en los EAs, corresponderían a proteínas solubles que provendrían del citoplasma de las células vegetales.

Según Valiente et al., (1995), los desechos olivícolas presentan una apreciable cantidad de proteína (8,6 % respecto a materia seca) con elevado contenido de glutamina y asparagina. Además, las proteínas presentes en los orujos de aceituna contienen todos los aminoácidos esenciales. Sin embargo, la mayoría de las proteínas presentes están asociadas a la fibra insoluble, por lo cual no son extraíbles con agua (Valiente, 1995). De esta forma luego de preparar los medios, quedaría un sólido lignocelulósico, con proteínas asociadas y menor contenido de compuestos fenólicos (Rodríguez-Gutierrez et al., 2007; Lama-Muñoz, et al. 2011; Fernandez-Bolaños et al., 2002; Rubio-Senent, 2011).

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

En cuanto a fuentes de N inorgánicas, en algunos trabajos se menciona la presencia de nitratos y amonio en alperujo en pequeñas proporciones ( $\text{NO}_3^- < 1 \text{ g N kg}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4^+ 0,005 \text{ g N kg}^{-1}$ ; N total =  $14.1 \text{ g kg}^{-1}$ ) (Sánchez-Sánchez, 2020; Fangueiro et al., 2014). A su vez, es importante recordar que este subproducto olivícola posee una composición química variable, que depende de numerosos factores (Molina-Alcaide et al., 2003; Artajo et al., 2007; Usaquen-Alvarado, 2008; Ouzounidou et al., 2010; Soberón et al., 2019). Por lo que la presencia de estos compuestos nitrogenados también podría fluctuar.

Los componentes orgánicos e inorgánicos del alperujo ya se hallan presentes en las aceitunas, como resultado de los procesos biológicos de la planta y de la extracción de minerales que realiza desde el suelo (Aguirre et al., 2014). En relación a los suelos del SOB, éstos se caracterizan por su reducida fertilidad, como consecuencia de los bajos niveles de materia orgánica que presentan (Martínez et al., 2017; Aguirre et al., 2014; Gatti y González, 2009). De esta manera, por su dinámica, susceptibilidad a las pérdidas y altos requerimientos de las plantas, el nitrógeno suele ser uno de los nutrientes más deficientes en el SOB (Martínez, 2015).

En particular, Gatti y González, (2009) caracterizaron los suelos de los olivares del Establecimiento RumarOli, hallando los siguientes valores de nutrientes: C (orgánico):  $31-18 \text{ g C kg}^{-1}$ , N:  $2,4-1,8 \text{ g N Kg}^{-1}$ , P (disponible):  $21,9-21,7 \text{ mg P Kg}^{-1}$  y K (disponible):  $685,7 \text{ mg K Kg}^{-1}$ . Es importante señalar que, todos los valores informados se encuentran dentro de los parámetros normales para los suelos de la zona (Gatti y González, 2009). No obstante, respecto al contenido de N y compuestos nitrogenados del SOB, son bajos en comparación a otras regiones (Martínez, 2015).

### 1.2.2. Medios desfenolizados (EAs y AA). Reducción del contenido inicial de compuestos fenólicos.

Según Soberon et al., (2019), los extractos acuosos de alperujo (EAs) se comportan de manera similar a los alpechines en cuanto a la recuperación de compuestos fenólicos. De esta manera, con la finalidad de recuperarlos y al mismo tiempo, reducir su posible efecto inhibitor en el desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, se utilizó la técnica de extracción líquido-líquido, empleando acetato de etilo (Mussio et al., 2017), (Capítulo Materiales y Métodos, sección 1.3 c Preparación de medios desfenolizados).

Entre los diferentes procedimientos que se emplean para extraer antioxidantes naturales como los compuestos fenólicos, la extracción líquido-líquido representa una alternativa simple, siendo ampliamente utilizada a escala piloto (Allouche et al., 2004; Obied et al., 2005). El tipo de solvente utilizado puede afectar el rendimiento y el perfil de compuestos fenólicos que se extrae, debido a las diferentes afinidades entre los compuestos fenólicos y el solvente; además de su capacidad de romper las paredes celulares para permitir la liberación de los biofenoles (Mussio et al., 2017). Habitualmente, para extraer compuestos fenólicos desde los residuos olivícolas, se utilizan soluciones hidroalcohólicas (constituidas por metanol o etanol) en diferentes concentraciones o acetato de etilo (Soberon et al. 2019; González-Benjumea, 2017; Obied et al., 2005; De Marco et al., 2007).

Los alcoholes son capaces de romper las paredes celulares e inhibir la acción de enzimas endógenas. Además, las mezclas con agua los hacen buenos disolventes para gran parte de los compuestos fenólicos (Çelik et al., 2020; Mussio et al., 2017). Sin embargo, estas mezclas también extraen azúcares, reduciendo la disponibilidad de la

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

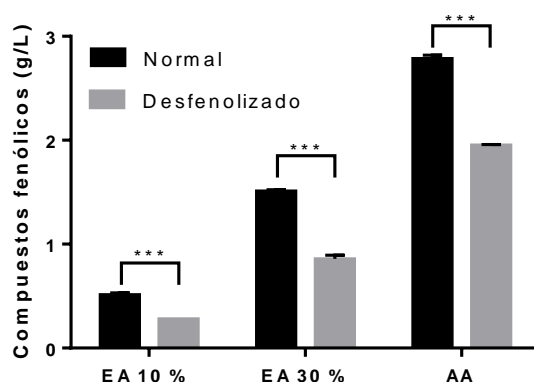
fuentes de carbono, lo que constituye una gran desventaja si se desea luego realizar un bioproceso.

Es por ello que, se eligió como solvente el acetato de etilo, el cual no solubiliza azúcares y también está aprobado por el código alimentario argentino, como solvente para la preparación de extractos naturales (Código Alimentario Argentino, 1969). En particular, este solvente, es adecuado para recuperar compuestos fenólicos simples como hidroxitirosol, tirosol y flavonoides presentes en los residuos olivícolas (Çelik et al., 2020; Leouifoudi et al., 2014; Allouche et al., 2004; Lesage-Meessen et al., 2001). Esto se debe a que, al ser más polar que otros solventes utilizados (metil isobutil cetona, metil etil cetona, dietil eter), es muy selectivo para moléculas fenólicas de peso molecular medio y bajo (Allouche et al., 2004; Obied et al., 2005; Çelik et al., 2020; Lesage-Meessen et al., 2001; Leouifoudi et al., 2014). Sin embargo, la extracción con acetato de etilo, puede resultar en la pérdida de biofenoles de alto peso molecular y ciertos glicósidos de biofenoles (Romero et al., 2002; Obied et al., 2005).

Como ya se mencionó, algunos compuestos fenólicos presentes en residuos olivícolas tienen actividad antimicrobiana (Morillo et al., 2009; Usaquen-Alvarado, 2008; Sayadi et al., 2000; Allouche et al., 2004; Fangueiro et al., 2014). La disminución en su concentración, podría permitir que los EAs y el AA desfenolizados sean sustratos más adecuados para ser empleados en bioprocesos, por ejemplo, la producción de pigmentos carotenoides por levaduras. Por esta razón, se decidió desfenolizar los medios de mayor concentración de compuestos fenólicos (EA 30 % y AA), junto con el EA 10%, que se utilizó como modelo de un medio con menor concentración de alperujo y mayor proporción de carbohidratos y proteínas, respecto al EA 5%.

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

Como se muestra en la Fig. 1.7, la desfenolización con acetato de etilo redujo el contenido de compuestos fenólicos aproximadamente, en un 45 % en ambos EAs y un 30 % en AA. De esta forma, se obtiene un extracto de biofenoles como otro subproducto en la cadena de valorización propuesta. Estos resultados son similares a los de Lesage-Meessen et al., (2001), en dónde extrajeron aproximadamente un 42 % de compuestos fenólicos desde el alperujo.



**Fig. 1.7.** Concentración de compuestos fenólicos (g/L ác. cafeico) hallada en los extractos acuosos de alperujo (EAs 10 % y 30 %) y en el agua de alperujo (AA), tanto en la condición normal (sin desfenolizar), como en la condición desfenolizada. \* Indica diferencias estadísticamente diferentes  $p < 0,01$ .

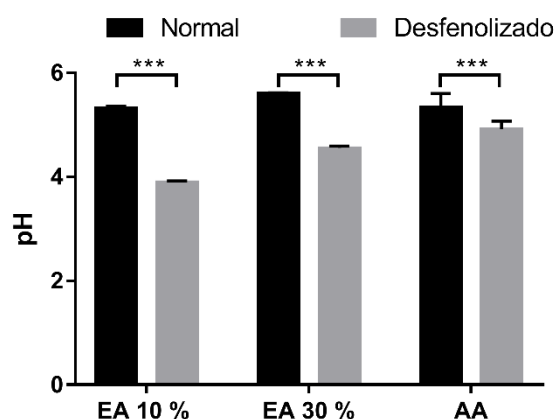
De forma semejante, los resultados se aproximan a los obtenidos por Soberon et al., (2019), en dónde mediante la misma cantidad de extracciones con acetato de etilo que se realizaron en este trabajo, pudieron recuperar entre un 35-40 % de compuestos fenólicos presentes en EAs de alperujo, de la variedad Arbequina.

Sin embargo, aunque el acetato de etilo disminuyó la concentración inicial de biofenoles en los medios analizados, todavía deja una cantidad significativa de compuestos fenólicos. Asimismo, Soberón et al., (2019) menciona que realizando tres extracciones sucesivas utilizando acetato de etilo, se maximiza la obtención de compuestos fenólicos desde el alperujo. No obstante, si se llevara a cabo una mayor cantidad de extracciones con este solvente, no aumentaría de manera significativa el

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

rendimiento del proceso. El procedimiento se volvería costoso y menos amigable para el medio ambiente por el excesivo uso de solvente (Soberón et al., 2019).

La desfenolización de los medios produjo una reducción en el pH (Fig. 1.8). Esto probablemente se deba, a cierta hidrólisis del acetato de etilo y la consecuente liberación en el medio de ácido acético, que es soluble en agua (Chang, 1999). Por lo tanto, para realizar los cultivos se corrigió el pH de estos medios llevándolos a valores similares a los de los medios no desfenolizados (Fig. 1.8).

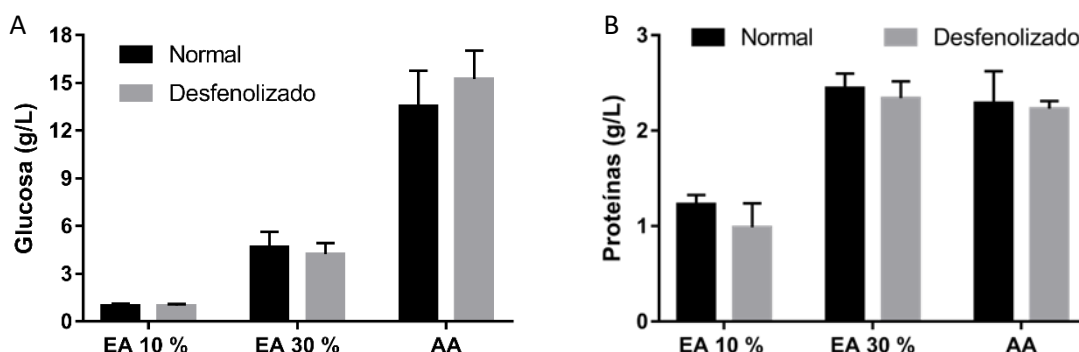


**Fig. 1.8.** Valores de pH obtenidos en los extractos acuosos de alperujo (EA) de 10 % y 30 % y en agua de alperujo (AA), bajo condición Normal (sin desfenolizar) y Desfenolizado. \* Indica diferencias estadísticamente diferentes  $p < 0,01$ .

De esta manera, los pH obtenidos se ajustaron a los rangos apropiados tanto para el desarrollo, como para la síntesis de carotenoides en levaduras del género *Rhodotorula* según Çelik et al., (2020), Dias-Rodrigues et al., (2019), Frengova y Beshkova, (2008), Aksu y Eren, (2007), De Marco et al., (2007) y Obied et al., (2005). Por otra parte, el contenido de glucosa no se vio afectado por la extracción de compuestos fenólicos (Fig. 1.9 A), debido a que este azúcar no es soluble en acetato de etilo (Mussio et al., 2017). Como ya se mencionó, esta es una ventaja ya que, al usar este solvente no se ve afectada la concentración de la principal fuente de carbono presente en los medios. Del mismo

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

modo, la concentración de proteínas no fue modificada por este método de desfenolización, como se puede observar en la Fig. 1.9 B.



**Fig. 1.9.** A-Concentración de Glucosa (g/L) halladas en los EAs y en AA, bajo condición Normal (sin desfenolizar) y Desfenolizado. B- Concentración de proteínas (g/L BSA), halladas en los EAs y en AA, bajo condición Normal (sin desfenolizar) y Desfenolizado.

### 1.2.3. Pruebas de asimilación de nutrientes en *Rh. mucilaginoso* LPSC 638

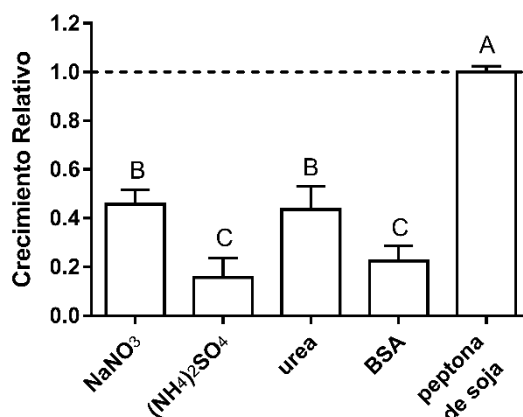
Dada la diversidad de nutrientes presentes en los medios derivados del alperujo evaluamos la capacidad de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 de utilizarlos para su desarrollo. Para la prueba de asimilación de N, utilizamos  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , peptona, urea y BSA como únicas fuentes de nitrógeno (Wickerham, 1946). De manera similar, la prueba de asimilación de carbohidratos, se llevó a cabo utilizando estaquiosa, rafinosa, sacarosa, glucosa, fructosa o manitol como única fuente de C (Wickerham y Burton, 1948). Los EAs como el AA contienen cantidades notables de estos azúcares (Cap.1 páginas 38-45).

Con respecto a las fuentes de N, las levaduras del género *Rhodotorula* son capaces de utilizar una gran diversidad de compuestos nitrogenados (Elfeky et al., 2019; Voaides y Dima, 2012; Ferrao y Gang, 2011; Messenguy et al., 2006).



## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

De esta manera, en la Fig. 1.10 se puede observar que *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 fue capaz de metabolizar todas las fuentes de N evaluadas, aunque con distinta eficiencia (peptona >  $\text{NaNO}_3$  = urea > BSA =  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).



**Fig. 1.10.** Utilización de diferentes fuentes de nitrógeno por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, en dónde se observa un crecimiento significativamente mayor en peptona por sobre el resto de los compuestos nitrogenados. La línea punteada indica el desarrollo de la levadura en medio completo. Las barras representan la media y el S.D. (n=4) \*p<0,01.

Sin embargo, el crecimiento fue mucho más eficiente utilizando peptona de soja como fuente de nitrógeno. Entre las fuentes de N que podrían estar presentes en los medios derivados del alperujo (proteína y en menor cantidad  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), el crecimiento fue bastante menor, lo que podría constituir una limitación. Sin embargo, la escasez de N en el medio estimula la producción de carotenos (Marova et al., 2004).

Entre las levaduras existe variación en cuanto a la capacidad de utilizar determinados compuestos nitrogenados, ya sea entre diferentes géneros (Messenguy et al., 2006; Arevalo-Chávez, 1998; Voaides y Dima, 2012; Ferrao y Gang, 2011; Elfeky et al., 2019), entre especies del mismo grupo taxonómico (Libkind et al., 2004; Wickerham, 1946; Sampaio, 2010; Liboa et al., 2012; Frengova y Beshkova, 2008), e incluso en cepas de la misma especie.

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

Respecto a este último punto, por ejemplo, *Rh. mucilaginosa* CRUB 0138 y *Rh. mucilaginosa* PYCC 5166T, son incapaces de metabolizar nitratos (Libkind et al., 2004), mientras que, *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, sí los puede metabolizar (Fig. 1.10).

Resultados similares fueron obtenidos por Ferrao y Gang, (2011), dónde observaron un menor crecimiento de *Rh. graminis* RC04, cuando se desarrolla en un medio con  $\text{NaNO}_3$  como única fuente de N. Por el contrario, Latha et al., (2005) documentaron un desarrollo notable para la misma especie, utilizando esta sal como única fuente de N. Por consiguiente, las especies del género *Rhodotorula* no exhiben un patrón común para metabolizar una misma fuente de nitrógeno (Sampaio, 2010). Esta característica podría ser específica de la cepa y/o de la especie como lo es, la respuesta hacia diferentes relaciones C/N en el medio de cultivo (Libkind et al., 2004).

Por otra parte, según Arevalo-Chávez, (1998) entre las fuentes de nitrógeno que presentan mejor asimilación en levaduras, se encuentran la urea y las sales de amonio (Liboa et al., 2012; Voaides y Dima, 2012; Elfeky et al., 2019). Con respecto a la urea, las levaduras del orden Basidiomycetes, como *Rhodotorula spp.*, presentan actividad ureasa, por lo tanto, pueden degradar este compuesto nitrogenado (Liboa et al., 2012; Sampaio, 2010; Messenguy et al., 2006).

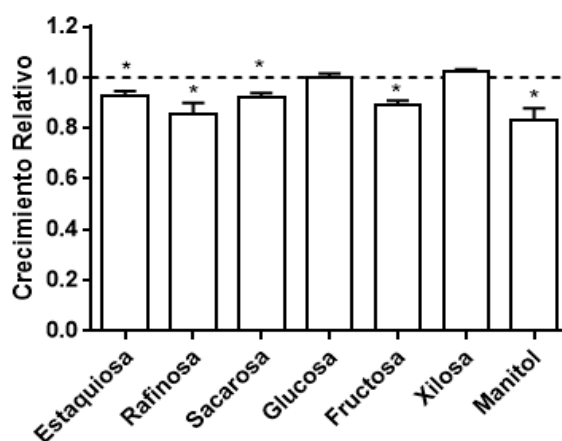
Según Liboa et al., (2012) todas las levaduras son capaces de utilizar nitrógeno en forma de amonio, como por ejemplo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Este compuesto brinda no sólo la fuente de N, sino que también, el azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos (Liboa et al., 2012). No obstante, de las fuentes de nitrógeno evaluadas para *Rh. mucilaginosa* LPSC 638,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue el que generó un menor crecimiento junto con la proteína BSA (Fig. 1.10).

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

Por otro lado, la menor capacidad de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 para metabolizar BSA en comparación con la peptona, podría deberse a que al ser un hidrolizado de proteína, sería más compleja de asimilar que la peptona.

Los resultados obtenidos en la prueba de asimilación de N, sugieren que *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 al desarrollarse en los medios derivados de alperujo, podría consumir mayormente iones nitrato, amonio y/o proteínas, como fuente de nitrógeno disponible. Siendo que no se espera que las fuentes de N inorgánicas estén en cantidades significativas, las proteínas serían la principal fuente de N en estos medios.

Respecto a los azúcares presentes en el alperujo, como se observa en la Fig. 1.11, *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 utilizó de manera significativa todos los azúcares analizados.



**Fig. 1.11.** Utilización de diferentes carbohidratos como fuente de C, por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Se observa crecimiento significativo con todos los azúcares analizados, especialmente glucosa y xilosa. La línea punteada indica el desarrollo de la levadura en medio completo. Las barras representan la media y el S.D. (n=4) \* $p < 0,01$  respecto del control.

Glucosa y xilosa, fueron los monosacáridos consumidos en mayor proporción respecto al tercer monosacárido analizado: fructosa y a los demás carbohidratos. Este resultado coincide con Arevalo-Chávez, (1998), dónde afirma que este azúcar simple, es metabolizado por *Rh. mucilaginosa spp.* en menor proporción que la glucosa.

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

De manera análoga, los resultados obtenidos respecto al metabolismo de xilosa, coinciden con Janda, (1972), dónde comprueba el consumo significativo de este azúcar en *Rh. glutinis* 5 (Fres) Harrison, cuando crece en un medio con este carbohidrato como única fuente de C. El nivel de xilosa aumentaba en las células de la levadura, en paralelo a su disminución en el medio (Janda, 1972). Cabe señalar que, en las levaduras, los monosacáridos pueden ingresar en las células mediante dos vías diferentes: difusión facilitada o por mecanismo activo, que depende de la energía metabólica (Spencer-Martins, 1994; Arevalo-Chávez, 1998; Cirillo, 1961).

Por otro lado, el disacárido sacarosa, es rápidamente hidrolizado por la enzima invertasa que se ubica por fuera de la membrana celular (Arevalo-Chávez, 1998). Los monosacáridos resultantes (glucosa y fructosa), ingresan posteriormente a la célula (Arevalo-Chávez, 1998; Janda, 1974; Cirillo, 1961). De manera análoga, Janda, (1974) demuestra la actividad invertasa en *Rh. glutinis* 5 (Fres) Harrison.

Con respecto a la rafinosa, este trisacárido está constituido por galactosa, glucosa y fructosa (McKee y McKee, 2008; Janda, 1974) y es consumido por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 al igual que los demás azúcares analizados (Fig. 1.11). Sin embargo, también es metabolizado en menor proporción en comparación a glucosa y xilosa.

Estos resultados coinciden con Janda, (1974), en dónde la incubación de *Rh. glutinis* 5 (Fres) Harrison en un medio con rafinosa como única fuente de C, arroja como resultado la presencia de fructosa y glucosa en el medio, después de la hidrólisis mediada por la invertasa. Esta enzima actúa separando la glucosa de la fructosa, permitiendo que este último monosacárido ingrese a la célula mediante transporte

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

activo. Mientras que, la glucosa permanece unida a la galactosa sin poder atravesar la membrana celular (Janda, 1974).

Por último, estaquiosa y manitol también fueron metabolizados por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 (Fig. 1.11). La capacidad de las levaduras para metabolizar polialcoholes, tiene que ver tanto con la presencia o ausencia de enzimas particulares (Gunsalus, 1955), como también de los mecanismos para el ingreso de estos compuestos en las células de levadura (Barnett, 1968). Respecto a las enzimas involucradas, son de importancia las que están asociadas a la oxidación del polialcohol (Barnett, 1968). En síntesis, las levaduras utilizan en primer lugar los monosacáridos, mientras que los disacáridos, trisacáridos, polisacáridos y polioles, son asimilados luego de ser hidrolizados (Arevalo-Chávez, 1998).

### 1.3. Conclusiones parciales

- El desengrasado del alperujo con hexano permite la recuperación de 14,7 g de aceite de oliva por cada 100 g de alperujo (b.s.).
- Los medios líquidos derivados del alperujo (EA y AA) constituyen una matriz compleja que ofrece un medio de reacción y fuentes de C y N adecuadas para el desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638.
- Los EAs y el AA son ligeramente ácidos, con valores de pH que se ubican dentro del rango óptimo para el desarrollo y la producción de pigmentos carotenoides para *Rh. mucilaginoso* sp.
- Respecto a la cantidad de compuestos fenólicos hallada en los medios más concentrados de alperujo (AA y EA 20 % y 30 %), son superiores al nivel de compuestos fenólicos reportado como límite de tolerancia, para el desarrollo de

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

levaduras del género *Rhodotorula*. Sin embargo, estos medios presentan una gran concentración de azúcares simples y complejos que constituyen una fuente de carbono esencial para el desarrollo de levaduras productoras de carotenoides.

- Las concentraciones de proteínas halladas en AA y EAs, podrían ser utilizadas como fuente de nitrógeno, disponible para la levadura.
- *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 es capaz de utilizar para su crecimiento los azúcares y fuentes de nitrógeno presentes en los medios derivados del alperujo.
- Los EAs y AA, serían medios aptos para el desarrollo y la producción de carotenoides para la cepa estudiada; ya que, la síntesis de estos pigmentos en el género *Rhodotorula*, se ve favorecida cuando existe una relación alta C/N, en el medio de cultivo (Elfeky, 2019).
- La técnica de desfenolización utilizada (partición líquido-líquido) reduce un 45 % de los compuestos fenólicos presentes en los EAs (10% y 30%) y en un 30 % en AA. Lo cual, permite, por un lado, generar medios líquidos más apropiados para el desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638; y, por otro lado, la recuperación de los biofenoles extraídos, que presentan alto valor económico.
- Las fuentes de C y N no fueron modificadas por el procedimiento de extracción de compuestos fenólicos, por lo tanto, estarían disponibles para la levadura.
- En los medios que fueron desfenolizados, se produjo una disminución en los valores de pH. Éstos se hallaron por debajo del rango óptimo para las levaduras del género *Rhodotorula*, según Cheng et al., (2016) y Dias-Rodrigues,(2019). Sin embargo, el pH fue fácilmente ajustado a valores similares a los de los medios no desfenolizados (5) para garantizar la viabilidad de la levadura.

#### 1.4. Bibliografía

- Aguirre, M., Ottogali, J.M., et al. "Evaluation of Cation and Anion Leaching in a Soil after Treatment with alperujo." *Acta Horticulturae.*, no. 1057 (2014): 321–328.
- Aguirre, M.E., Elisei, V.R., Comegna, M.A., et al. «Reutilización de los subproductos de la industria olivarera.» *AgroUNS (EdiUNS)*, nº 13 (2010): 16-19.
- Aksu, Z., & Eren, A.T. "Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*." *Biochemical Engineering Journal.* 35 (2007): 107–113.
- Alburquerque, J.A., Gonzalez, J., et al. "Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction." *Bioresource Technology*, no. 91 (2004): 195–200.
- Allouche, N., Fki, I., et al. «Toward a High Yield Recovery of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters.» *J. Agric. Food Chem.*, nº 52 (2004): 267-273.
- Andreozzi, R., Canterino, M., et al. "Effect of combined physico-chemical processes on the phytotoxicity of olive mill wastewaters." *Water Research*, 2008: 1684 – 1692.
- Arevalo-Chávez, S.M. «Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* (CPA-1).» *Tesis Doctoral*. Vol. 1. Lérida, Cataluña: Universitat de Lleida, Noviembre de 1998. 94.
- Artajo, L.S., Romero, M.P., et al. «Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process.» *Eur Food Res Technol.*, nº 225 (2007): 617-625.
- Barnett, J.A. "The Catabolism of Acyclic Polyols by Yeasts." *J. gen. Microbiol.*, no. 52 (1968): 131-159.
- Bendini, A., Cerretani, L., et al. "Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade." *Molecules.*, no. 12 (2007): 1679-1719.
- Ben-Sassi A., Boularbah A., et al. "A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco." *Process Biochemistry*, no. 41 (2006): 74-78.
- Ben-Sassi, A., Ouazzani, N., et al. "Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast isolated." *Biodegradation.* 19 (2008): 337-346.
- Borja, R., Raposo, F., et al. "Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills." *Grasas y Aceites.* 1, no. 57 (2006): 32-46.
- Borroni, M.V., González, M.T., et al. "Bioproduction of carotenoid compounds using two-phase olive mill." *Process Biochemistry* 54 (2017): 128–134.
- Bucciantini, M., Leri, M., et al. "Olive Polyphenols: Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties." *Antioxidants* , no. 10 (2021): 82-178.
- Buzzini, P., & Martini, A. "Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin." *Bioresource Technology* 71 (1999): 41-44.

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

- Castro, A., Asencio, E., et al. "Production of 4-ethylphenol in alperujo by *Lactobacillus pentosus*." *J. Sci. Food Agric.*, 2015: 30-95.
- Ceci, L.N., Pezzuti, A., et al. «Aceites de oliva vírgenes producidos en la Costa Atlántica Argentina. Calidad Química y Sensorial.» *A&G 2*, nº 115 (2019): 294-302.
- Çelik, G., Saygin, O., et al. "Multistage recovery process of phenolic antioxidants with a focus on hydroxytyrosol." *Separation and Purification Technology.*, 2020.
- Chang, R. *Química*. IV vols. Mexico, D.F: McGraw-Hill, 1999.
- Cheng, Y., & Yang, C. "Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 61 (2016): 270–275.
- Cirillo, V.P. "Sugar transport in microorganisms. ." *Annu. Rev. Microbiol.*, no. 15 (1961): 197-218.
- Código Alimentario Argentino. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>. 18 de 07 de 1969. Ley 18284/1969 (último acceso: 21 de 09 de 2020).
- Collado-González, J. «Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas.» Máster en Ingeniería Ambiental y de Procesos Químicos y Biotecnológicos., Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Politécnica de Cartagena., Cartagena., 2011, 151.
- Daâssi, D., Belbahri, L., et al. "Enhanced reduction of phenol content and toxicity in olive mill wastewaters by a newly isolated strain of *Corioliopsis gallica*." *Environ Sci Pollut Res*. 21 (2014): 1746–1758.
- D'Annibale, A., Sermanni, G.G., et al. "Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production." *Bioresource technology* 97, no. 15 (2006): 1828-1833.
- Dauber, C., Carreras, T., et al. "Response surface methodology for the optimization of biophenols recovery from "alperujo" using supercritical fluid extraction. Comparison between Arbequina and Coratina cultivars." *The journal of supercritical fluids.*, no. 180 (2022): 105460.
- Davoli, P., Mierau, V., et al. "Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus*." *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, no. 4 (2004): 392–397.
- De Marco, E., Savarese, M., et al. «Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters.» *Food Chemistry (Analytical, Nutritional and Clinical Methods).*, nº 104 (2007): 858-867.
- Dermeche, S., Nadour, M., et al. "Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization." *Process Biochemistry* 48 (2013): 1532–1552.
- Dias-Rodrigues, T.V., Amore, T.D., et al. "Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts." *Food Technology & Biotechnology* 3, no. 57 (2019): 388-398.
- Efkey, N., Elmahmoudy, M., et al. "Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* with a Combined Cultivation Mode of Nitrogen, Sulfur, and Aluminium Stress." *Applied sciences*, no. 9 (2019): 2-19.



## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

- Fangueiro, D., Lopez-Piñeiro, A., et al. "Single and combined application of two-phase olive mill waste and dairy cattle slurry to soil: Short-term effects on N and C dynamics." *Soil Science and Plant Nutrition.*, 2014: 1-10.
- Fazari, G. *International olive council (IOC) /OLIVE NEWS.* 08 17, 2020. <https://www.scoop.it/topic/olive-news> (accessed 08 19, 2020).
- Federici, E., Pepi, M., et al. «Two-phase olive mill waste composting: Community dynamics and functional.» *Bioresource Technology* 102 (2011): 10965–10972.
- Fernandez-Bolaños, J., Rodríguez, G., et al. «Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid–solid waste of the two-phase olive oil processing or ‘alperujo’.» *J Agric Food Chem*, nº 50 (2002): 6804–681.
- Fernandez-Bolaños, J., Rodríguez, G., Gomez, E., et al. "Total Recovery of the Waste of Two-Phase Olive Oil Processing: Isolation of Added-Value Compounds." *J. Agric. Food Chem.* 52, no. 19 (2004): 5849-5855.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G., et al. "Production, recovery and purification of antioxidant and interesting compounds from olive." *EJEAFChe.* 7, no. 8 (2008): 3237-3242.
- Fernández-Prior, M.A., Fatuarte, J.C.P., et al. "New liquid source of antioxidant phenolic compounds in the olive oil industry: Alperujo water ." *Foods* 9, no. 7 (2020): 962.
- Ferrao, M., & Garg, S. "Studies on effect of media components on growth and carotene production by *Rhodotorula graminis* RC-04." *Journal of cell and Tissue Research* 11, no. 1 (2011): 2551-2556.
- Frengova, G.I., & Beshkova, D.M. "Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, 2008: 1-43.
- Galanakis, C.M., Tsatalas, P., et al. "Control of microbial growth in bakery products fortified with polyphenols recovered from olive mill wastewater." *Environmental technology & innovation.*, no. 10 (2018): 1-15.
- Gatti, M.G. & González, L.A. *Caracterización de suelos del partido de Coronel Dorrego. Comparación de dos perfiles bajo un mismo cultivo y manejo.* Tesina de Grado: Técnico superior de suelos y agua., Departamento de Agronomía., UNS, Bahía Blanca.: EdiUNS, 2009, 87.
- Gonçalves, Cr., Lopes, M., et al. "Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts." *Bioresource Technology.*, no. 100 (2009): 3759-3763.
- González-Benjumea, A. «Síntesis química y enzimática de biofenoles lipofílicos del olivo con actividad antiinflamatoria. Optimización de la reacción de Krapcho.» Tesis Doctoral, Departamento de Química orgánica., Universidad de Sevilla., Sevilla, 2017.
- Gunsalus, I.C., Horecker, B.L., et al. "Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms." *Bacteriological reviews.* 2, no. 19 (1955): 79.
- Hendriks, A.T., & Zeeman, G. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology*, no. 100 (2009): 10–18.

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

- Hussein, M.S., Abdelhafez, A.A., et al. "Optimization of b-Carotene Production from *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 Growing on Agro-industrial Substrate Using Plackett–Burman Design." *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 4, no. 88 (2018): 1637-1646.
- IOC, International Olive Council. <https://www.internationaloliveoil.org/olive-world/olive-oil-health/#antioxidant> (último acceso: 11 de 03 de 2021).
- IOC. "The local olive growing industry in Argentina: development, prospects and potential." *OLIVAE 116* (COI), no. 116 (2011): 1-8.
- Janda, S. "Uptake of Disaccharides by the Aerobic Yeast *Rhodotorula glutinis*." *Arch. Microbiol.* (Springer-Verlag), no. 101 (1974): 273-280.
- Janda, S., & Kotik, A. "Some Features of Carbohydrate Metabolism in *Rhodotorula glutinis*." *Folia Microbiol.* 17 (1972): 461-470.
- Jarboui, R., Baatia, H., et al. "Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginosa*." *Environmental Technology.* 33, no. 8 (2012): 951–960.
- Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutierrez, G., et al. "New Hydrothermal Treatment of Alperujo Enhances the Content Bioactive Minor Components in Crude Pomace Olive Oil." *J. Agric. Food Chem.*, no. 59 (2011): 1115–1123.
- Lama-Muñoz, A., Rubio-Senent, F., et al. "The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization." *Innovative Food Science and Emerging Technologies.*, 2019: 11-17.
- Latha, B.V., Jeevaratnam, K., et al. "Influence of growth factors on carotenoid pigment of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source." *Indian Journal of Biotechnology.* 4 (julio 2005): 353-357.
- Laurent, G.C., Suñer, L., et al. «Adición al suelo de Residuos de la Industria Olivícola.» *III Jornadas Nacionales de Suelos de Ambientes semiáridos y II Taller Nacional de Cartografía Digital.* Sta. Rosa, La pampa.: INTA Ediciones, 2015. 130-134.
- Lawther, J.M., Sun, R., et al. "Effect of Steam Treatment on the Chemical Composition of Wheat Straw." *Holzforschung* 50, no. 4 (1996): 365-371.
- Lee, C.Y., Shallenberger, R.S., et al. «Free sugars in fruits and vegetables.» *Food Sciences. Food Science and Technology.*, nº 1 (Agosto 1970): 1-12.
- Leouifoudi, I., Zyad, A., et al. "Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater." *Food Science and Technology.* 2, no. 34 (2014): 249-257.
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., et al. «Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems.» *Food Chemistry. (Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section).*, nº 75 (2001): 501-507.
- Libkind, D., & van Broock, M. "Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeast." *World Journal of Microbiology & Biotechnology.*, 2006: 687-692.
- Libkind, D., Brizzio, S., et al. «*Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake.» *Folia Microbiol.* 1, nº 49 (2004): 19-25.

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

- Liboa, M.G., Guerin, M.E., et al. «Influencia de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de origen lácteo, en el crecimiento de *Rhodotorula sp.*» *5a Jornadas de Ciencia y Tecnología, (CyTAL 2012) -FRVM-UTN*. Villa María- Córdoba-Argentina.: edutecne, 2012. 1-6.
- Maass, D., Moya-Ramírez, I., et al. "Two-phase olive mill waste (alpeorujo) as Carbon Source for biosurfactant production." *J.Chem. technol.Biotechnol.*, no. 91 (2016): 1990-1997.
- Marova, E., Breierova, E., et al. "Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeast." *Annals of Microbiology 1*, no. 54 (2004): 73-85.
- Marova, M., Carnecka, A., et al. «Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production.» *Journal of Environmental Management* 95 (2012): 338-342.
- Marques, L.G., & Freire, J.T. "Analysis of Freeze-Drying of Tropical fruits." *Drying Technology*. 23 (2005): 2169–2184.
- Martínez, J.M. *Eficiencia de uso y balance de nitrógeno en sistemas con trigo del sur bonaerense: dinámica en el suelo y nutrición de cultivo*. Tesis doctoral, Departamento de agronomía, UNS, Bahia Blanca: EdiUns, 2015, 209.
- Martínez, J.M., Galantini, J.A., et. al. "Tillage effects on labile pools of soil organic nitrogen in a semi-humid climate of Argentina: A long-term field study." *Soil & Tillage Research*. (Elsevier), no. 169 (2017): 71–80.
- McKee, T., & McKee, J.R. *Biochemistry: The molecular basis of life 5e*. Translated by 2009 by Oxford University Press Copyright © 2013. México, D. F.: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2008.
- McNamara, J.Ch., Anastasiou, Ch., et al. "Bioremediation of olive mill wastewater." *International Biodeterioration & Biodegradation.*, no. 61 (2008): 127-134.
- Mechri, B., Chehebb, H., et al. "Effects of agronomic application of olive mill wastewater in a field of olive trees on carbohydrate profiles, chlorophyll a fluorescence and mineral nutrient content." *Environmental and Experimental Botany*, no. 71 (2011): 184-191.
- Mehmood, A., Usman, M., et al. "A review on management of cardiovascular diseases by olive polyphenols." *Food Sci Nutr.*, no. 8 (2020): 4639–4655.
- Melo, M.M., Dos Reis, K.C., et al. " Bio-hydrolysis of used soybean oil: environmental-friendly technology using microbial consortium." *Biodegradation*. 5, no. 32 (2021): 551-562.
- Messenguy, F. André, B., et al. "Diversity of Nitrogen Metabolism Among Yeast Species: Regulatory and Evolutionary aspects." Chap. 7 in *The Yeast handbook. Biodiversity and ecophysiology of yeast.*, by Carlos Rosa & Gábor Péter, 578. Berlin: Springer, 2006.
- Moisés, J., Martínez, J.M., et al. «Caracterización de residuos biotrasformados y efectos de diferentes estrategias de aplicación.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo*. San Juan: Inta Ediciones, 2018. 145-148.
- Molí de la Vall , Major Almazara. *Acerca de nosotros: Molí de la Vall Major*. 20 de 08 de 2000. <https://www.molidelavallmajor.es/es/la-empresa> (último acceso: 27 de 10 de 2020).

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

- Molina-Alcaide, E. & Yañez-Ruiz, D.R. "Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review." *Animal Feed Science and Technology.*, no. 147 (2008): 247–264.
- Molina-Alcaide, E., Yañez-Ruiz, D., et al. "Chemical composition and nitrogen availability for goats and sheep of some olive by-products." *Small Ruminant Research.*, no. 49 (2003): 329–336.
- Monetta, P., & Ibañez, A. "Preliminary Results of Soil Biological and Chemical Properties after land spreading Alperujo in Intensively-Managed Olive Orchards in San Juan, Argentina." Edited by Vita Serman F. et al. *Acta Hort.*, 2014: 693-700.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sanchez, M., et al. "Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes." *Appl. Microbiol. Biotechnology.*, no. 85 (2009): 25-39.
- Mussio, D.F., Ceci, L.N., et al. «Biofenoles en las corrientes de procesamiento de aceite de oliva virgen.» Editado por et al. Cecilia Pencí. *V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC)*. Córdoba, Argentina., 2014. 129-135.
- Mussio, D., Ceci, L.N., et al. «Recuperación de Biofenoles de Alperujo con diferentes solventes.» *XVI CYTAL*. Mar del Plata, Argentina., 2017. 1-7.
- Ntougias, S., Bourtzis, K., et al. «The Microbiology of Olive Mill Wastes.» *BioMed Research International* 2013 (2013): 1-16.
- Obied, H.K., Allen, M.S., et al. "Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste." *J. Agric. Food Chem.* 53, no. 4 (2005): 823-837.
- Ouzounidou, G., Zervakis, G.I., et al. "Raw and Microbiologically Detoxified Olive Mill Waste and their Impact on Plant Growth." *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology.*, no. 4 (2010): 21-38.
- Pereira-Cipolatti, E., Diaz-Remedia, R., et al. "Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.*, no. 20 (2019): 101-208.
- Petrella, C., Di Certo, M.G., et al. "Mediterranean Diet, Brain and Muscle: Olive Polyphenols and Resveratrol Protection in Neurodegenerative and Neuromuscular Disorders ." *Current Medicinal Chemistry.* 28, no. 37 (2021): 7595-7613.
- Roca, M., Gallardo-Guerrero, L., et al. «Metabolismo de carotenoides en el fruto del olivo y sus modificaciones en el procesado industrial.» En *Carotenoides en agroalimentación y salud.*, de A.J. Meléndez-Martínez, 444-471. Sevilla: Editorial Terracota, SA., 2017.
- Rodríguez, L.A. Gil, R.M. & Vallejo, M.D. «Remoción de compuestos fenólicos de la fracción líquida del alperujo.» *II SIMPOSIO DE RESIDUOS AGROPECUARIOS Y AGROINDUSTRIALES DEL NOA Y CUYO*. San Juan, Argentina.: INTA Ediciones., 2018. 327-343.
- Rodríguez, M., Gil, R., Rodríguez, L., Vallejo, M., Cornejo, V., Gines, L., Rodríguez Gutiérrez, G., Monetta, P. «Recuperación de compuestos fenólicos de residuos olivícolas: selección de variables relevantes y optimización del proceso.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y agroindustriales del NOA y Cuyo*. San Juan., 2018. 200-204.

## Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo

- Rodríguez-Gutierrez, G., Rodríguez, R., et al. "Effect of Steam Treatment of Alperujo on the Composition, Enzymatic Saccharification, and in Vitro Digestibility of Alperujo." *J. Agric. Food Chem.*, no. 55 (2007): 136-142.
- Romero, C.N., Brenes, M., et al. "Hydroxytyrosol 4-B-D-Glucoside, an Important Phenolic Compound in Olive Fruits and Derived Products." *J. Agric. Food Chem.*, no. 50 (2002): 3835-3839.
- Romo-Sanchez, S., Alves-Baffi, M., et al. "Yeast biodiversity from oleic ecosystems: Study of their biotechnological properties." *Food Microbiology*. (Elsevier Ltd.), no. 7 (2010): 487-492.
- Rubio-Senent, F. *Recuperación de compuestos bioactivos a partir de subproductos del aceite de oliva*. Tesis Doctoral, Departamento de Nutrición y Bromatología., Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla., Sevilla: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de la Grasa, España., 2011, 358.
- Sampaio, J.P. "Rhodotorula Harrison (1928)." Chap. 155 in *The Yeasts*, by Fell J.K. & Boekhout, T. Cletus P. Kurtzman, 1873-1927. New York, New York: Elsevier Science, 2010.
- Sánchez-Sánchez, C., González-González, A., et al. "Two-phase Olive mill waste: A circular economy solution to an imminent problem in Southern Europe." *Journal of Cleaner Production*, no. 274 (2020): 1-10.
- Santos, V.L., & Linardi, V.R. "Phenol degradation by yeasts isolated from industrial effluents." *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47 (2001): 213-221.
- Sayadi, S., Allouche, N., et al. "Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment." *Process Biochemistry.*, no. 35 (2000): 725-735.
- Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., et al. "Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents." *Energy*, no. 61 (2013): 34-43.
- Singh, R.P., & Heldman, D. *Introduction to food engineering 5th edition*. Vol. Cap. 12. 15 vols. New York, New York: Academic Press., 2014.
- Soberón L.F, Carelli A.A, et al. "Method for phenol recovery from "alperujo": numerical optimization." *European Food Research and Technology.*, 2019: 1-10.
- Spencer-Martins, I. "Transport of sugar in yeast: implications in the fermentation of lignocellulosic materials. ." *Bioresource Technology.*, no. 50 (1994): 51-57.
- Suarez, M., Romero, M.P., et al. "Development of a Phenol-Enriched Olive Oil with Phenolic Compounds from Olive Cake." *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010): 10396–10403.
- Takaç, S., & Karakaya, A. "Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater." *Recent Patents on Chemical Engineering.* 2, no. 3 (2009): 230-237.
- Usaquen-Alvarado, S.M. «Aprovechamiento y valorización del alperujo tratado térmicamente como: fertilizante biológico y fuente de Hidroxitirosoles.» *Tesis de grado para optar por el título de Microbiólogo Industrial*. Granada, Granada: Pontificia Universidad Javeriana, 10 de Enero de 2008.

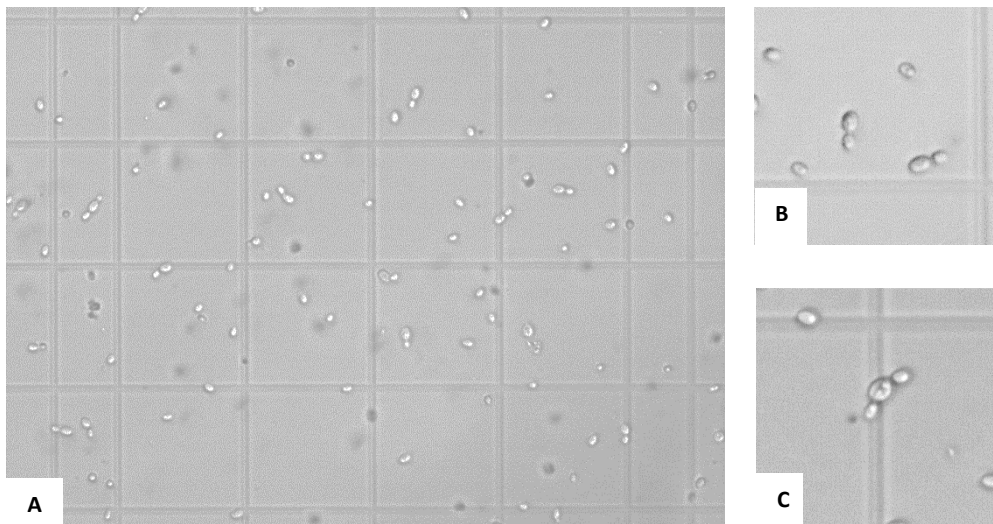
**Capítulo 1. Caracterización de medios de cultivo derivados del Alperujo**

- Valiente, C., Arigoni, E., et al. «Composición de la fibra alimentaria en el orujo de la aceituna. Aminoácidos asociados a la fibra insoluble, soluble y total.» *Grasas y Aceites* 46, nº 2 (1995): 98-102.
- Visioli, F., Poli, A., et al. "Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil." *Medicinal Research Reviews* 22, no. 1 (2002): 65-75.
- Voaides, C., & Dima, R. "The effect of nitrogen source on carotenoids production by *Rhodotorula* sp." *Romanian Biotechnological Letters*. 17, no. 5 (2012): 7570-7575.
- Wickerham, L.J & Burton, K.A. "Carbon assimilation test for the classification of yeast." *J Bacteriol.* 56, no. 3 (1948): 363–371.
- Wickerham, L.J. "A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts." *J Bacteriol.* 52, no. 3 (1946): 293–301.
- Yamashita, C., Chung, M.S., et al. "Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp.) by-product extract by freeze-drying." *Food Science and Technology* 84 (2017): 256-262.

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC  
638: desarrollo y producción de  
pigmentos carotenoides sobre  
medios de cultivos derivados del  
alperujo.

## 2.1. Introducción

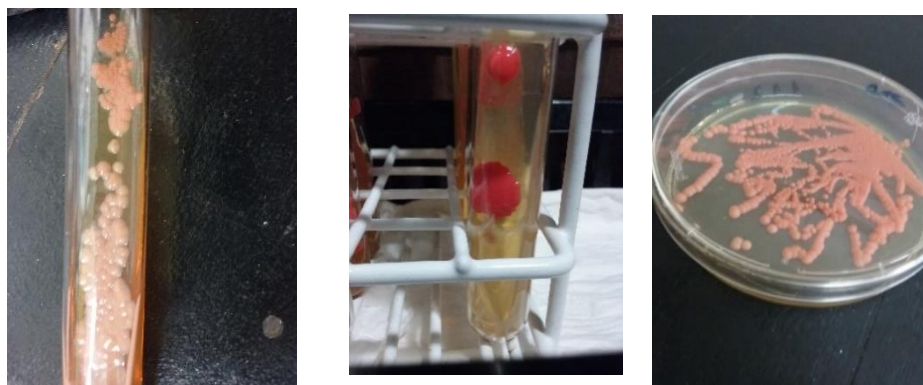
Las levaduras son hongos unicelulares y pueden pertenecer a dos Clases taxonómicas: Ascomycetes o Basidiomycetes (Walker,1998). En particular las levaduras del género *Rhodotorula* son aerobias estrictas, ubicuas, heterótrofas y no fermentativas (Tang et al., 2019; Moliné et al., 2012; Moore et al., 1989). Las células individuales son elipsoides y presentan un diámetro de entre 3 a 5  $\mu\text{m}$  (Sampaio, 2010) (Fig. 2.1 A). Su reproducción asexual se lleva a cabo por brotación polar o multilateral (Sampaio, 2010; Tang et al., 2019), (Fig. 2.1 B y C).



**Fig.2.1. A)** Imagen tomada de campo completo en cámara Neubauer, dónde se observan células de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638. **B)** Reproducción asexual (gemación) por brotación polar de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638. **C)** Reproducción asexual por brotación multilateral. Todas las imágenes fueron tomadas a través de un microscopio óptico invertido (Zeiss Primo Star), con objetivo de 40X.

Por otra parte, *Rh. mucilaginoso spp.* presenta colonias de color que varían del rosado al coral (Roadjanakamolson y Suntornsuk, 2010) y exhiben aspecto mucoso (Hernández-Almanza et al.,2014; Sampaio, 2010 ; Tang et al., 2019), como se puede observar en la Fig. 2.2.





**Fig. 2.2.** Colonias de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 desarrolladas en medio peptonado y agar, dónde se observa su aspecto mucoso y el color que varía del rosado al coral.

Además, varias especies de este género como, *Rh. glutinis*, *Rh. rubra*, *Rh. minuta* y *Rh. mucilaginosa*, tienen la capacidad de producir cantidades significativas de pigmentos carotenoides y triglicéridos, (Sampaio, 2010; Tang et al., 2019; Bhosale et al., 2004; Moore et al., 1989; Berman et al., 2014; Davoli et al., 2004; Pereira- Cipolatti et al., 2019; Poontaweea et al., 2017; Mares, 1982; Alvarez et al., 1992). Entre los carotenoides, los que usualmente sintetizan son:  $\beta$ -caroteno, toruleno y torularodina (Moliné et al., 2012; Aksu y Tugba, 2005; Buzzini et al., 2007; Maldonade et al., 2007; Zoz et al., 2015; Malisorn y Suntornsuk, 2008; Libkind et al., 2004; Yoo et al., 2016; Ghilardi et al., 2020).

Como se desarrolló en el Capítulo Introducción general, estos compuestos son de interés para las industrias farmacéutica, alimentaria, química y cosmética por su coloración (Fig. 2.3) y capacidad antioxidante (Berman et al., 2014; Sampaio, 2010; Davoli et al., 2004; Pereira-Cipolatti et al., 2019; Poontaweea et al., 2017; Mares, 1982; Tang et al., 2019; Alvarez et al., 1992).



**Fig. 2.3.** Extractos de pigmentos carotenoides, dónde se observa su gama de color, desde el amarillo al anaranjado/rojizo. (Latam News Media LLC, 2014)

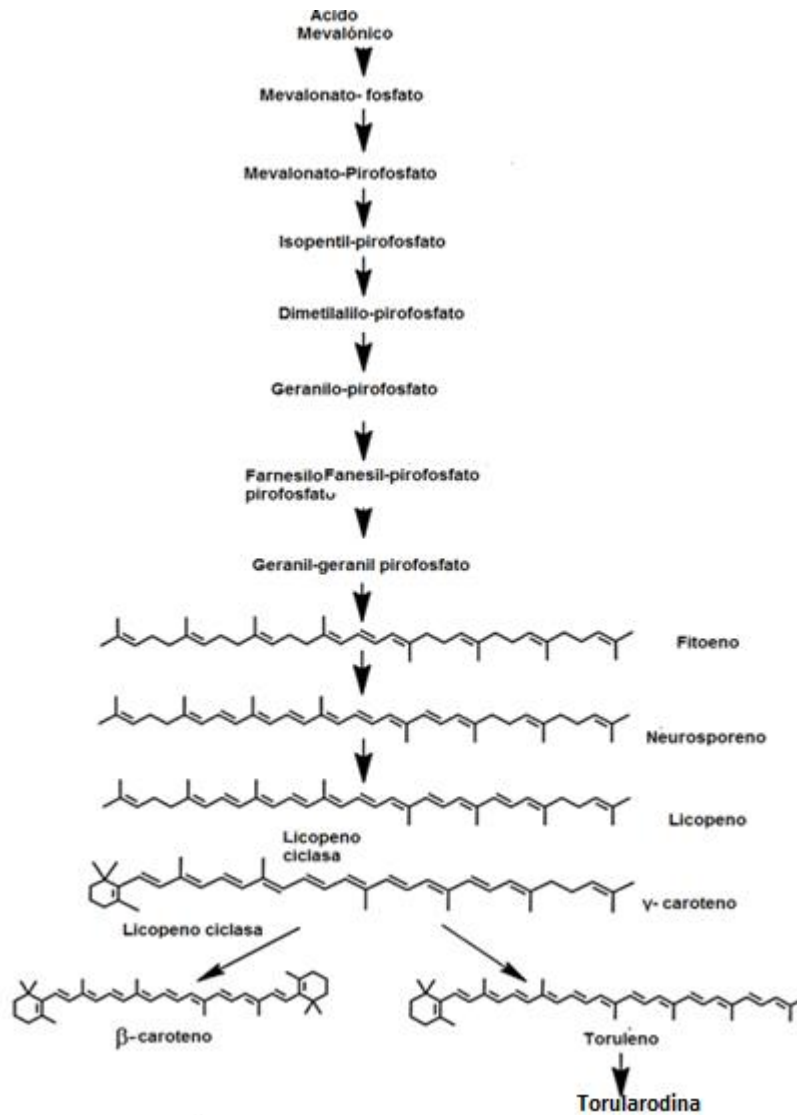
En las levaduras, la función más importante que presentan los pigmentos carotenoides es la protección contra la radiación UV y radicales libres. Estos últimos, son producidos durante el metabolismo celular normal (Hernández-Almanza et al., 2014). Los pigmentos carotenoides desactivan estas moléculas cargadas mediante un proceso en el que la energía se transfiere desde los niveles altos hacia los basales, liberando calor (Bhosale, 2004).

La ruta biosintética de carotenoides que se conoce, es similar entre diferentes organismos carotenogénicos (Bhosale, 2004; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2017; Sun et al., 2018). En el caso particular de las levaduras del género *Rhodotorula*, Buzzini et al. (2007) indicaron que, las especies *Rh. minuta*, *Rh. glutinis*, *Rh. graminis* y *Rh. mucilaginosa* poseen perfiles de carotenoides análogos. Siendo  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, toruleno y torularodina, los principales carotenoides sintetizados por estas especies. Por lo que, estos resultados permitieron concluir que el género *Rhodotorula* posee una ruta biosintética de carotenoides idéntica o conservada (Tang et al., 2019; Kot et al., 2018; Hernandez-Almanza et al., 2014).

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

De esta manera, en esta vía, se reconocen tres pasos generales: el primero, lo constituye la conversión metabólica de Acetil-CoA a 3-hidroximetil-3-glutaril-CoA (HMG-CoA), (Frengova y Belskova, 2008; Hernandez-Almanza et al., 2014). Esta reacción es catalizada por la enzima HMG-CoA sintasa. Luego, (HMG-CoA) es convertido a ácido mevalónico (MVA), que es un compuesto de C<sub>6</sub> (Fig. 2.4). Este compuesto es el que da comienzo a la ruta biosintética de carotenoides en levaduras rojas. Luego, (MVA) es convertido a Isopentil pirofosfato (IPP), mediante una serie de reacciones que incluyen fosforilaciones (Fig. 2.4). Las cuales, son llevadas a cabo por enzimas denominadas MVA-quinasas; a las que les siguen reacciones de descarboxilación (Frengova y Belskova, 2008; Hernandez-Almanza et al., 2014).

El segundo paso, ocurre cuando (IPP) es isomerizado a dimetilalil-pirofosfato (DMAPP), con la subsiguiente adición de tres moléculas de (IPP), (Fig. 2.4). Estas reacciones son catalizadas por las enzimas prenil-transferasas, para producir un compuesto de C<sub>20</sub> denominado: geranil-geranil pirofosfato (GGPP) (Fig. 2.4). A continuación, se lleva a cabo la condensación de dos moléculas de este compuesto, dando lugar al Fitoeno (Fig. 2.4). Este, es el primer caroteno que se genera en la biosíntesis y tiene como característica particular, ser incoloro. Posteriormente, sufre reacciones de desaturación las cuales llevan a la formación del licopeno (Fig. 2.4), (Frengova y Belskova, 2008; Hernandez-Almanza et al., 2014).



**Fig. 2.4.** Vía carotenogénica en *Rhodotorula* spp., desde el ácido mevalónico hasta β-caroteno y torularodina. Diagrama adaptado de (Hernandez-Almanza, et al. 2014).

El tercer paso en la biosíntesis, tiene que ver con las reacciones de ciclación que sufre el licopeno (mediadas por las enzimas licopeno-ciclasas), dando como resultado: γ-caroteno. Posteriormente, éste atraviesa otras series de ciclaciones, que dan lugar a dos carotenos diferentes: β-caroteno y toruleno; bifurcándose de esta manera, la ruta biosintética (Fig. 2.4). Finalmente, reacciones de hidroxilación y oxidación del toruleno, conducen a la formación de torularodina (Fig. 2.4), (Fregova y Belskova, 2008).

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

Si bien la tecnología para la bioproducción de carotenoides está siendo desarrollada en la actualidad, uno de los mayores obstáculos es el alto costo que presentan los sustratos empleados, ya que encarecen al proceso de obtención (Cheng et al., 2016). No obstante, una solución a este inconveniente es el uso de residuos agroindustriales seguros, como fuente de carbono (a saber: bagazo de cebada, salvado de arroz, orujo de uva, alperujo, etc.), (Ghilardi et al., 2020; Borroni et al., 2017; Panesar et al., 2015; Hernandez-Almanza et al., 2014; Schneider et al., 2013; Roadjanakamolson y Suntornsuk, 2010; Frengova y Beshkova, 2008; Malisorn y Suntornsuk, 2008; Libkind et al., 2006; Bhosale y Gadre, 2001; Buzzini, 1999. De esta manera, la producción microbiana de carotenoides sería económicamente viable (Borroni, 2017; Hernandez-Almanza et al., 2014; Schneider et al., 2013; Marova et al., 2012).

Diferentes trabajos sobre el desarrollo de *Rh. mucilaginosa* en residuos agroindustriales y la correspondiente biosíntesis de sus pigmentos, muestran que es una estrategia aplicable con resultados positivos (Dias-Rodrigues et al., 2019; Pereira-Cipolatti et al., 2019; Cheng y Yang, 2016; Yoo et al., 2016; Hernandez-Almanza et al., 2014; Frengova y Beshkova, 2008; Marova, 2012; Jarboui et al., 2012; Libkind et al., 2006; Aksu y Tugba, 2005). De esta manera, en el Capítulo 1 mostramos qué medios derivados del alperujo tienen una composición química que permitiría el desarrollo y la producción de carotenos por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 (Borroni et al., 2017; Ntougias et al., 2013; Ouzounidou et al., 2010). Del mismo modo, en el presente Capítulo se expondrá la aptitud de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 para crecer sobre estos medios y producir pigmentos carotenoides.

### Objetivo General

Evaluar la producción de pigmentos carotenoides, por la levadura *Rhodotorula mucilaginoso* LPSC 638 utilizando como sustrato medios líquidos derivados del alperujo.

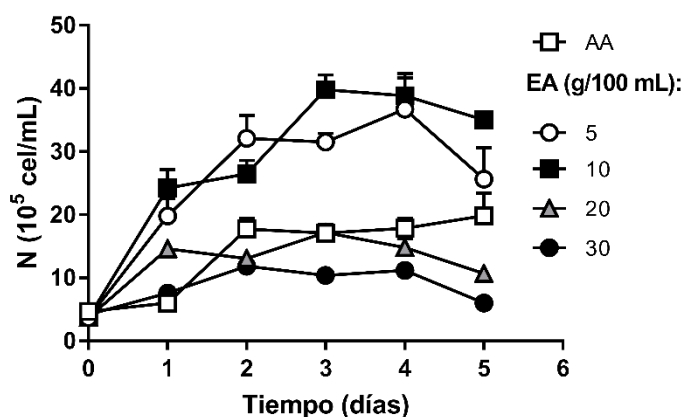
### Objetivos específicos

- Evaluar el desarrollo de *Rhodotorula mucilaginoso* LPSC 638 sobre extractos acuosos de alperujo (EAs al 5%, 10% 20% y 30% p/V) y agua de alperujo (AA).
- Analizar el consumo de nutrientes por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en los distintos medios.
- Analizar y evaluar la producción cuantitativa y cualitativa de pigmentos carotenoides sintetizados por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, cuando se desarrolla en EAs al 5%, 10% 20% y 30% (p/V) y agua de alperujo (AA).

## 2.2. Resultados y discusión

### 2.2.1. Caracterización del crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en EAs y AA con concentración natural de biofenoles.

Como se puede observar en la Fig. 2.5, *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638 puede crecer en AA y en todas las concentraciones de EAs analizadas.



**Fig. 2.5.** Desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 (n° de células/ mL) halladas en las diferentes concentraciones de los Extractos Acuósos (EAs) y en el Agua de alperujo (AA), durante el tiempo (días) de duración del ensayo. Los datos se muestran como la media y S.D. (n = 4).

Como se mencionó en el capítulo anterior, las características fisicoquímicas de estos medios, como el pH ligeramente ácido (5-6), los azúcares presentes y las proteínas disponibles, permitirían el desarrollo de esta levadura y la producción de carotenoides asociada a la misma. La fase de adaptación (Lag) de crecimiento, es notoria solamente en el EA 30% y en AA. A concentraciones más bajas del EA, es probable que el tiempo de muestreo utilizado (1 muestra/día), no nos permitió detectar esta etapa. Por otro lado, tanto para AA como para todas las concentraciones de EAs analizadas se observó una disminución en la viabilidad de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 hacia el final del experimento (día 5). Por lo cual, los siguientes experimentos que se llevaron a cabo, tuvieron una duración de 4 días.

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

Por otro lado, el tiempo para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, aumentó a medida que lo hizo la concentración de los EAs. Siendo de 1 día en los EAs de 5% y 10% y de 2 días, en los EA de 20%, 30% y AA (Fig. 2.5). A causa de este hecho, como se puede observar en la Fig. 2.6, la tasa máxima de crecimiento específico fue notablemente más alta en los EA de 5% y 10%, en comparación a los de mayor concentración de alperujo (AA y los EAs de 20% y 30%). En ellos se observa que la levadura ralentiza su crecimiento.

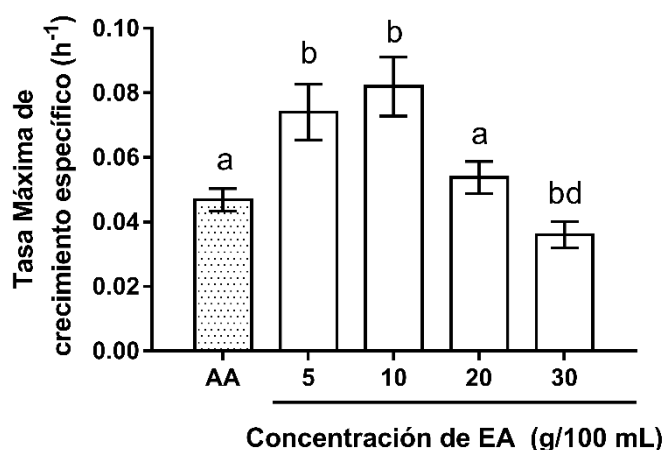
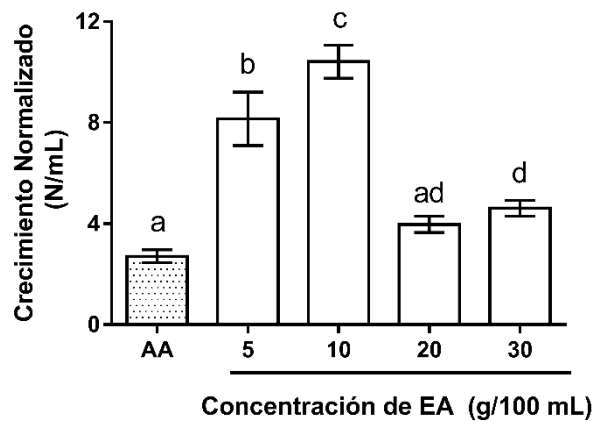


Fig. 2.6. Tasa máxima de crecimiento de la levadura, hallada en agua de alperujo (AA) y en los diferentes Extractos Acuáticos (EAs). Los datos se muestran con media y S.D. (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,01).

Sin embargo, como se puede notar en la Fig. 2.7, el número de células producidas es máximo solamente en el EA de 10%, disminuyendo tanto a concentraciones más bajas (EA 5%) como a concentraciones más elevadas (EAs 20%, 30% y AA). Este hecho podría explicarse ya que, en el EA 5%, al ser el medio con menor concentración de alperujo la cantidad de nutrientes disponibles puede limitar el crecimiento de la levadura; mientras que, en los medios más concentrados (EAs de 20%, 30% y AA), presentan una mayor proporción de compuestos antimicrobianos como, por ejemplo los compuestos fenólicos.

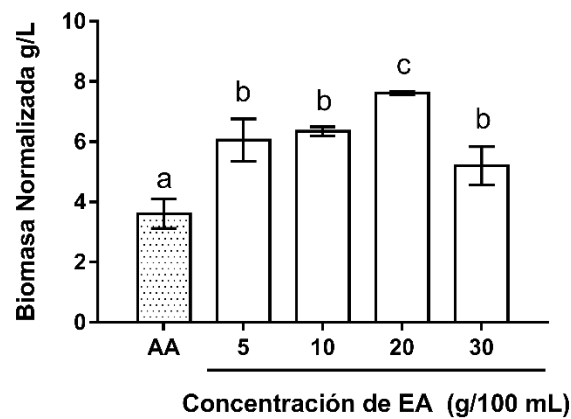




**Fig. 2.7.** Biomasa normalizada (Final/Inicial) obtenida a los 4 días de cultivo, medida como número de células (N/mL). Los datos se muestran con media y S.D. (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

En efecto, en estos medios de cultivo los niveles de biofenoles totales son superiores a los niveles de compuestos fenólicos reportado por Santos y Linardi (2001), como límite de tolerancia para el desarrollo de levaduras del género *Rhodotorula*. Es decir que, estos medios más concentrados, podrían influir negativamente en el desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Así mismo, sumados a los compuestos fenólicos, la presencia de ácidos grasos de cadena larga, también puede comprometer el desarrollo microbiano ya que, son compuestos orgánicos de difícil degradación para estos organismos (Morillo, 2007). Distintos autores como Morillo, (2007), Rodríguez et al. (1988) y González et al. (1994), documentan que la presencia conjunta en alperujo y alpechines de, compuestos fenólicos y ácidos grasos de cadena larga, pueden afectar el desarrollo de microorganismos asociados a estos residuos olivícolas.

Finalmente, como se observa en la Fig. 2.8 la biomasa medida como peso seco (g/L) presenta un valor máximo en EA 20%. Mientras que la biomasa medida como número de células (N/mL), (Fig. 2.7) muestra un mayor valor en EA 10%.

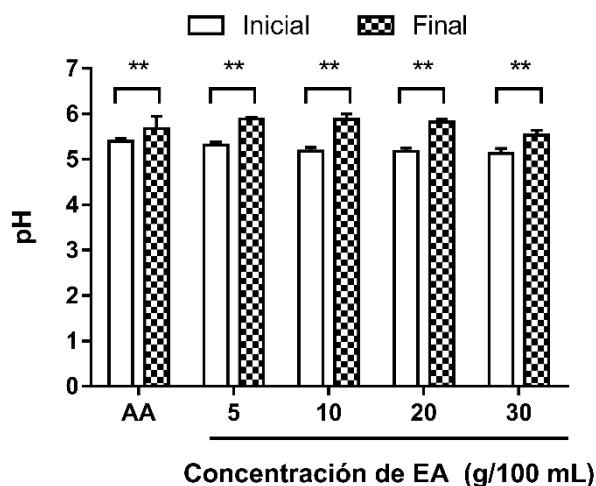


**Fig. 2.8.** Biomasa normalizada, medida como peso seco (g/L). Los datos se muestran como la media y S.D. (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Esto significaría que, en el EA 10%, la concentración de nutrientes disponibles favorecería la división celular en *Rh. mucilaginosa* (Libkind et al., 2006); mientras que, a mayor concentración del medio de cultivo, la acumulación de sustancias de reserva puede ser responsable del aumento del peso de la biomasa (Schneider et al., 2013 ; Efekey et al., 2019).

Las levaduras durante su desarrollo bajo condiciones desfavorables, producen diferentes clases de compuestos que incluyen, por un lado, sustancias de reserva como los triglicéridos (Qin et al., 2017; Schneider et al., 2013; Mares, 1982) y, por otro lado, compuestos antioxidantes como los carotenoides (Yoo et al., 2016; Marova et al., 2004; Mares, 1982). Como ya se mencionó en la Introducción, la carotenogénesis está involucrada en las respuestas al estrés (Mannazzu et al., 2015; Damiani, 2010).

Por otra parte, se caracterizaron los medios de cultivo luego del desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Se observó que el crecimiento de la levadura genera un aumento de los valores de pH en todos los medios analizados (Fig. 2.9).



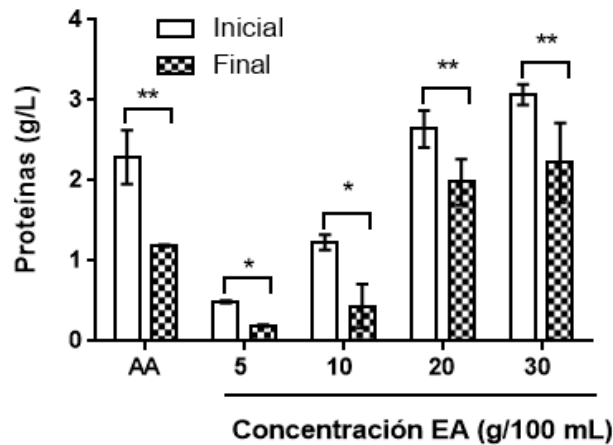
**Fig. 2.9.** Valores de pH antes (Inicial) y después (Final) del desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en los medios analizados., luego de 4 días de cultivo. Las barras representan la media y S.D. (n = 4), \*\* p < 0,001.

Este efecto es ligeramente mayor en los EAs de menor concentración de Alperujo. Las levaduras con metabolismo oxidativo como las del género *Rhodotorula*, pueden utilizar ácidos orgánicos como fuente de carbono, lo que resulta en la alcalinización del medio cultivo (Lopes et al., 2020; Lin et al., 2017). Además, la asimilación de fuentes de nitrógeno orgánicas, como las proteínas, con la consecuente desaminación de los aminoácidos, incrementan el pH (de Alvarado-Ortiz y Petrushina, 2021; Reyes-Alvarado, 2012; Arevalo-Chávez, 1998). Resultados similares se observaron con *Rh. glutinis* sp. cultivada en desechos de papa y en la cepa *Rh. mucilaginosa* FR822395, utilizada para tratar aguas residuales de almazara (Kot et al., 2018; Jarboui et al., 2012).

Con respecto a las proteínas, el contenido disminuye en todas las concentraciones de EAs y en AA, luego del desarrollo de la levadura (Fig. 2.10), lo que indicaría que *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 es capaz de utilizarlas como fuente de nitrógeno como se demostró en el Capítulo 1.

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

El consumo de proteínas es significativamente mayor (~ 65%) en EA 10%, respecto a los demás medios (Fig. 2.10). Probablemente, se deba a que, en este EA, *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 presenta la máxima tasa de crecimiento y, por lo tanto, una mayor cantidad de células producidas (Fig. 2.6 y 2.7).



**Fig. 2.10.** Comparación de la concentración de proteínas (g/L BSA) halladas antes (inicial) y después (final) del desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638., luego de 4 días de cultivo. Las barras muestran media y S.D. (n = 4), \* p < 0,01, \*\* p < 0,001.

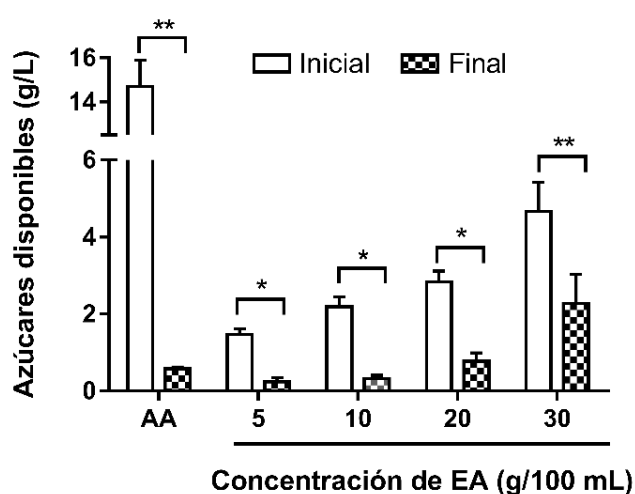
En los EAs de mayor concentración, sin embargo, se observó un menor consumo de proteínas. En el caso de los EAs de 20% y 30%, *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 solo consumió alrededor del 25% de las proteínas solubles, mientras que en AA el consumo fue de aproximadamente el 50%. En consecuencia, aunque hay proteínas en el medio de cultivo, la levadura experimenta una deficiencia en el consumo de las mismas.

Esta condición favorece a la síntesis de carotenoides como Elfeky et al., (2019) demostraron con la cepa *Rh. glutinis* AS2703 que fue cultivada en presencia de distintas fuentes de nitrógeno; encontrando que la acumulación de carotenoides se incrementaba significativamente, a mayor relación C/N. Por consiguiente, en los medios de cultivo de mayor concentración de alperujo, la incapacidad de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 para utilizar de manera eficiente las proteínas solubles como fuente de nitrógeno,

Capítulo 2: *Rh.mucilaginoso* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

puede limitar su crecimiento y cambiar su metabolismo para acumular el exceso de carbono en forma de sustancias de reserva y/o compuestos antioxidantes (carotenoides), (Elfeky, 2019; Qin et al., 2017; Schneider et al., 2013; Frengova y Beshkova, 2008).

Con respecto a los azúcares hallados después del crecimiento de la levadura, se observó una disminución significativa en la concentración de los mismos (Fig. 2.11).



**Fig. 2.11.** Comparación de la concentración de azúcares disponibles (g/L) hallados antes (Inicial) y después (Final) del desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638., luego de 4 días de cultivo. Las barras muestran la media y S.D. (n = 4), \* p < 0,01, \*\* p < 0,001.

Como se observa en la Fig. 2.11, el consumo de carbohidratos difiere según el medio de cultivo. La levadura consumió entre el 80 y 85% de azúcares, cuando se cultivó en los EAs de menor concentración. Así mismo, en AA se registró un consumo del 95% y en EA 20%, del 75%. Por el contrario, cuando *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 desarrolla en el EA 30%, casi la mitad de los azúcares disponibles permanecen en el medio (Fig. 2.11).

Cabe señalar que, los monosacáridos glucosa y fructosa fueron consumidos eficientemente por la levadura en todos los EAs analizados (Tabla 2.1). No obstante, solo se observó el consumo de estaquiosa cuando la cepa desarrolló en los EAs de 10% y 20%.

Mientras que el contenido de sacarosa y manitol no sufrió cambios de manera significativa en ningún EA.

AZÚCAR (mg/mL)	EA 5%		EA 10%		EA 20%	
	-Rh. <i>mucilaginosa</i>	+Rh. <i>mucilaginosa</i>	-Rh. <i>mucilaginosa</i>	+Rh. <i>mucilaginosa</i>	-Rh. <i>mucilaginosa</i>	+Rh. <i>mucilaginosa</i>
ESTAQUIOSA	0,162±0,002	0,130±0,06	0,258±0,006	0,12±0,01*	0,523±0,05	0,23±0,02*
SACAROSA	n.d	n.d	0,056±0,002	0,04±0,01	0,19±0,03	0,151±0,009
GLUCOSA	0,952±0,07	n.d*	1,59±0,05	0,038±0,012*	1,84±0,14	0,09±0,03*
FRUCTOSA	0,217±0,08	n.d*	0,31±0,03	0,035±0,007*	0,44±0,01	0,42±0,05
MANITOL	0,146±0,01	0,130±0,02	0,33±0,06	0,401±0,16	0,97±0,08	1,13±0,20

AZÚCAR (mg/mL)	EA 30%		AA	
	-Rh. <i>mucilaginosa</i>	+Rh. <i>mucilaginosa</i>	-Rh. <i>mucilaginosa</i>	+Rh. <i>mucilaginosa</i>
ESTAQUIOSA	1,23±0,05	1,12±0,28	3,45±1,25	0,75±0,05*
SACAROSA	0,816±0,002	0,778±0,003	1,64±0,90	0,12±0,01*
GLUCOSA	4,38±0,10	0,98±0,09*	12,4±1,07	0,27±0,03*
FRUCTOSA	1,07±0,01	0,083±0,23*	2,26±0,22	0,31±0,04*
MANITOL	1,99±0,01	2,38±0,18	5,28±1,11	0,32±0,13*

**Tabla 2.1.** Concentración de azúcares individuales presentes en los extractos acuosos (EAs) y agua de alperujo (AA), expresados en mg/mL antes (-Rh. *mucilaginosa*) y después (+ Rh. *mucilaginosa*) del crecimiento de la levadura. \* Indica diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,01$ . n = 3.

A medida que aumenta la concentración de estos medios, la levadura se vuelve más selectiva en el consumo de hidratos de carbono. Así, cuando se desarrolla en el EA de 30%, sólo consume glucosa y fructosa, quedando una gran cantidad de azúcares en este medio.

Los niveles altos de compuestos fenólicos que presenta el EA 30%, podrían actuar como inhibidores de ciertas enzimas involucradas en la metabolización de disacáridos y oligosacáridos, impidiendo su utilización. Muchos compuestos fenólicos naturales como los flavonoides y alcoholes fenólicos, pueden actuar como inhibidores de enzimas, con una concentración inhibitoria media máxima ( $IC_{50}$ ) de 0,6 mg/L (Lim et al., 2019; Rasouli et al., 2017). De esta manera, se demostró que los flavonoides y el hidroxitirosol provenientes del aceite de oliva, ejercen cierta inhibición sobre las  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -

glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa (Figueiredo-González et al., 2019; Hamden et al., 2010; Lim et al., 2019).

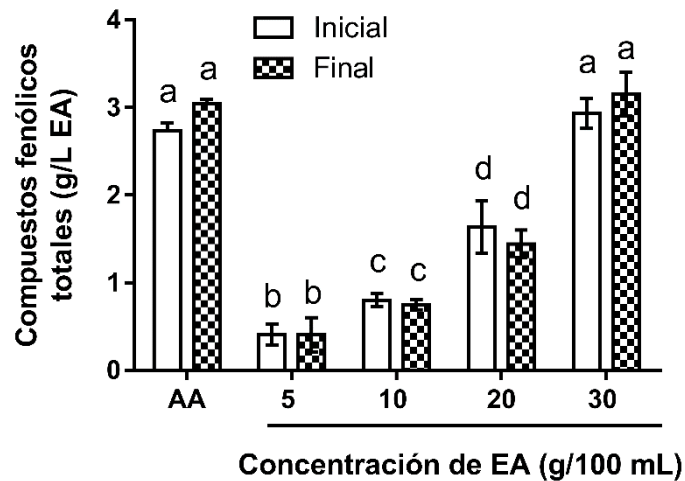
En particular, se probó que los extractos fenólicos obtenidos del aceite de oliva, inhiben la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* (Figueiredo-González et al., 2019). Asimismo, el hidroxitirosol, inhibe no solo a esta enzima intestinal, sino también a otras como las  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -amilasas, lactasas, maltasas y lipasas, en ratas diabéticas (Hamden et al., 2010). En otras palabras, la inhibición de estas enzimas retrasaría la absorción de los carbohidratos, monoglicéridos y ácidos grasos libres en el intestino, lo que conduciría a la moderación de los niveles de glucosa y lípidos en sangre (Hamden et al., 2010).

Por otra parte, Figueiredo-González et al. (2019), hallaron una elevada especificidad de interacción entre ciertos compuestos fenólicos como, tirosol, ácido hidroxibenzoico, apigenina y luteolina, con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Estos biofenoles serían los responsables de generar una notable inhibición sobre esta enzima intestinal, con un  $IC_{50}$  que varía entre 60 y 350 mg/L. Sin embargo, el efecto sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa es significativamente menor (Figueiredo-González et al., 2019).

Los compuestos fenólicos antes mencionados, junto con los secoiridoides y ácidos fenólicos, son los más importantes que se encuentran en el alperujo de la variedad Arbequina, utilizado en esta Tesis (Mussio et al., 2014). Además, como estos compuestos aromáticos son solubles en agua, se espera que estén presentes en todos los EAs (Araújo et al., 2015; Rubio-Senent et al., 2013). Como se mencionó anteriormente, (Cap.1 pág.73) el alperujo retiene alrededor del 98% de los compuestos fenólicos presentes en la aceituna (Soberón et al., 2019; Suarez et al., 2010).

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

En este trabajo encontramos concentraciones de compuestos fenólicos que oscilan entre 500 y 3000 mg/L, valores muy superiores a los que se requieren para la inhibición de enzimas involucradas en la metabolización de azúcares complejos. De esta manera, se podría explicar la falta de consumo de disacáridos y oligosacáridos observada en los EAs. No obstante, cuando *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 crece en AA, es capaz de metabolizar eficientemente todos los azúcares presentes en el medio, a pesar de la concentración alta de compuestos fenólicos que contiene. Esto podría deberse a las diferencias en el tipo de compuestos fenólicos presentes en el AA y el EA 30%. Fernández-Prior et al. (2020) analizaron la fracción líquida del alperujo almacenado en estanques de descarte obtenida a distintas profundidades, demostrando que se solubilizan ácidos orgánicos, azúcares y compuestos fenólicos de estructura simple como el hidroxitirosol, tirosol y dihidroxifenilglicol (DHPG).



**Fig. 2.12.** Concentración de compuestos fenólicos (g/L EA) hallada en los extractos acuosos de alperujo (EAs) y Agua de alperujo (AA) antes (Inicial) y después (Final) del desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, luego de 4 días de cultivo. Las barras muestran la media y el S.D. (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Por otra parte, como se puede observar en Fig. 2.12, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones iniciales y finales de compuestos



Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

fenólicos en los medios de cultivos analizados. Esto indicaría que *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 no consume estos compuestos aromáticos. En consecuencia, podría ser factible su recuperación para ser aprovechados e incorporados en diferentes productos antes o después del crecimiento de la levadura.

Algunos de los compuestos fenólicos encontrados en el alperujo como, hidroxitirosol, tirosol, dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleuropeína, son utilizados como aditivos alimentarios, farmacéuticos o cosméticos, debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias (Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Lama-Muñoz et al., 2019; Rubio-Senent et al., 2013; Rubio-Senent, 2011). Por ejemplo, Hidroxitirisol, tirosol y oleuropeína, son utilizados como filtros ultravioleta activos en productos cosméticos (Berbel et al., 2018). Del mismo modo, el dihidroxifenilglicol (DHPG) es empleado como marcador de diagnóstico y actividad farmacológica en condiciones patológicas de hipertensión y enfermedades neurodegenerativas (Fernández-Bolaños et al., 2008; Fernández-Prior et al., 2020). Asimismo, la oleuropeína está siendo analizada para su uso como antioxidante alimentario natural en productos de panadería (Takaç y Karakaya, 2009). Debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes permitiría, por un lado, la prolongación de la vida útil de estos productos y, por otro, la disminución del deterioro oxidativo durante el período de cocción (Galanakis et al., 2018).

A pesar de que las rutas metabólicas de degradación asociadas a los compuestos fenólicos han sido ampliamente estudiadas en bacterias (Katamaya et al., 1991), algunos autores documentan la capacidad de ciertas levaduras, como las de los géneros *Candida* sp., *Pichia* sp. y *Trichosporon* sp., de reducir compuestos fenólicos (Ntougias et al., 2013;

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

Santos y Linardi, 2001; Kim et al., 2004). Asimismo, se ha estudiado la capacidad de degradación de biofenoles y sus derivados, en algunas especies del género *Rhodotorula*, como, *Rh. mucilaginosa*, *Rh. rubra* y *Rh. glutinis* con resultados variables, dependientes de la cepa estudiada y del tipo de compuesto fenólico probado (Karakaya et al., 2014; Jarboui et al., 2012; Kim et al., 2004; Katamaya et al., 1991). Cabe señalar que, dentro del género hay evidencia de metabolismo de compuestos fenólicos como: catecol, cresol, fenol, hidroquinonas, tirosol, ácidos *p*-cumárico y vanílico (Jarboui et al., 2012; Bergauer et al., 2005; Sampaio, 1999; Middelhoven, 1993). Sin embargo, Libkind et al., (2004) demostraron que la cepa *Rh. mucilaginosa* CRUB0138, fue incapaz de utilizar los compuestos fenólicos mencionados anteriormente como fuente de carbono y energía, a diferencia de otras cepas de la misma especie, que sí pudieron metabolizarlos.

Es importante señalar que, en la mayoría de los trabajos, los medios de cultivo utilizados, no provienen de desechos olivícolas, sino que son medios sintéticos a los que se les adiciona el compuesto fenólico en estudio.

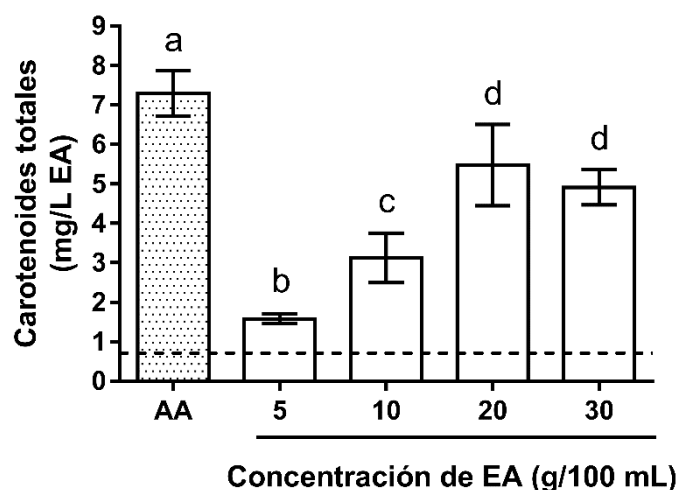
Por otro lado, Jarboui et al., (2012) documentan que *Rh. mucilaginosa* sp. presenta alto rendimiento en la degradación de tirosol, como así también de los ácidos *p*-cumárico y vanílico cuando se desarrolla en medios de cultivos derivados del alpechín y en medios minerales suplementados con compuestos fenólicos aislados desde alpechines. No obstante, la cepa utilizada en esta tesis, como ya se mencionó, no consume los compuestos fenólicos presentes en los medios de cultivo derivados del alperujo. Asimismo, a excepción del tirosol, los ácidos *p*-cumárico y vanílico documentados por Jarboui et al., (2012) no se hallaron en el alperujo utilizado en este trabajo. Estas diferencias en los tipos de compuestos fenólicos hallados, tienen que ver,

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

por un lado, con que alperujos y alpechines son residuos olivícolas que se generan a partir de procesos de extracción distintos (Borja et al., 2006; Ouzounidou et al., 2010).

Por otra parte, la composición de los residuos olivícolas, puede variar debido a la región de origen, variedad del olivar, condiciones climáticas, tiempo de cosecha, procesamiento de las aceitunas y las condiciones de extracción del aceite (Soberón et al., 2019; Karakaya et al., 2014; Ouzounidou et al., 2010; Usaquen-Alvarado, 2008). Con respecto a este último punto, el contenido de compuestos fenólicos en el alperujo, también puede verse afectado por la temperatura y duración de la etapa de batido, durante el proceso de extracción bifásico del aceite (Soberón et al., 2019; Mussio et al., 2014).

2.2.2. Producción de carotenoides por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en EAs y AA

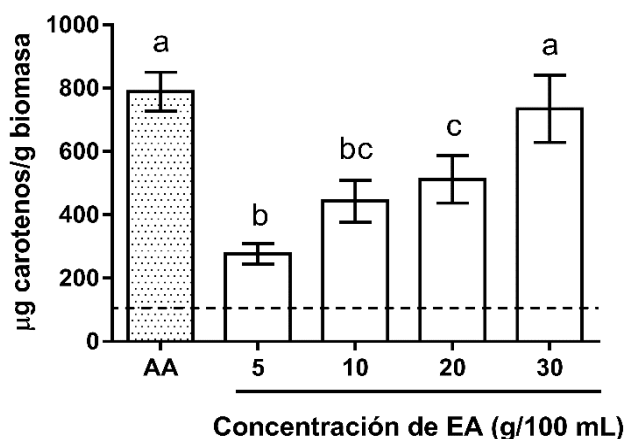


**Fig. 2.13.** Producción volumétrica total de carotenoides (mg/L) por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en los diferentes medios de cultivo (EAs y AA), luego de 4 días de cultivo. Las barras muestran la media y S.D. (n = 3). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Como se puede observar en la Fig. 2.13, la producción volumétrica total de carotenoides aumenta significativamente con la concentración de los EAs, alcanzando un máximo en los de 20% y 30% ( $5,5 \pm 1,0$  mg / L y  $4,9 \pm 0,5$  mg / L, respectivamente).

Asimismo, cuando *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 crece en AA, se obtienen  $7,3 \pm 0,6$  mg/L de carotenoides totales.

En el EA de 10%, el aumento de carotenoides podría estar relacionado con un crecimiento más rápido de la levadura y, en consecuencia, a un mayor número de células producidas. Mientras que, en los medios más concentrados como el AA y los EAs 20% y 30% el aumento en el contenido de carotenoides probablemente refleje la acumulación de estos pigmentos en el interior celular.



**Fig. 2.14.** Producción específica total de carotenoides ( $\mu\text{g}$  carotenos/ g de biomasa) por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en los diferentes medios de cultivo (EAs y AA), luego de 4 días de cultivo. Las barras muestran la media y S.D. ( $n = 3$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Así, la Fig. 2.14 muestra que en comparación con el inóculo inicial (línea de puntos), el contenido específico de carotenoides se incrementa en todos los medios estudiados. Sin embargo, este aumento es mayor cuando *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 se desarrolla en AA y en EA 30%. Es decir que, si bien *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 crece más lentamente en el EA 30% y AA, se observa una mayor estimulación en la producción de carotenoides respecto a los demás EAs. Estos medios están preparados con una mayor proporción de alperujo y, por lo tanto, contienen una mayor concentración de

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

compuestos inhibidores y estresores, como los compuestos fenólicos, sales y ácidos grasos de cadena corta (Ntougias et al., 2013; Ouzounidou et al., 2010; Kim et al., 2004).

En las levaduras carotenogénicas, las condiciones del medio de cultivo como, la presencia de sustancias inhibitorias, temperatura, luz, aereación, pH y la relación C/N, influyen de manera significativa en la síntesis de carotenoides (Elfeky et al., 2019; Yoo y Yang, 2016; Frengova y Beshkova, 2008; Libkind et al., 2006; Kim et al., 2004). De hecho, como se mencionó en la Introducción (Cap. Introducción General, pág. 19), la carotenogénesis en levaduras, está asociada a las respuestas al estrés, ya que las propiedades antioxidantes de los carotenoides permiten a estos organismos desarrollar tolerancia a factores adversos (Mannazzu et al., 2015; Marova et al., 2004). Por lo tanto, la mayor acumulación de carotenoides en las células de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 puede constituir una respuesta defensiva a estos medios más desfavorables.

Los valores de carotenoides obtenidos en este trabajo, varían entre 276,7 y 717,4  $\mu\text{g}$  carotenos/g biomasa y resultaron mayores a los reportados para una cepa de la misma especie (*Rh. mucilaginosa* AY-01) que fue aislada del suelo y cultivada en diferentes medios sintéticos (189,2  $\mu\text{g}$  carotenos/g biomasa en Agar Papa dextrosa y Agar extracto de levadura y malta), (Yoo et al., 2016). Sin embargo, niveles similares de carotenoides (250-300  $\mu\text{g}$  carotenos/g biomasa) fueron obtenidos cuando la cepa de *Rh. mucilaginosa* CRUB 0195, aislada de hábitats poco explorados de la Patagonia argentina, fue cultivada en medios derivados de subproductos agroindustriales y en medios sintéticos (Libkind et al., 2006). Además, la producción específica de carotenoides encontrada en este trabajo, es similar a la obtenida por Sharma y Goshal, (2020) (717,4  $\mu\text{g}$  carotenos/g biomasa), quienes

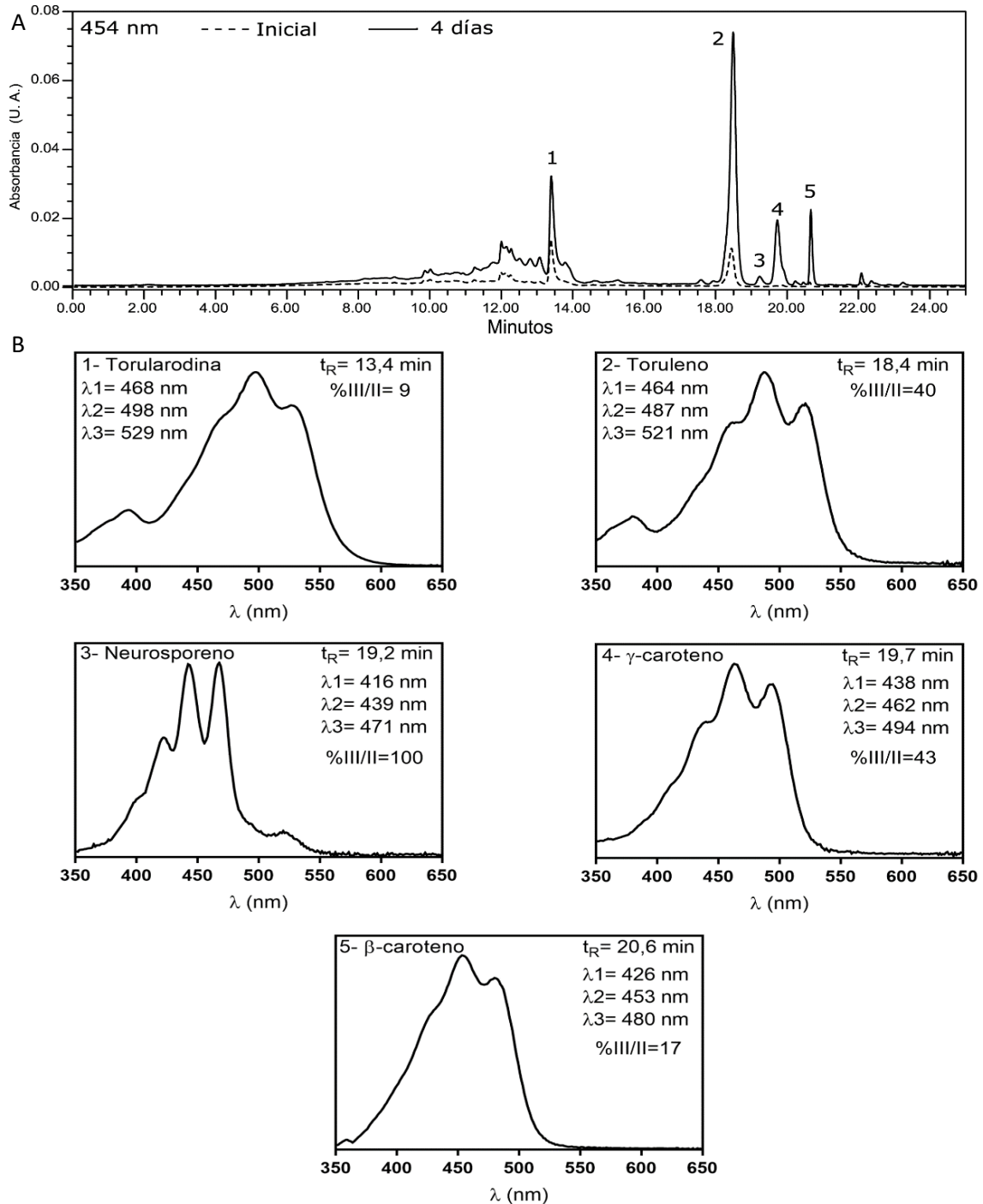
Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

optimizaron el crecimiento y la producción de estos pigmentos, en la cepa *Rh. mucilaginosa* MTCC-1403, sobre diferentes residuos agroindustriales.

Evaluamos luego, el contenido de carotenos individuales para determinar si hay cambios en el perfil de estos pigmentos de acuerdo al medio de cultivo. Las levaduras del género *Rhodotorula* son capaces de producir principalmente  $\beta$ -caroteno, toruleno y torularodina (Tang et al., 2019; Dias-Rodrigues et al., 2019; Avalos y Limón, 2017; Schneider et al., 2013; Moliné et al., 2012; Marova et al., 2012; Frengova y Beshkova, 2008; Buzzini et al., 2007; Libkind et al., 2006). Sin embargo, distintos trabajos documentan diferencias significativas en cuanto a la composición de carotenoides producidos entre diferentes especies del género *Rhodotorula* e incluso en cepas de la misma especie (Tang et al., 2019; Frengova y Beshkova, 2008; Buzzini et al., 2007; Libkind et al., 2006; Libkind et al., 2004). Estas diferencias también se deben a variaciones en las condiciones de cultivo de las levaduras y en los procedimientos de extracción, así como también en el proceso de cuantificación de carotenoides (Buzzini et al., 2007; Kot et al., 2018; Moliné et al., 2012; Buzzini et al., 2007; Libkind et al., 2006; Maldonade et al., 2007; Hernandez-Almanza et al., 2014).

Los compuestos carotenoides, pueden identificarse por su espectro UV/Vis, como así también por su tiempo de retención en RP-HPLC (Weber et al. 2007). De esta manera, se espera que la torularodina tenga un tiempo de retención más corto y absorba en una longitud de onda mayor (moliné et al., 2012), en comparación al toruleno y al  $\beta$ -caroteno, ya que presenta un grupo carboxilo y 14 dobles enlaces conjugados (c. d. b.).

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.



**Fig. 2.15. A)** Cromatograma obtenido a 454 nm de extractos de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 mediante un H4PLC Waters Alliance e2695, de fase inversa. Línea de puntos, representa el extracto inicial y la línea completa el extracto obtenido luego de 4 días de cultivo en EA 30 %. **B)** Espectros de absorción de los picos correspondientes a los diferentes pigmentos carotenoides hallados.

Además, la presencia del grupo carboxílico reduce la estructura fina del espectro, que puede estimarse mediante la relación % III / II (Fig. MyM.8). Como se muestra en la Fig. 2.15 A-B, el primer pico que aparece (tiempo de retención = 13,4 min) tiene el

mismo espectro UV/Vis que el informado para torularodina, con un máximo a 498 nm y una estructura fina pobre (%III / II = 9). El segundo pico (tiempo de retención = 18,4 min) muestra un espectro con bandas de absorción más definidas (% III / II = 40) y un máximo a 490 nm, como se espera para el toruleno que tiene 13 c.d.b., sumado a que presenta menor polaridad que la torularodina. Por último, el pico 5 corresponde al  $\beta$ -caroteno que es el carotenoide de menor polaridad de los que se identificaron, el cual eluye a los 20,6 minutos, como lo hizo el estándar (Fig. 2.16).

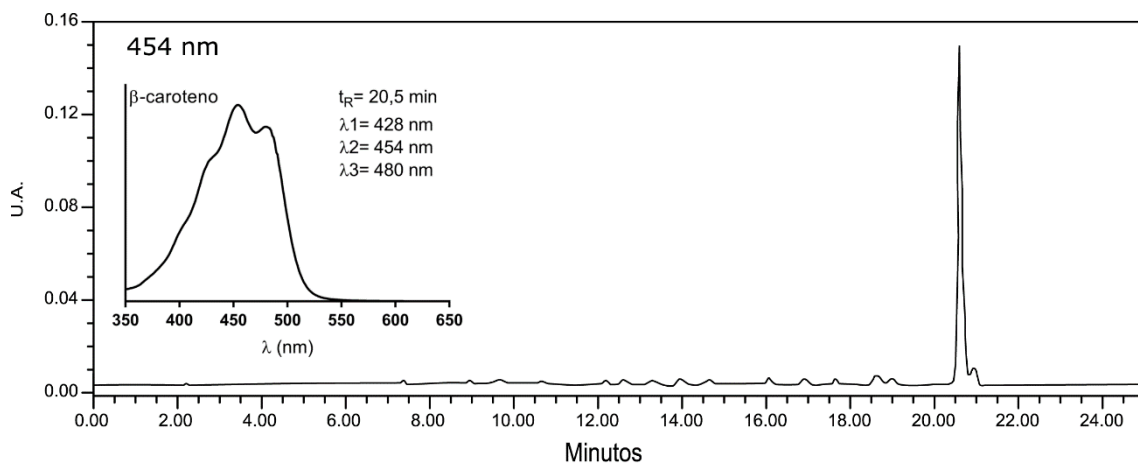


Fig. 2.16. Cromatograma y espectro de absorción del estándar de  $\beta$ -caroteno utilizado.

De esta manera, los principales carotenoides producidos por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 son, toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno que representan aproximadamente el 70% del contenido total de carotenoides. Además, se hallaron dos picos de menor dimensión entre toruleno y  $\beta$ -caroteno (Fig. 2.15), que probablemente correspondan a neurosporeno y  $\gamma$ -caroteno, de acuerdo con su espectro UV/Vis; según el tiempo de retención y datos brindados por la literatura sobre la composición de carotenoides sintetizados por *Rhodotorula spp.* (Weber et al., 2007; Maldonade et al., 2007; Buzzini, 2007; Davoli et al., 2004).



Asimismo, como muestra la Fig. 2.17, según el medio de cultivo que se trate, no solo cambia el contenido total de carotenoides, sino también el perfil de estos pigmentos. El contenido final de  $\beta$ -caroteno no varía entre los EAs, sin embargo, en AA es significativamente mayor. En efecto, Marova et al. (2004) reportan un aumento significativo en la producción de carotenoides, especialmente de  $\beta$ -caroteno en algunas cepas de *Rh. mucilaginosa*, cuando se encuentran bajo estrés salino. Además, Frengova

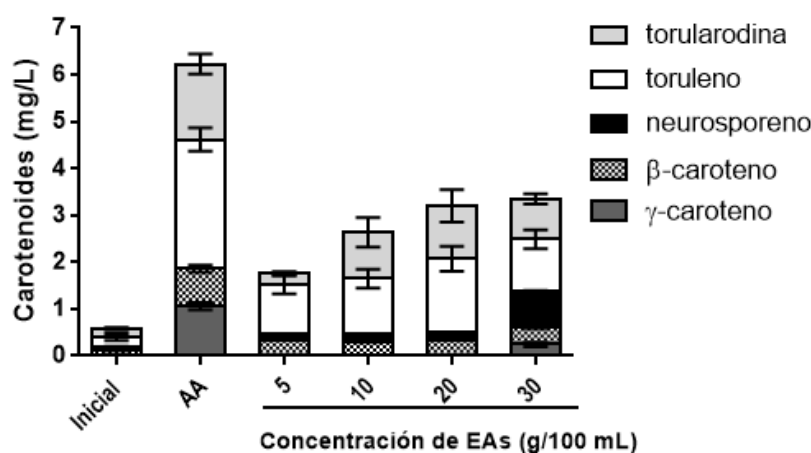


Fig. 2.17. Perfil de carotenoides producidos por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en los diferentes medios de cultivo (EAs y AA), luego de 4 días de cultivo. Las barras muestran media y S.D. (n = 3).

y Beshkova (2008), junto con Cheng y Yang (2016), documentan la estimulación en la producción de  $\beta$ -caroteno en especies del género *Rhodotorula* cuando crecen en medios de cultivo con elevada concentración de sales. Especialmente, las que presentan iones con número de oxidación +2. Estos iones divalentes, pueden influir en la composición de carotenoides específicos, particularmente, favoreciendo la producción de  $\beta$ -caroteno; debido a que actuarían sobre los mecanismos de activación de las enzimas desaturadas, implicadas en la carotenogénesis (Kot et al., 2018; Cheng y Yang, 2016; Frengova y Beshkova, 2008; Britton, 1998).

El alperujo presenta cantidades significativas de sales y de diferentes iones, entre los que se encuentran iones divalentes como:  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ , y  $\text{Mg}^{+2}$  (Morillo et al., 2009;

Albuquerque et al., 2004). Siendo que el AA es un medio fresco, que estuvo en contacto con la pulpa de las aceitunas durante gran parte del tiempo en el proceso de extracción bifásico y en la deposición final del subproducto, los compuestos hidrosolubles podrían solubilizarse mejor que en los EAs (Fernández-Prior et al., 2020; Borja et al., 2006).

Por otra parte, cuando la levadura crece en AA (Fig. 2.17), el principal carotenoide producido es toruleno, seguido por torularodina y  $\gamma$ -caroteno. No se detectaron niveles significativos de neurosporeno, lo que probablemente esté señalando que la ruta biosintética es muy activa y los precursores ubicados más arriba de la vía metabólica son rápidamente transformados en productos. El neurosporeno es un intermediario que puede ser convertido en licopeno mediante acción de la enzima fitoeno desaturasa o en  $\beta$ -zeacaroteno mediante la acción del licopeno ciclasa (Tang et al., 2019; Kot et al., 2018). Ambos compuestos son precursores del  $\gamma$ -caroteno, el cual a su vez puede transformarse en toruleno o  $\beta$ -caroteno.

De esta manera, el aumento en la cantidad de ambos carotenos indicaría que cuando *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 crece en AA, ambas ramas de síntesis de carotenoides se estimulan (Fig. 2.4). A su vez, entre las diferentes concentraciones de EAs, también son evidentes los cambios en los perfiles de carotenoides (Fig. 2.17). De esta manera, en el EA de 5%, el toruleno representa el 80% del contenido total de carotenoides, luego alcanza un máximo en el EA de 20% y vuelve a disminuir cuando *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 se desarrolla en el EA de 30%.

Por el contrario, con respecto a la concentración de torularodina, en los EAs de 10, 20 y 30%, es significativamente más alta respecto al inóculo inicial. Además, en el EA de

30% se observa una acumulación de neuroesporeno, lo que indicaría una desaceleración en la ruta biosintética de carotenoides (Kot et al., 2018).

El neuroesporeno se encuentra antes del punto de ramificación de la biosíntesis de los demás carotenoides, siendo precursor tanto del toruleno como del  $\beta$ -caroteno (Fig. 2.4), (Kot et al., 2018; Zoz et al., 2015; Hernandez-Almanza et al., 2014). La falta de cambio en los niveles de  $\beta$ -caroteno junto con el aumento de toruleno observado, indican que la composición de los EAs favorece en *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, a la rama metabólica de la síntesis de toruleno y torularodina (Fig. 2.4).

El alperujo posee una concentración alta de sales, compuestos fenólicos, y una composición de nutrientes desequilibrada (Soberón et al., 2019; Ouzounidou et al., 2010; Morillo et al., 2009; Usaquen-Alvarado, 2008). Estas características tienen la capacidad de estimular la biosíntesis de carotenoides en *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, probablemente por la función que presentan estos pigmentos en cuanto a la protección contra el daño oxidativo celular, frente a un medio estresante (Zoz et al., 2015; Frengova y Beshkova, 2008; Moliné et al., 2009; Marova et al., 2004). A su vez, la complejidad de los medios derivados del alperujo provoca que, según el tipo de medio de cultivo que se trate (AA o EAs), varíe el perfil y el contenido total de carotenoides sintetizados.

### 2.3. Conclusiones parciales

- *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638 puede crecer en AA y en todas las concentraciones de EAs analizadas.
- Las características fisicoquímicas de los medios analizados (AA y EAs), permiten el desarrollo de esta cepa y la producción de carotenoides.

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

- El EA 10% presenta la máxima tasa de crecimiento y la mayor cantidad de células producidas por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Este último valor, disminuye tanto a concentraciones más bajas (EA 5%), como a concentraciones más elevadas del medio de cultivo (AA, EA 20 % y 30%).
- Luego del desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, se genera un aumento de los valores de pH en todos los medios analizados. Este efecto, es ligeramente mayor en los medios con menor concentración de alperujo.
- En los medios derivados del alperujo analizados, *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 es capaz de metabolizar eficientemente todos los azúcares presentes, preferentemente disacáridos y monosacáridos. Sin embargo, en los EAs su consumo difiere dependiendo de la concentración de estos medios; siendo mayor la asimilación en los medios con menor concentración de alperujo.
- *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 no consume compuestos fenólicos, en ninguno de los medios de cultivos analizados.
- Los principales pigmentos carotenoides sintetizados por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 son: toruleno y torularodina. La producción volumétrica total de carotenoides, aumenta con la concentración del EA. A su vez, según el medio de cultivo que se trate, cambia el perfil de estos pigmentos hallados.

## 2.4. Bibliografía

- Aksu, Z.A., & Tugba, E. "Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginoso*: Use of agricultural wastes as a carbon source." *Process Biochemistry* 40 (2005): 2985–2991.
- Alvarez, R.M., Rodríguez, B., et al. "Lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis* on sugar cane molasses in single-stage continuous culture." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8 (1992): 214-215.
- Araújo, M., Pimentel, F., et al. "Phenolic compounds from olive mill wastes: health effects, analytical approach and application as food antioxidants." *Trends in Food Science & Technology*. 2, no. 45 (06 2015): 200-211.
- Arevalo-Chávez, S.M. «Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* (CPA-1).» *Tesis Doctoral*. Lérida, Cataluña: Universitat de Lleida, Noviembre de 1998. 194.
- Avalos, J., & Limón, M.C. «Biosíntesis de carotenoides en Hongos.» Cap. 15 de *Carotenoides en agroalimentación y salud.*, de A.J. Meléndez-Martínez, 704. Sevilla: Editorial Terracota, 2017.
- Berbel, J., Gutiérrez-Martín, C., et al. «Valorización de los subproductos de la cadena del aceite de oliva. .» *Mediterráneo Económico.*, nº 32 (06 2018): 273-289.
- Bergauer, P., Fonteyne, P.A., et al. "Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeast." *Chemosphere*, no. 59 (2005): 909-918.
- Berman, J., Zorrilla-Lopez, U., et al. «Nutritionally important carotenoids as consumer products.» *Phytochem Rev.*, 2014: 1-17.
- Bhosale, P. "Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms." *Appl Microbiol Biotechnol.*, no. 63 (2004): 351–361.
- Bhosale, P.B. & Gadre, R.V. "Production of B-carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*." *Appl Microbiol Biotechnol*. 55 (2001): 423-427.
- Borja, R., Raposo, F., et al. "Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills." *Grasas y Aceites*. 1, no. 57 (2006): 32-46.
- Borroni, M.V., González, M.T., et al. "Bioproduction of carotenoid compounds using two-phase olive mill." *Process Biochemistry* 54 (2017): 128–134.
- Britton, G., & Liaaen-Jensen, S. *Carotenoids*. Vol. 3. Boston, 1998.
- Buzzini, P., & Martini, A. "Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin." *Bioresource Technology* 71 (1999): 41-44.
- Buzzini, P., Innocenti, M., et al. "Carotenoids Profiles of yeast belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*." *Can. J. Microbiol.*, no. 53 (2006): 1024-1031.
- Cheng, Y., & Yang, C. "Using strain *Rhodotorula mucilaginoso* to produce carotenoids using food wastes." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 61 (2016): 270–275.

Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

- Damiani, M.C. «Haematococcus pluvialis (CLOROPHYTA): Biología, ultraestructura y evaluación del contenido lipídico para la obtención de Biodiesel.» *Tesis Doctor en Biología Universidad Nacional del Sur (UNS)*. Bahía Blanca, Buenos Aires: Repositorio Digital (UNS), 05 de Noviembre de 2010.
- Davoli, P., Mierau, V., et al. "Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus*." *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, no. 4 (2004): 392–397.
- de Alvarado-Ortiz, T.B. & Petrushina, A. " Glutamato Aspectos Bioquímicos". Chap. 4 in "*Umami y Glutamato aspectos químicos, biológicos y tecnológicos* " by Reyes-Reyes, F.G., 472. San Pablo: Editorial Bluscher, 2021
- Dias-Rodrigues, T.V., Amore, T.D., et al. "Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts." *Food Technology & Biotechnology* 3, no. 57 (2019): 388-398.
- Efkey, N., Elmahmoudy, M., et al. "Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* with a Combined Cultivation Mode of Nitrogen, Sulfur, and Aluminium Stress." *Applied sciences*, no. 9 (2019): 2-19.
- Figueiredo-González, M., Reboredo-Rodríguez, P., et al. "The involvement of phenolic-rich extracts from Galician autochthonous extra-virgin olive oils against the  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase." *Food Research International*, no. 116 (2019): 447-454.
- Fregova, G., Simova, E., et al. "Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*., no. 18. (1997): 272–277.
- Fregova, G.I., & Beshkova, D.M. "Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*., 2008: 1-43.
- Galanakis, C.M., Tsatalas, P., et al. "Control of microbial growth in bakery products fortified with polyphenols recovered from olive mill wastewater." *Environmental technology & innovation*., no. 10 (2018): 1-15.
- Ghilardi, C. Sanmartin-Negrete, P. Carelli, A.A & Borroni, V. "Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*." *Bioresour. Bioprocess*. 7, no. 52 (2020): 2-11.
- González, J.L., Bellido, E., et al. "Reduction of total polyphenols in olive mill wastewater by physico-chemical purification." *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*. 29, no. 5 (Diciembre 1994): 851-865.
- Hamden, K., Allouche, N., et al. "Inhibitory action of purified hydroxytyrosol from stored olive mill waste on intestinal disaccharidases and lipase activities and pancreatic toxicity in diabetic rats." *Food Sci. Biotechnol.*, 2010: 439-447.
- Hernandez-Almanza, A. Montañez-Sáenz, J. Martínez-Ávila, Ch. et al. "Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation." *Food Bioscience*. 7 (2014): 31–36.

Capítulo 2: *Rh.mucilaginoso* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

- Jarboui, R., Baatia, H., et al. "Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginoso*." *Environmental Technology*. 33, no. 8 (2012): 951–960.
- Karakaya, A., Bozkoyunlu, G., et al. "Development of pH adjustment-based operational strategy to increase total phenol removal rate in biodegradation of olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*." *Desalination and Water Treatment*., no. 52 (2014): 7277-7281.
- Katamaya, K., Tobita, S., et al. "Degradation of Phenol by yeast *Rhodotorula*." *J. Gen. Appl. Microbiol.*, no. 37 (1991): 147-156.
- Kim, B.K., Park, K.P., et al. "Effect of Phenol on b-Carotene Content in Total Carotenoids Production in Cultivation of *Rhodotorula glutinis*." *Korean J. Chem. Eng.* 3, no. 21 (2004): 689-692.
- Kot, A.M., Błażej, S., et. al. "Torulene and torularhodin: "new" fungal carotenoids for industry?" *Microb Cell Fact.* 17, no. 49 (2018): 1-14.
- Lama-Muñoz, A., Rubio-Senent, F., et al. "The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization." *Innovative Food Science and Emerging Technologies*., 2019: 11-17.
- Latam News Media LLC. *Food News Latam.com*. 09 12, 2014. <https://www.foodnewslatam.com> (último acceso: 02/01/2021).
- Libkind, D., & van Broock, M. "Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeast." *World Journal of Microbiology & Biotechnology*., 2006: 687-692.
- Libkind, D., Brizzio, S., et al. «*Rhodotorula mucilaginoso*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake.» *Folia Microbiol.* 1, nº 49 (2004): 19-25.
- Lim, J., Zhanga, X., et al. "Starch digested product analysis by HPAEC reveals structural specificity of flavonoids in the inhibition of mammalian  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidases." *Food Chemistry*, no. 288 (2019): 413-421.
- Lin, Z., Zhou, Y., et al. "Effect of Multiple Inhibitions in Corn cob Hydrolysate on the Lipid Production by *Rhodotorula glutinis*". *Energy & Fuels*. 31 (2017): 12247-12255.
- Lopes, H. J. S., Bonturi, N., et al. "*Rhodotorula toruloides* single cell oil production using eucalyptus urograndis hemicellulose hydrolysate as a carbon source". *Energies*, 13(4)(2020): 795.
- Maldonade, I.R., Scamparini, A.R., et al. "Selection and characterization of carotenoids-producing yeast from campinas Region, Brazil." *Brazilian Journal of Microbiology*., no. 38 (2007): 65-70.
- Malisorn, C., & Suntornsuk, W. "Optimization of B-Carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine." *Bioresource Technology*., no. 99 (2008): 2281–2287.
- Mannazzu, I., Landolfo, S., et al. "Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeast of biotechnological interest." *World J Microbiol Biotechnol.*, 2015.
- Mares, D. "Ultra structural and cytochemical study of *Rhodotorula glutinis* in the main growth faces." *Mycopathologia*., no. 80 (1982): 179-188.

Capítulo 2: *Rh.mucilaginoso* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

- Marova, E., Breierova, E., et al. "Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeast." *Annals of Microbiology* 1, no. 54 (2004): 73-85.
- Marova, M., Carnecka, A., et al. «Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production.» *Journal of Environmental Management* 95 (2012): 338-342.
- Middelhoven, W.J. "Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeast and yeast likefungi, a literature reviewand an experimental approach." *Antonie Van Leeuwenhoek*, no. 63 (1993): 125-144.
- Moliné, M., Libkind, D., et al. "Production of Torularhodin, Torulene, and b -Carotene by Rhodotorula yeast." Chap. 13 in *Microbial Carotenoids from fungi. Methods and Protocols.*, by J.L. Barredo, 285. León: Springer, 2012.
- Moore, M.M., Breeveded, M.W., et al. "The Role of Carotenoids in Preventing Oxidative Damage in the Pigmenteded Yeast, Rhodotorula mucilaginoso." *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 270, no. 2 (1989): 419-431.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., et al. "Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes." *Appl Microbiol Biotechnol.*, no. 82 (2009): 25–39.
- Morillo-Perez, J.A. *Biorremediación del alperujo: estudio de la microbiota asociada y producción del exoplosarido jamilano*. Tesis Doctoral., Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología., Universidad de Granada., Granada, España.: Editorial de la Universidad de Granada., 2007, 136.
- Mussio, D.F., Ceci, L.N., et al. «Biofenoles en las corrientes de procesamiento de aceite de oliva virgen.» Editado por et al. Cecilia Penci. *V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC)*. Córdoba, Argentina., 2014. 129-135.
- Ntougias, S., Bourtzis, K., et al. «The Microbiology of Olive Mill Wastes.» *BioMed Research International* 2013 (2013): 1-16.
- Ouzounidou, G., Zervakis, G.I., et al. "Raw and Microbiologically Detoxified Olive Mill Waste and their Impact on Plant Growth." *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology.*, no. 4 (2010): 21-38.
- Panesar, R., Kaur, S., et al. "Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review." *Food Science (Issue on Food bioprocessing)* , no. 1 (2015): 70-76.
- Pereira-Cipolatti, E., Diaz-Remedia, R., et al. "Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.*, no. 20 (2019): 101-208.
- Poontaweea, R., Yongmanitchaia,W., et al. «Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of degradation compounds on growth and lipid production.» *Process Biochemistry.*, nº 53 (2017): 44–60.
- Qin, L., Liu, L., et al. "From low-cost substrates to single cell oils synthetized by oleaginous yeast." *Bioresource Technology*, no. 245 (2017): 1507-1519.



Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

- Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, S.M., et al. "Differential  $\alpha$ -amylase/ $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes." *Food and Function*, no. 8 (03 2017): 1942-1954.
- Reyes-Alvarado, L.C. (2012). *Producción de etanol por fermentación de suero de quesería con levaduras del género Kluyveromyces y Saccharomyces*. Tesis de Grado, Instituto de Cs. Básicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Méjico., 2012, 103.
- Roadjanakamolson, M., & Suntornsuk,W. "Production of  $\beta$ -Carotene-Enriched Rice Bran Using Solid-State Fermentation of *Rhodotorula glutinis*." *J. Microbiol. Biotechnol.* 3, no. 20 (2010): 525–531.
- Rodríguez, M.M., Perez, J., et al. "Effect of extracts obtained from olive oil mill waste on *Bacillus megaterium* ATCC 33085." *Journal of Applied Bacteriology* 64, no. 3 (marzo 1988): 219-226.
- Rodríguez-Gutierrez, G., & Monetta, P. «Subproductos del olivar: Recuperación de compuestos fenólicos. Experiencias en España y Argentina.» *Ciclo virtual de seminarios internacionales: Avances en olivicultura y elaiotecnia*. INTA,CRILLAR-CONICET,CREA, UNdeC, Chile OLIVA, Min. Agric, Gand yPesca de la Rep.Arg. San Juan, San Juan, 8 de julio de 2021.
- Rubio-Senent, F. *Recuperación de compuestos bioactivos a partir de subproductos del aceite de oliva*. Tesis Doctoral, Departamento de Nutrición y Bromatología., Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla., Sevilla: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de la Grasa, España., 2011, 358.
- Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., et al. "Phenolic extract obtained from steam-treated olive oil waste: characterization and antioxidant activity." *LWT-Food Sci Technol.*, no. 54 (2013): 114-124.
- Ruiz-Sola, M., & Rodríguez-Concepción, M. "Biosíntesis de carotenoides: consideraciones generales." Chap. 9 in *Carotenoides en agroalimentación y salud.*, by J.A. Meléndez-Martínez, 167-186. Madrid: Editorial Terracota, SA de CV., 2017.
- Sampaio, J.P. "*Rhodotorula* spp." Chap. 155 in *The Yeasts*, by Fell J.K. & Boekhout,T. Cletus P. Kurtzman, 1873-1927. New York, New York: Elsevier Science, 2010.
- Sampaio, J.P. "Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetus yeast: Taxonomic implications." *Can. J. Microbiol.*, no. 45 (1999): 491-512.
- Santos, V.L., & Linardi, V.R. "Phenol degradation by yeasts isolated from industrial effluents." *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47 (2001): 213-221.
- Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., et. al. "Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents." *Energy*, no. 61 (2013): 34-43.
- Sharma, R., & Ghoshal, G. "Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach." *Biotechnology Reports*, no. 25 (2020).

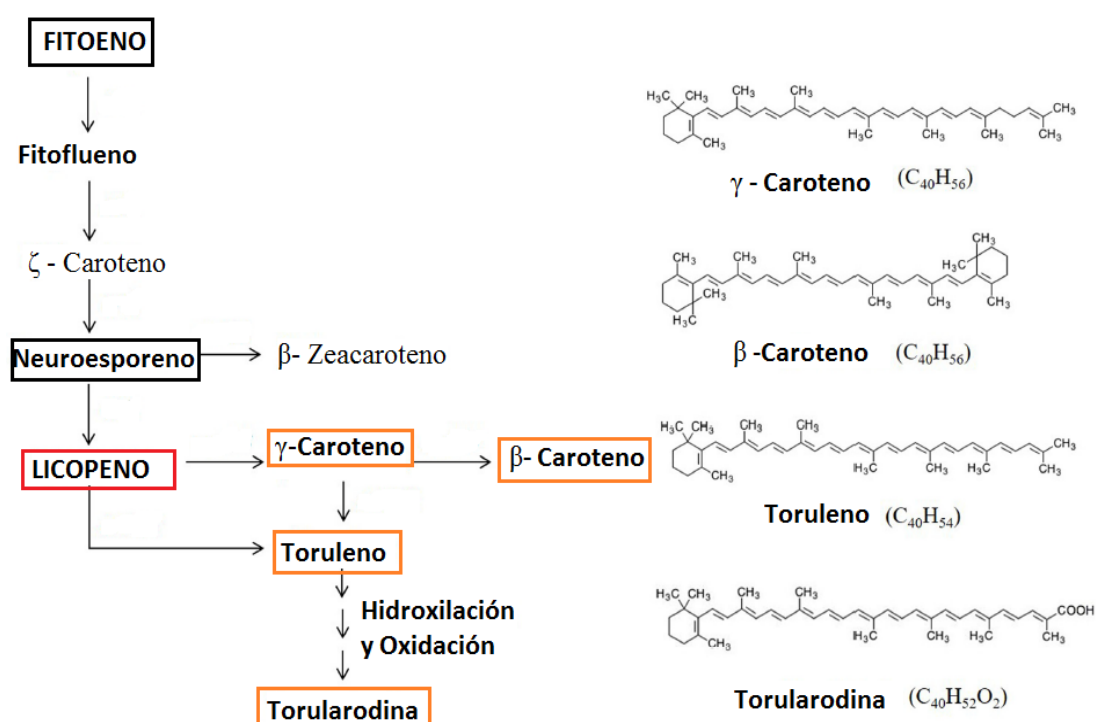
Capítulo 2: *Rh.mucilaginosa* LPSC 638: desarrollo y producción de pigmentos carotenoides sobre medios de cultivos derivados del alperujo.

- Soberón, L.F., Carelli, A.A., et al. "Method for phenol recovery from "alperujo": numerical optimization." *European Food Research and Technology.*, 2019: 1-10.
- Suarez, M., Romero, M.P., et al. "Development of a Phenol-Enriched Olive Oil with Phenolic Compounds from Olive Cake." *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010): 10396–10403.
- Sun, T., Tadmor, Y., et al. *Pathways for Carotenoid Biosynthesis, Degradation and storage*. Vol. 1, chap. 1 in *Plant and Food Carotenoids, Methods and Protocols.*, by M. & Welsch, R. Rodríguez-Concepción, 421. Hatfield, Hertfordshire: Humana press, 2018.
- Takaç, S., & Karakaya, A. "Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater." *Recent Patents on Chemical Engineering.* 2, no. 3 (2009): 230-237.
- Tang, W., Wang, Y., et al. "Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for enhanced Their Production." *J. Microbiol. Biotechnol.* 4 , no. 29 (2019): 507–517.
- Usaquen-Alvarado, S.M. *Aprovechamiento y valorización del alperujo tratado termicamente como: fertilizante biológico y fuente de Hidroxitirosol*. Tesis de Grado, Granada, Granada: Pontificia Universidad Javeriana, 2008.
- Walker, G.M. *Yeast. Physiology and Biotechnology*. Chichester, West Sussex: Wiley & sons Ltd., 1998.
- Weber, R.W., Anke, H., et al. "Simple method for the extraction and reserved-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi)." *J Chromatogr A*, no. 1145 (2007): 118-122.
- Yoo, A.Y., Alnaeeli, M., et al. "Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01." *Process Biochemistry.*, no. 51 (2016): 463-473.
- Zoz, L., Carvalho, J.C., et al. "Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics a Review." *Brazilian archives of Biology and technology.* 58, no. 2 (2015): 278-288.

Capítulo 3: Incidencia del Imidazol en  
la biosíntesis de carotenoides en  
*Rh. mucilaginoso* LPSC 638.

### 3.1. Introducción

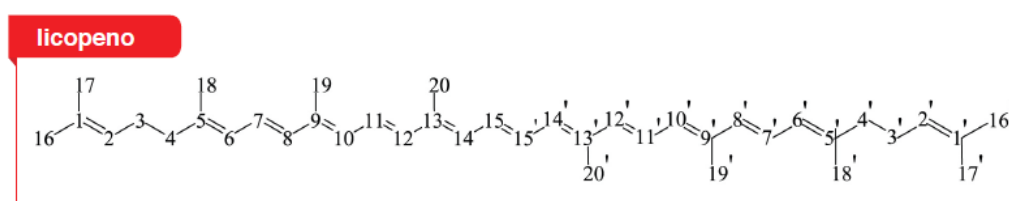
La síntesis de carotenoides dentro del género *Rhodotorula* esta conservada y ocurre a través de la vía del mevalonato (Tang et al., 2019; Sun et al., 2018; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción et al., 2018; Hernandez-Almanza et al., 2014). El primer carotenoide sintetizado resulta de la condensación de dos moléculas de geranilgeranil pirofato (GGPP) para formar el caroteno de 40 C denominado fitoeno, el cual no presenta color (Fig. 3.1). Esta reacción es catalizada por una enzima, denominada fitoeno-sintasa (Li et al., 2020; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción et al., 2018; Srivastava y Srivastava, 2013; Britton, 1998).



**Fig. 3.1.** Extracto de la ruta biosintética de pigmentos carotenoides en el género *Rhodotorula*. Diagrama adaptado de (Tang et al., 2019)

Luego, el fitoeno se transforma en licopeno  $C_{40}H_{56}$  (Fig. 3.1 y 3.2), mediante una serie de desaturaciones e isomerizaciones, mediadas por diferentes enzimas (Tang et

al., 2019; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2018; Hernandez-Almanza et al., 2014; Britton, 1998). El licopeno puede seguir dos rutas de ciclación independientes que conducen a dos ramas: la del  $\gamma$ -caroteno y la del toruleno como productos inmediatos (Fig. 3.1); para luego convertirse en  $\beta$ -caroteno y torularodina, respectivamente (Farkas et al., 2020; Hernandez-Almanza et al., 2014; Srivastava y Srivastava, 2013; Bhosale y Gadre, 2001). Estas reacciones, aumentan el número de dobles enlaces conjugados de la cadena hidrocarbonada, que se traduce en un cambio de la absorción de luz hacia longitudes de onda mayores y, por lo tanto, en la aparición del color rojo característico del licopeno (Farkas et al., 2020; Ruíz-Sola y Rodríguez-Concepción et al., 2018). A su vez, este caroteno puede existir en las formas *cis* y *trans* (Farkas et al., 2020; Varma et al., 2020; Sun et al., 2018).



**Fig. 3.2.** Molécula de Licopeno dónde se muestra la numeración de los átomos de C. Diagrama tomado de (Meléndez-Martínez, 2017).

Por otra parte, numerosos compuestos químicos afectan la carotenogénesis en microorganismos, por ejemplo: imidazol, piridina, nicotina y morfolina (Farkas et al., 2020; Luo et al., 2020; Li et al., 2020; Liu et al., 2019; Choudhari et al., 2008; Bhosale, 2004). Estos agentes químicos, tienen la capacidad de inhibir la actividad enzimática de las licopeno-ciclasas provocando la acumulación de este caroteno, en detrimento de la producción de  $\beta$ -caroteno (Fig. 3.1), (Farkas et al., 2020; Tang et al., 2019; Hernandez-Almanza et al., 2014; Choudhari et al., 2008; Bhosale, 2004; López-Nieto et al., 2004 ;

Ninet et al., 1969). Estos inhibidores son utilizados para la producción microbiológica a escala industrial del licopeno (Farkas et al., 2020; Li et al., 2020; Berman et al., 2014 ; Xu et al., 2007).

El imidazol, es un intermediario en la biosíntesis de la histidina y se forma a partir del imidazol glicerol fosfato (Hernández-Almanza et al., 2014; Domínguez et al., 2005). Su fórmula molecular es  $C_3H_4N_2$  y pertenece a una familia de compuestos químicos aromáticos, caracterizada por disponer de un anillo pentagonal nitrogenado (Domínguez et al., 2005). Este compuesto, inhibe la actividad de la enzima licopeno ciclasa, permitiendo la acumulación del licopeno (Luo et al., 2020; Berman et al., 2014; Hernandez-Almanza et al., 2014; López-Nieto et al., 2004; Bhosale, 2004). Esta enzima es responsable de la ciclación de los extremos del  $\beta$ -caroteno, en el paso subsiguiente de la vía carotenogénica (Hernandez-Almanza et al., 2014 ; Berman et al., 2014; Bhosale, 2004).

El licopeno es el caroteno con mayor poder antioxidante, al menos in vitro, conocido hasta el momento (Varma et al., 2020; Hernandez-Almanza et al., 2014; Srivastava y Srivastava, 2013; Hsiao et al., 2004). De hecho, se ha demostrado que una dieta rica en este caroteno ayudaría a prevenir enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y ciertos tipos de cáncer (Farkas et al., 2020; Li et al., 2020; Varma et al., 2020; Hernández-Gras et al., 2017; Srivastava y Srivastava, 2013; Xu et al., 2007; Hsiao et al., 2004). Además, se ha comprobado que inhibe la síntesis del colesterol y mejora la degradación de las lipoproteínas de baja densidad (Li et al., 2020; Hernandez-Almanza et al., 2014). En consecuencia, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, junto con la Organización Mundial de la Salud, han

identificado al licopeno como nutriente clase A, debido a sus múltiples funciones fisiológicas (Li et al., 2020; Berman et al., 2014). De hecho, está siendo ampliamente utilizado en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Farkas et al., 2020; Li et al., 2020; Varma et al., 2020; Berman et al., 2014; Xu et al., 2007). En efecto, el mercado mundial del licopeno a granel, asciende a los 80 millones de euros con un promedio de crecimiento anual, del 2,9 % en los Estados Unidos, 4,2 % en Italia y 4,9 % en China, según datos brindados por el Servicio de Información Comunitario sobre Investigación y Desarrollo (UE CORDIS, 2020).

Actualmente, existen tres fuentes principales de obtención del licopeno (Li et al., 2020; Berman et al., 2014). En primer lugar, a partir de fuentes vegetales particularmente desde el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Li et al., 2020; Rodríguez-Concepción et al., 2018; Hernández-Gras et al., 2017; Berman et al., 2014; Srivastava y Srivastava, 2013; López-Nieto et al., 2004). Esta fuente ofrece un rendimiento limitado ya que es dependiente de características geográficas y climáticas (Silva, et al., 2021; Hernández-Almanza et al., 2014). Además, el proceso va acompañado por la generación de una gran cantidad de desechos (Li et al., 2020).

En segundo lugar, mediante síntesis química (Silva, et al., 2021; Li et al., 2020; Dias-Rodrigues et al., 2019; Gong et al., 2016; Nigam y Luke, 2016). Este procedimiento es el más utilizado en la actualidad (Berman et al., 2014). No obstante, presenta aspectos negativos para el ambiente y la salud; ya que, genera contaminantes que no son biodegradables, y, además, los precursores que se utilizan en el proceso tienen efectos cancerígenos según, Nigam y Luke, (2016).

Por último, el licopeno puede obtenerse por síntesis microbiana (levaduras, microalgas y ciertos hongos filamentosos), (Silva, et al., 2021; Li et al., 2020; Farkas et al., 2020; Luo et al., 2020; Gong et al., 2016; Berman et al., 2014; Hernández-Almanza et al., 2014; Choudhari et al., 2008; Xu et al., 2007; López-Nieto et al., 2004). A diferencia de los métodos anteriores, esta opción es amigable con el medio ambiente y el rendimiento de la obtención del producto, no se ve afectado por la geografía o el clima (Li et al., 2020). Asimismo, se pueden utilizar sustratos de bajo costo para el desarrollo de los microorganismos, lo cual disminuye el costo del proceso total (Dias-Rodriguez et al., 2019; Panesar et al., 2015; Hernández-Almanza et al., 2014). Además, este bioproceso no emplea reactivos químicos (Li et al., 2020; López-Nieto et al., 2004).

En el Capítulo 2, comprobamos la aptitud de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 para crecer y sintetizar pigmentos carotenoides en los medios derivados del alperujo (EAs y AA), su metabolismo (asociado a carbohidratos y proteínas) y su incapacidad de consumir biofenoles. En el presente Capítulo, se evaluará el efecto del imidazol en la síntesis de carotenoides en *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, y en su desarrollo y metabolismo.



### Objetivo General

Determinar la capacidad de producción de licopeno por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 debida a la presencia de Imidazol.

### Objetivos específicos

- Evaluar el desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en EA 30% con y sin Imidazol.
- Evaluar el efecto del imidazol sobre la producción de carotenoides en *Rh. mucilaginoso* LPSC 638.
- Analizar y evaluar la producción de licopeno y  $\beta$ -caroteno por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en EA 30% con y sin imidazol.

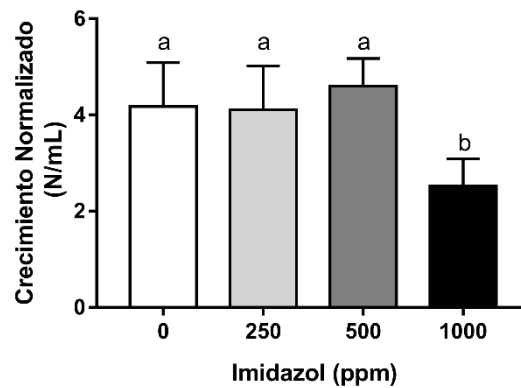
## 3.2. Resultados y discusión

### 3.2.1. Efectos del imidazol sobre la biosíntesis de carotenoides en *Rh. mucilaginoso* LPSC 638

Como demostramos previamente, *Rhodotorula mucilaginoso* LPSC 638 tiene la capacidad de sintetizar principalmente,  $\beta$ -caroteno, toruleno y torularodina en diversas proporciones (Fig. 2.15 y 2.17), (Tang et al., 2019; Thakur y Azmi, 2013; Frengova y Beshkova, 2008; Libkind et al., 2006; Buzzini et al., 2007; Zoz et al., 2015; Bhosale y Gadre, 2001; Margauth y Meydav, 1968). Sin embargo, la utilización de inhibidores químicos, como el imidazol, permitiría estimular la ruta biosintética del licopeno (López-Nieto et al., 2004), lo cual podría convertir a *Rhodotorula mucilaginoso* LPSC 638 en una alternativa para producir este caroteno.

Evaluamos entonces, el efecto del imidazol en el medio de cultivo sobre el crecimiento y producción de carotenos por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en EA 30%. Elegimos este EA como medio de cultivo para la levadura, debido a que se obtiene una relación  $\mu\text{g}$  de carotenos/g de levadura mayor, en comparación a las demás concentraciones de EAs analizados (Ghilardi et al., 2020). Además, probamos tres concentraciones de imidazol: 250 ppm, 500 ppm y 1000 ppm, las cuales están reportadas en la literatura, que resultan inhibitorias de la enzima licopeno ciclasa (López-Nieto et al., 2004; Hernández Almanza et al., 2014).

Como puede observarse en la Fig. 3.3, no hubo diferencias significativas en cuanto al crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, hasta 500 ppm. Sin embargo, cuando se utilizan 1000 ppm de imidazol, se observa una disminución del número de células obtenidas respecto del medio sin imidazol (control), (Fig. 3.3).



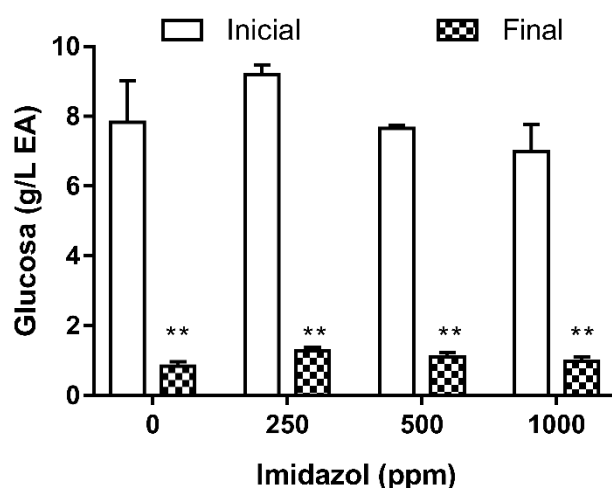
**Fig. 3.3.** Crecimiento normalizado (N/mL) de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, en medio control (0 ppm) y a diferentes concentraciones de imidazol (250, 500, 1000 ppm), luego de tres días de incubación. Los datos se expresan como la media  $\pm$  S.D. (n= 3). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Diferentes trabajos, demuestran que el imidazol, al menos en concentraciones bajas, no afectaría otras vías metabólicas que pudieran interferir en el desarrollo de los microorganismos carotenogénicos, como las implicadas en la obtención de nutrientes (Hernandez-Almanza et al., 2014; Bhosale, 2004; Choudhari et al., 2008; López-Nieto et al., 2004; Ninet et al., 1969). No obstante, para el hongo carotenogénico *Blakeslea trispora*, López-Nieto et al., (2004) reportan que concentraciones superiores a 800 ppm de imidazol, afectan negativamente el desarrollo del hongo y se reduce drásticamente la producción de licopeno. A su vez, Liu et al., (2019) observan la inhibición de la síntesis de los aminoácidos aspartato, tirosina, valina y leucina cuando la misma especie de hongo filamentoso, se desarrolla en medios con 1000 ppm de imidazol. Sin embargo, se detecta una mayor producción de ácidos grasos y galactosa.

Con respecto al efecto del imidazol sobre la viabilidad de levaduras carotenogénicas, Hernandez-Almanza et al. (2014) reportan que se inhibe el desarrollo de la cepa *Rh. glutinis* YB-252, cuando crece en medios con concentraciones de entre 375 y 500 ppm.

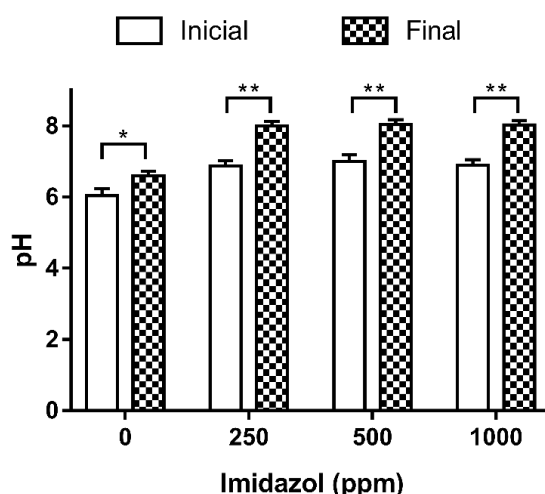
En cambio, los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que hubo desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, en un medio con una concentración mucho más elevada de imidazol (1000 ppm) (Fig. 3.3). Esto indicaría que nuestra cepa es más tolerante a la presencia del imidazol.

A pesar de encontrarse menor desarrollo en el medio con 1000 ppm de imidazol, no se encontraron diferencias significativas en el consumo de glucosa, respecto a los otros medios con imidazol (Fig. 3.4). En el medio sin imidazol aproximadamente el 90 % de la glucosa es consumida por la levadura, mientras que, en los medios con imidazol, se consume el 85 % de la misma.



**Fig. 3.4.** Concentración de glucosa Inicial y luego de 3 días en cultivo en medios con diferentes concentraciones de imidazol (Final). Las barras representan la media y el S.D. (n=3) \*\*p < 0,001 respecto de la condición inicial.

Con respecto al pH, el pH inicial fue ligeramente más alcalino en los medios con imidazol, debido a que este compuesto funciona como una base. Además, los valores de pH finales obtenidos cuando *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 crece en presencia del imidazol, fueron significativamente mayores en comparación a las muestras control (Fig. 3.5).

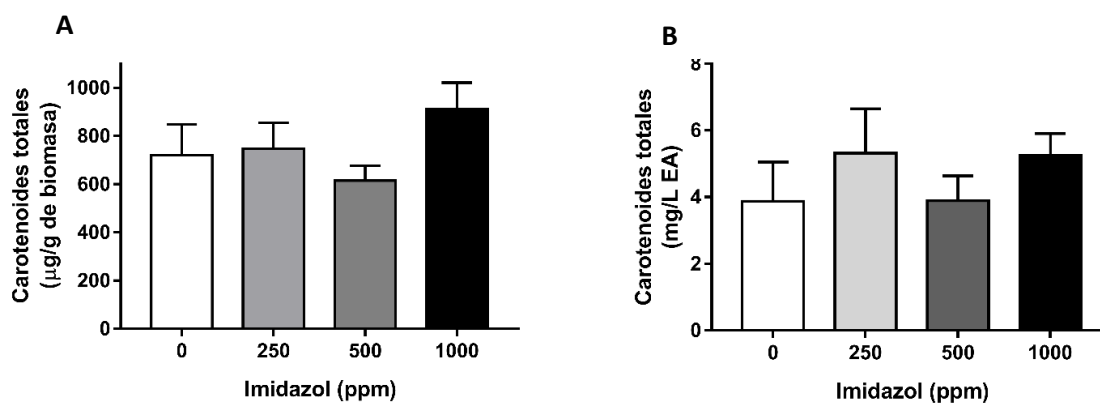


**Fig. 3.5.** Valores de pH en muestras control (0 ppm imidazol) y con imidazol (250, 500 y 1000 ppm), antes (barras blancas) y después (barras cuadrículadas) del crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 durante 3 días. Las barras muestran la media y el S.D. (n=3) \* $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ , respecto de la muestra inicial.

Estos valores de pH, coinciden con los reportados por López-Nieto et al. (2004), con el desarrollo a gran escala de *B. trispora*. Por otra parte, como se describió en el capítulo anterior (Fig. 2.9), el crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 también, altera el pH de los medios de cultivos analizados (AA y EAs), llevándolos a la alcalinidad. Este hecho, podría deberse a la descomposición durante el metabolismo celular de carbohidratos, la desaminación y descarboxilación de aminoácidos y proteínas, presentes en el medio de cultivo (Arévalo-Chávez, 1998).

Evaluamos luego, la producción de carotenos totales expresados como ( $\mu\text{g/g}$  de biomasa) y ( $\text{mg/L}$  de medio), que fueron sintetizados por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638. Como se observa en la Fig. 3.6 A-B, no se hallaron diferencias significativas en la producción específica total de carotenos. Esto indicaría que el imidazol no estaría inhibiendo la síntesis global de carotenos, coincidiendo con Hernandez-Almanza et al. (2014) en el análisis de *Rh. glutinis* YB-252 y con López-Nieto et al. (2004), Liu et al. (2019) y Elahi et

al. (1973), en el estudio de los hongos filamentosos carotenogénicos: *B. trispora* CBOM2014378(+), *B. trispora* F-816(+), y *Phycomyces blakesleeanus* C9, respectivamente.

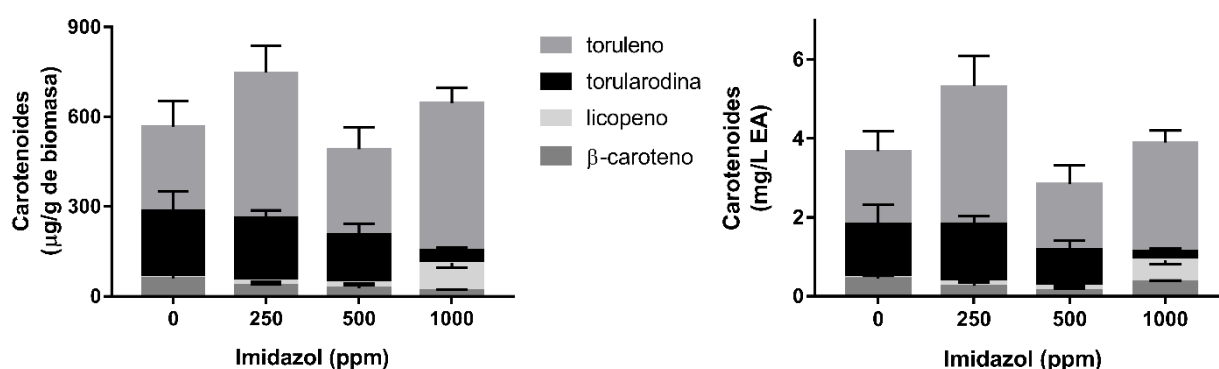


**Fig. 3.6.** Carotenos totales **A)** Expresados como (µg/ g biomasa). **B)** Expresados como (mg/L de EA), sintetizados en los EA 30% con diferentes concentraciones de imidazol.

Los resultados obtenidos previamente en este trabajo demostraron que no se detecta la síntesis de licopeno cuando *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 crece en los medios derivados del alperujo, (Fig. 2.15 y 2.17). Esto indicaría que el licopeno es convertido en los carotenoides subsiguientes de la vía metabólica ( $\beta$ -caroteno, toruleno, torularodina), (Fig. 3.1), como lo reportan numerosos trabajos (Tang et al., 2019; Elfeky et al., 2019; Cheng y Yang, 2016; Marova et al., 2012; Moliné et al., 2012; Maldonade et al., 2007; Frengova y Beshkova, 2008; Bhosale y Gadre, 2001; Margauth y Meydav, 1968).

Sin embargo, cuando se agrega imidazol al medio de cultivo, logramos detectar cantidades pequeñas, pero significativas de licopeno (Fig. 3.7 A-B). En los dos medios de menor concentración de imidazol (250 y 500 ppm), se obtuvieron 0,117 y 0,104 mg/L de licopeno, respectivamente. Mientras que, en el EA 30% adicionado con 1000 ppm se registraron 0,534 mg/L.

Los valores de licopeno que se obtuvieron en estos experimentos son inferiores en comparación a los hallados en otros trabajos. Así, Hernandez-Almanza et al., (2014) obtienen 6,82 mg/L de licopeno con *Rh. glutinis* a una concentración de imidazol de 250 ppm. Mientras que, el valor máximo obtenido en esta tesis fue de 0,534 mg/L y con 1000 ppm de imidazol (Fig. 3.7 A-B).

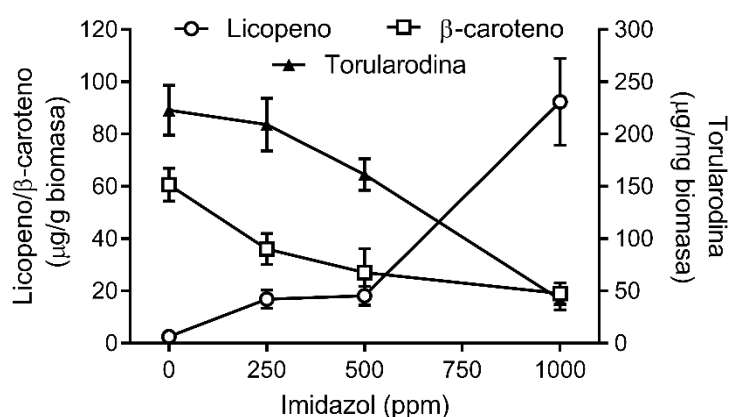


**Fig. 3.7.** Carotenos individuales **A)** Expresados en (µg/g). **B)** Expresados como (mg/L EA) sintetizados por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en medios con diferentes concentraciones de imidazol (0, 250, 500, 1000 ppm).

Por otro lado, Choudhari et al., (2008) y Liu et al., (2019), empleando *B. trispora*, también obtienen cantidades superiores de licopeno. De hecho, Choudhari et al., (2008) obtiene 115,15 mg/L de licopeno, con una concentración de 500 ppm de imidazol, y Liu et al., (2019) 911 mg/L, con 1000 ppm del inhibidor. Como se puede observar, las concentraciones de licopeno máximas que se hallaron en estos trabajos, varían entre sí en cuanto a la concentración de imidazol escogida. Sin embargo, ambos autores afirman que, incrementos superiores a 800 ppm en *B. trispora* generan, por un lado, una disminución significativa del licopeno sintetizado (aumentando la síntesis de β-caroteno) y, por otro lado, se ve reducido el desarrollo del hongo.

Por el contrario, López-Nieto et al., (2004) mencionan que utilizando concentraciones bajas del inhibidor (200-300 ppm) en *B. trispora*, la ruta biosintética no

se inhibe completamente por el imidazol, lo que permite una acumulación de otros carotenoides como,  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno. En este trabajo, se registra una concentración similar al control, de toruleno y torularodina, en los medios con 250 y 500 ppm de imidazol (Fig. 3.7 A-B y Fig. 3.8). La cantidad de  $\beta$ -caroteno, por el contrario, disminuye en estas condiciones. Toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno son productos finales de la ruta biosintética en *Rh. mucilaginoso* spp. que se generan luego de la ciclación del licopeno (Tang et al., 2019; Hernandez-Almanza et al., 2013; Buzzini et al., 2007; Margauth y Meydav, 1968). Esto indicaría que la inhibición sobre las enzimas licopeno ciclasas es muy baja y solo afecta parcialmente a la síntesis de  $\beta$ -caroteno.



**Fig. 3.8.** Concentración promedio de licopeno,  $\beta$ -caroteno y torularodina ( $\mu\text{g/g}$  de biomasa), producidas por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en muestras sin imidazol (concentración= 0 en las abscisas) y muestras con imidazol (250, 500 y 1000 ppm). Se grafica la media más S.D. (n=3). Círculos: licopeno, cuadrados:  $\beta$ -caroteno. triángulos: torularodina.

Sin embargo, cuando *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 se desarrolla en EA 30%, con una concentración de 1000 ppm de imidazol, la cantidad de torularodina producida es significativamente menor que en el control y disminuye aún más la de  $\beta$ -caroteno (Fig. 3.8). La disminución de torularodina sugeriría una menor hidroxilación y oxidación del toruleno, lo que se refleja en una mayor cantidad de este carotenoide (Fig. 3.7 A-B).



Además, la cantidad de licopeno es mayor (Fig. 3.8), demostrando la inhibición de la enzima licopeno ciclasa.

Es de destacar que no se logra una inhibición importante y, en consecuencia, no se acumula una cantidad tan elevada de licopeno como se esperaba (Liu et al., 2019; Hernández Almanza et al., 2014; López-Nieto et al., 2004; Bhosale, 2004; Ninet et al., 1969). Estos resultados indicarían que la cepa *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 cuando se desarrolla en EA 30%, no sería eficiente para la producción de licopeno, a pesar de ser capaz de crecer con elevadas concentraciones de imidazol.

Por último, las variaciones en relación al rendimiento en la producción de licopeno halladas en este trabajo, en comparación a las registradas en la bibliografía (Liu et al., 2019; Hernandez-Almanza et al., 2014; Pegklidou et al., 2008; López-Nieto et al., 2004; Elahi et al., 1973; Ninet et al., 1969), podrían deberse por un lado, a la utilización de diferentes microorganismos carotenogénicos (como ser, hongos filamentosos, microalgas y levaduras de especies distintas); y por otro lado, al empleo de medios cultivo de diferente naturaleza, respecto a los medios derivados del alperujo, (por ejemplo, medios sintéticos).

### 3.3. Conclusiones parciales

- No se hallaron diferencias significativas en cuanto al crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, entre el EA 30% sin imidazol y con 250 y 500 ppm de imidazol. A 1000 ppm de imidazol se ve una disminución del crecimiento de la levadura.

- La levadura alcalinizó los medios con y sin imidazol, siendo el efecto más marcado en los medios con imidazol. El consumo de glucosa fue similar en todos los medios.
- En cuanto a la producción de licopeno la mayor cantidad de este caroteno ( $92,4 \pm 16,6 \mu\text{g/g}$  de biomasa) se obtuvo en el medio de mayor concentración de Imidazol (1000 ppm). Sin embargo, la cantidad máxima obtenida de este caroteno fue muy inferior en comparación a la hallada en la bibliografía consultada.
- Se comprueba que, al elevar la concentración del inhibidor, disminuye la concentración de  $\beta$ -caroteno, con el concomitante aumento de la cantidad de licopeno sintetizado. Por lo tanto, la producción de licopeno fue a expensas de la disminución de  $\beta$ -caroteno.
- Si bien las concentraciones crecientes de imidazol generaron el aumento en la síntesis de licopeno en *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, las cantidades de este carotenoide halladas fueron bajas. Esto indicaría que esta cepa no sería adecuada para la producción de licopeno en las condiciones ensayadas.

### 3.4. Bibliografía

- Berman, J., Zorrilla-Lopez, U., et al. «Nutritionally important carotenoids as consumer products.» *Phytochem Rev.*, 2014: 1-17.
- Britton, G., & Liaaen-Jensen, S. *Carotenoids*. Vol. 3. Boston, 1998.
- Buzzini, P., Innocenti, M., et al. "Carotenoids Profiles of yeast belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*." *Can. J. Microbiol.*, no. 53 (2007): 1024-1031.
- Choudhari, S.M., Ananthanarayan, I., et al. "Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of  $\beta$ -carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896." *Bioresource Technology*, no. 99 (2008): 3166–3173.
- Dias-Rodrigues, T.V., Amore, T.D., et al. "Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts." *Food Technology & Biotechnology* 3, no. 57 (2019): 388-398.
- Domínguez, J. R., Soler, C., et al. «Síntesis de imidazoles 2,4,5-trisustituídos por el método de Davidson.» *Revista Cubana de Química*. XVII, nº 3 (2005): 187.
- Elahi, M., Chichester, C.O., et al. "Biosynthesis of carotenoids by *Phycomyces blakesleeanus* mutants in the presence of nitrogenous heterocyclic compounds." *Phytochemistry*. (Pergamon Press.) 12 (febrero 1973): 1627- 1632.
- Efkey, N., Elmahmoudy, M., et al. "Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* with a Combined Cultivation Mode of Nitrogen, Sulfur, and Aluminium Stress." *Applied sciences*, no. 9 (2019): 2-19.
- Farkas, A., & Bencsik, T. "Carotenoids as food additives." Chap. 17 in *Pigments from Microalgae Handbook.*, by E., & Queiroz, M.I. Lopes, 635. Cham.: Springer, 2020.
- Frengova, G.I., & Beshkova, D.M. "Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, 2008: 1-43.
- Ghilardi, C., Sanmartín-Negrete, P., Carelli, A.A., & Borroni, M.V. "Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*." *Bioresour. Bioprocess.* 7, no. 52 (2020): 2-11.
- Gong, M., & Bassi, A. "Carotenoids from microalgae: A review of recent developments." *Biotechnology Advances.*, no. 34 (2016): 1396-1412.
- Hernández-Almanza A., J.C. Montaneza, M.A. Aguilar González, Martínez-Avila, C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. "*Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry." *Food Bioscience* 5 (2014): 64-72.
- Hernández-Almanza A., Montaneza, J.C., et al. "*Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry." *Food Bioscience* 5 (2013): 64-72.

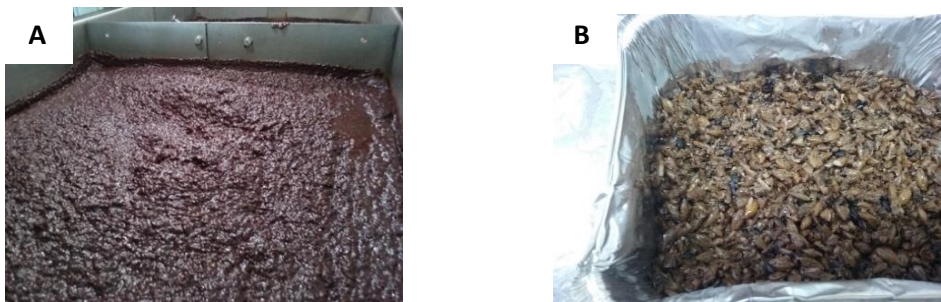
- Hernández-Gras, F., de Pourcq, K., et al. «Biosíntesis y acumulación de carotenoides en el fruto de tomate.» Cap. 11 de *Carotenoides en agroalimentación y salud.*, de Meléndez-Martínez, 710. Sevilla: Editorial Terracota, Mexico., 2017.
- Hsiao, G., Tsong, H., et al. "A Potent Antioxidant, Lycopene, Affords Neuroprotection Against Microglia Activation and Focal Cerebral Ischemia in Rats." *International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug research.*, no. 18 (2004): 351-356.
- Li, L., Z., Liu, Z., et al. «Biotechnological production of lycopene by microorganisms.» *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 2020: 18.
- Libkind, D., & van Broock, M. "Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeast." *World Journal of Microbiology & Biotechnology.*, 2006: 687-692.
- Liu, Y., Li, X., et al. "Comparative Metabolic Responses Induced by Pyridine and Imidazole in *Blakeslea trispora*." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 7 (2019): 347.
- López-Nieto, M. J., Costa, J., et al. «Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*.» *Applied microbiology and biotechnology.* 2, nº 66 (2004): 153-159.
- Luo, W., Gong, Z., et al. "A Negative Regulator of Carotenogenesis in *Blakeslea trispora*." *Applied and Environmental Microbiology.* 86, no. 6 (2020): e02462-19.
- Margauth, P., & Meydav, S. "Some observations on the carotenogenesis in the yeast *Rhodotorula mucilaginoso*." *Phytochemistry.* 7, no. 5 (1968): 761-766.
- Marova, M., Carnecka, A., et al. «Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production.» *Journal of Environmental Management* 95 (2012): 338-342.
- Meléndez-Martínez, A.J. «Carotenoides: Estructura, Propiedades y Funciones.» Cap. 1 de *Carotenoides en agroalimentación y salud.*, de A.J. Meléndez-Martínez, 12-31. Madrid: Editorial Terracota, SA de CV., 2017.
- Moliné, M. Libkind, D. & van Brook, M. "Production of Torularhodin, Torulene, and  $\beta$ -Carotene by *Rhodotorula* yeast." Chap. 13 in *Microbial Carotenoids from fungi. Methods and Protocols.*, by J.L. Barredo, 285. León: Springer, 2012.
- Nigam, P.S. & Luke, J.S. "Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties." *Current Opinion in Food Science.*, no. 7 (2016): 93–100.
- Ninet, L., Renaut, J., et al. "Activation of the Biosynthesis of Carotenoids by *Blakeslea trispora*." *Biotechnology and Bioengineering.* XI (1969): 1195-1210.
- Panesar, R., Kaur, S., et al. "Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review." *Food Science (issue on Food bioprocessing)*, no. 1 (2015): 70-76.
- Pegklidou, K., Mantzouridou, F., et al. "Lycopene Production Using *Blakeslea trispora* in the Presence of 2-Methyl Imidazole: Yield, Selectivity, and Safety Aspects." *J. Agric. Food Chem.*, no. 56 (2008,): 4482–4490.
- Silva, W., Maia, F., et al. "Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review." *Int. J. Mol. Sci.*, no. 22 (2021): 22.

- Srivastava, S. & Srivastava, A.K. "Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters." *J Food Sci Technol.*, 2013.
- Sun, T., Tadmor, Y., et al. *Pathways for Carotenoid Biosynthesis, Degradation and storage*. Vol. 1, chap. 1 in *Plant and Food Carotenoids, Methods and Protocols.*, by M. & Welsch, R. Rodríguez-Concepción, 421. Hatfield, Hertfordshire: Humana press, 2018.
- Tang, W., Wang, Y., et al. "Biosynthetic Pathway of Carotenoids in Rhodotorula and Strategies for enhanced Their Production." *J. Microbiol. Biotechnol.* 4 , no. 29 (2019): 507–517.
- Thakur, M., & Azmi, W. "Nutraceutical beta-carotene from natural non conventional sources and its applications. ." *ANNALS OF PHYTOMEDICINE-AN INTERNATIONAL JOURNAL.* 1, no. 2 (2013): 59-73.
- UE., Servicio de Información Comunitario sobre Investigación y Desarrollo (CORDIS). *Resultados de Investigaciones de la UE*. Enero de 2020. <https://cordis.europa.eu/article/id/413241-bringing-a-healthy-antioxidant-found-in-tomatoes-to-a-global-market/es> (último acceso: 26/03/2021).
- Varma, G.G., Seth, P., et al. "Isolation and evaluation of antifungal activity of the semi synthetic derivates of lycopene." *Int. J. Adv. Res.* 2, no. 8 (2020): 454-464.
- Xu, F., & Qi-Peng, Y.Z. "Improved production of lycopene and b-carotene by *Blakeslea trispora* with oxygen-vectors." *Process Biochemistry* , no. 42 (2007): 289-293.
- Zoz, L., Carvalho, J.C., et al. "Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics a Review." *Brazilian archives of Biology and technology.* 58, no. 2 (2015): 278-288.

Capítulo 4: Desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG)

#### 4.1. Introducción

El alperujo y el bagazo de cebada cervecera (BSG, del inglés *brewer's spent grain*) (Fig. 4.1 A-B), son ejemplos de residuos agroindustriales y se los considera subproductos de la industria olivícola y cervecera, respectivamente (Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Rodríguez et al., 2020; Berbel et al., 2018; Morillo et al., 2009).

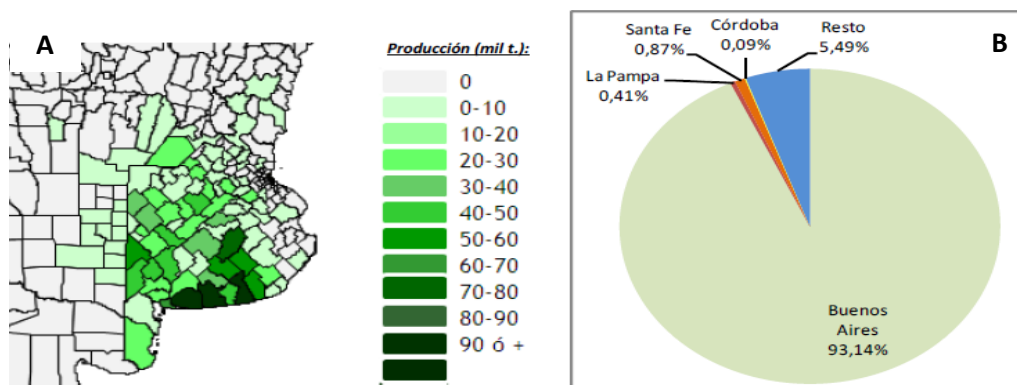


**Fig. 4.1.** **A)** Alperujo generado durante el procesamiento de las aceitunas para la obtención del aceite de oliva, utilizando el sistema de extracción bifásico. **B)** Granos de cebada agotados (BSG), generado luego del proceso de obtención de la cerveza.

Ambos desechos lignocelulósicos, presentan un gran potencial en cuanto a sus diferentes opciones de transformación (Rodríguez et al., 2021; Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Rodríguez et al., 2020; Zuorro et al., 2019; Ministerio de Agricultura, 2018; Ravindran et al., 2018; Borroni et al., 2017; Socaci et al., 2017; Aliyu y Bala, 2011; Lynch et al., 2016; Schneider et al., 2013; Kotlar et al., 2013; McCarthy et al., 2013). De esta manera, se constituyen como ejemplos de biomasa residual con un gran potencial de reutilización (Coremberg, 2019).

La cebada (*Hordeum vulgare* L.), es un cereal de cultivo extensivo y se lo utiliza, principalmente, para la industria cervecera tanto a nivel nacional como internacional (Bolsa de Cereales Bahía Blanca, 2021; Esteban-Torrente, 2019; Ministerio de Agricultura, 2018; Lynch et al., 2016; Miravalles, 2016; Ablin, 2014; Kotlar et al., 2013).

Sus componentes dan origen al BSG, en el final del proceso de fabricación de la cerveza (Rodríguez et al., 2020; Potes-Vecini et al., 2020; Ministerio de Agricultura, 2018). Argentina produce, aproximadamente, 4 millones de toneladas de cebada de las cuales el 80% se exporta (Latinoamérica y medio Oriente) y el 20% restante, se destina al mercado interno (Bolsa de Cereales Bahía Blanca, 2021; Berlingeri, 2020; Miravalles, 2016). Es importante destacar que, el 94% de la producción de este cereal proviene de la provincia de Buenos Aires, y en menor proporción, de Santa Fe, La Pampa y Córdoba (Fig. 4.2 A-B), (Berlingeri, 2020; Miravalles, 2016).

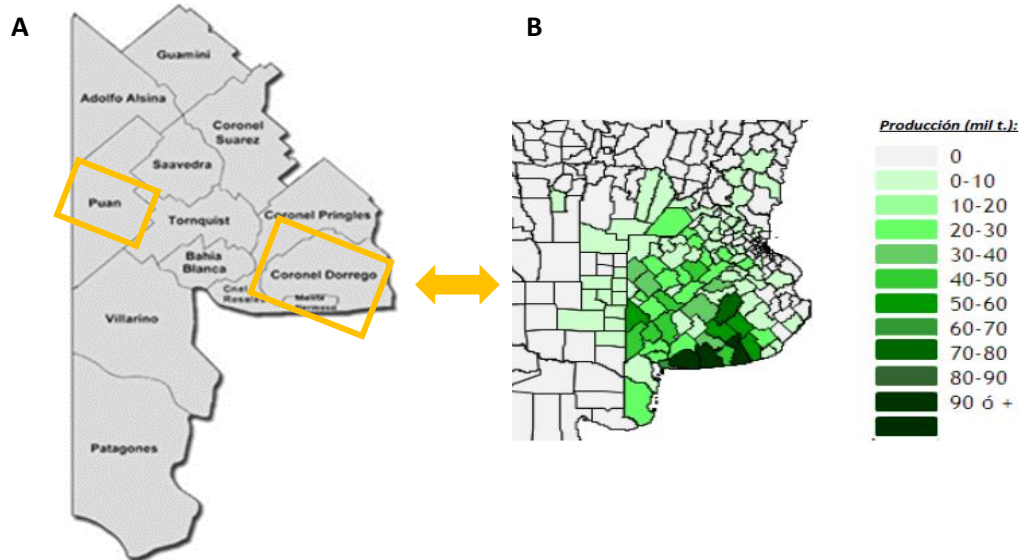


**Fig. 4.2.** A) Producción de cebada cervecera (mil t.), en los diferentes partidos de la Provincia de Bs.As. B) Proporción de cebada cultivada, expresada en porcentaje, comparando la provincia de Bs. As con otras provincias productoras de este cereal. (Miravalles, 2016).

En particular, el sudoeste bonaerense (SOB) posee una gran relevancia en lo que se refiere al cultivo de cebada cervecera (Bolsa de Cereales Bahía Blanca, 2021; Martínez, 2015). Tal es así, que la producción de este *commoditie* representó, en la campaña 2020/21, el 60% del total nacional (Bolsa de Cereales Bahía Blanca, 2021) y, por lo tanto, se lo puede considerar como un cultivo distintivo de esta región junto con el trigo (*Triticum aestivum* L.), (Bolsa de Cereales Bahía Blanca, 2021; Red Nacional de Cebada Cervecera, 2021; Martínez, 2015).



Además, las áreas destinadas al cultivo de cebada y a olivicultura coexisten en esta región (Fig. 4.3 A-B), (Red Nacional de Cebada Cervecera, 2021; Bolsa de Cereales Bahía Blanca, 2021; Ceci et al., 2019; Miravalles, 2016; González et al., 2016; Aguirre et al., 2014).



**Fig. 4.3.** Localización de las áreas destinadas a la olivicultura (A) y a cebada cervecera (B), en el SOB. Diagramas adaptados de (IOC, 2012) y (Miravalles, 2016), respectivamente.

En Argentina, la industria cervecera es una de las primeras 10 agroexportadoras (Berlingeri, 2020). Respecto al mercado interno, se producen unos 2 mil millones de litros de cerveza por año (Berlingeri, 2020). A su vez, se calcula que el consumo promedio durante el período comprendido entre 2011 a 2020, fue de 41 a 45 litros de cerveza per cápita (Berlingeri, 2020; Ablin, 2014).

Existen dos secciones en el proceso de elaboración de la cerveza: por un lado, la producción de malta (que es la materia prima fundamental), producida a partir de la cebada cervecera y, por otro lado, la producción de la cerveza que constituye el producto final del proceso (Ablin, 2014).

La etapa de malteo, depende de una fase biológica (proceso de germinación controlado) en el que se obtiene la malta (Esteban-Torrente, 2019; Lynch et al., 2016; Miravalles, 2016; Pereyra-Iraola et al., 2013).

En esta etapa, el endospermo del grano se degrada enzimáticamente, lo cual resulta en la liberación de distintos compuestos como: carbohidratos fermentables (maltosa y maltotriosa) y no fermentables (dextrinas), además de proteínas solubles, polipéptidos y aminoácidos (Lynch et al., 2016; Miravalles, 2016; Pereyra-Iraola et al., 2013). Luego, a la cebada malteada se le agrega lúpulo y después, es sometida a un proceso de cocción y maceración (Fig. 4.4, Esteban-Torrente, 2019; Lynch et al., 2016; Pereyra-Iraola et al., 2013).



**Fig. 4.4.** Proceso de fabricación de la cerveza donde se observan las distintas etapas y la generación del BSG (Lynch et al., 2016).

El mosto resultante de este proceso, atraviesa una etapa de fermentación por acción de las levaduras del género *Saccharomyces*, dando como resultado el producto final que es la cerveza (Fig. 4.4), (Esteban-Torrente, 2019; Ministerio de Agricultura, 2018; Lynch et al., 2016; Ablin, 2014; Pereyra-Iraola et al., 2013; Código Alimentario

Argentino, 1969). Finalmente, el grano de cebada agotado, conforma el residuo denominado BSG, (Lynch et al., 2016). Este subproducto, es insoluble y está constituido principalmente, por el recubrimiento del grano de cebada (Rodríguez et al., 2020; Ravindran et al., 2018; Lynch et al., 2016; Aliyu y Bala, 2011).

En la industria, el BSG constituye el residuo más abundante dentro del ciclo de producción de la cerveza, representando alrededor de un 85% del total, mientras que el 20% restante lo conforman las levaduras y el lúpulo agotado (Rodríguez et al., 2020; Ministerio de Agricultura, 2018; dos Santos et al., 2014; Kotlar et al., 2013; Aliyu y Bala, 2011).

Se calcula que, por cada 100 litros de cerveza elaborada se producen entre 14 a 20 kg de BSG (Rodríguez et al., 2020; Ravindran et al., 2018). Por otra parte, la composición de este subproducto puede cambiar según la variedad y madurez del grano, la época de cosecha, las condiciones de malteado y maceración, o la calidad y el tipo de complementos que se agregan durante el proceso de elaboración (Rodríguez et al., 2020; Zuorro et al., 2019; dos Santos et al., 2014; Lynch et al., 2011; Aliyu y Bala, 2011; Robertson et al., 2010; Driessen y Vereijken, 2003). De esta manera, el BSG constituye un residuo de composición variable y heterogénea (Lynch et al., 2016; Aliyu y Bala, 2011).

Al igual que el alperujo, el BSG es de naturaleza lignocelulósica (Ravindran et al., 2018; Ntougias et al., 2013). El 70% de su composición son fibras: celulosa (15-20%), hemicelulosas (28-35%) y lignina (28%). Además, presenta elevado contenido de agua (70-80%), contiene lípidos (2-10%) y proteínas (19-30 %), entre las que se encuentran las hordeínas, glutelinas, globulinas y albúminas (Fig. 4.5), (Rodríguez et al., 2020;

Ravindran et al., 2018; Ministerio de Agricultura, 2018; Lynch et al., 2016; dos Santos et al., 2014; Kotlar et al., 2013; Aliyu y Bala, 2011). Los aminoácidos esenciales representan aproximadamente un 30% del contenido total de las mismas, siendo el más numeroso la lisina (~ 14,3%), (Zuorro et al., 2019; Lynch et al., 2016). La presencia en grandes cantidades de este aminoácido es peculiar, ya que la mayoría de los cereales presentan una deficiencia del mismo (Zuorro et al., 2019).

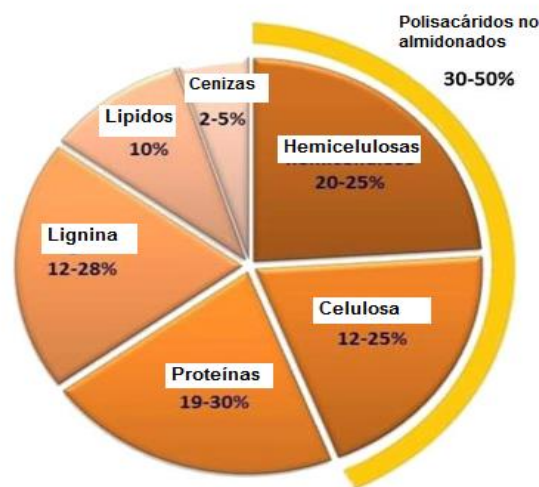


Fig. 4.5. Composición del BSG en porcentaje (Lynch et al., 2016).

Por otra parte, los monosacáridos más abundantes en el BSG son, xilosa, glucosa y arabinosa. Aunque también se han encontrado trazas de ramnosa y galactosa (Lynch, et al. 2016; Aliyu y Bala, 2011). A su vez, contiene una variedad de minerales entre los que se encuentran silicio, fósforo y calcio (Lynch et al., 2016; dos Santos et al., 2014; Aliyu y Bala, 2011; McCarthy et al., 2011) y vitaminas como biotina, colina, ácido fólico y riboflavina (dos Santos et al., 2014; McCarthy, et al. 2013; Aliyu y Bala, 2011).

Como resultado de su composición, este residuo presenta una amplia gama de aplicaciones, por ejemplo, como ingrediente funcional para alimentos destinados a nutrición humana y animal y como fuente de productos bioactivos (Rodríguez et al.,

2020 et al.; Ravindran et al., 2018; Ministerio de Agricultura, 2018; Socaci et al., 2017; Lynch et al., 2016; dos Santos et al., 2014; Kotlar et al., 2013; Aliyu y Bala, 2011). Incluso, se lo analiza para ser empleado en la generación de energía y biocombustibles (Rodríguez et al., 2020; Ravindran et al., 2018; Ministerio de Agricultura, 2018; dos Santos et al., 2014).

Por otro lado, varios autores han demostrado la viabilidad de utilizar el BSG como medio de cultivo para el crecimiento de bacterias y ciertos tipos de hongos (Lynch et al., 2016; Aliyu y Bala, 2011; Xiros et al., 2008). En cuanto a las bacterias, se han empleado especies de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Lactobacillus* para la producción de enzimas ( $\alpha$ -amilasas, celulasas y hemicelulasas) y también, de ácido láctico (Kotlar et al., 2013; Hashemi et al., 2011; Sz wajgier et al., 2010;). Además, se logró el desarrollo de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Grifola* y *Ganoderma*, con el fin de producir enzimas lignocelulósicas (Cuestas, 2019; Palazzolo et al., 2019; Martínez, 2016; Postemsky y Curvetto, 2015; Saparrat et al., 2008; Godliving y Mtui, 2009; Kuhar et al., 2008). De esta manera, el BSG constituiría un buen sustrato para el cultivo de microorganismos (Lynch et al., 2016). De hecho, debido a su alto contenido de azúcares, se descompone rápidamente por la actividad microbiana si no se lo procesa y almacena adecuadamente (Lynch et al., 2016; Robertson et al., 2010).

El desarrollo microbiano sobre sustratos sólidos ocurre sobre o dentro de las partículas de la matriz. Por lo tanto, la principal diferencia entre el cultivo en medio sólido y el líquido, es la ausencia de agua libre (Lizardi-Jiménez y Hernández-Martínez, 2017; Manpreet et al., 2005; Lonsane et al., 1985). Por lo general, los microorganismos utilizados en el cultivo en medio sólido, suelen ser hongos filamentosos, principalmente

Capítulo 4. Desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG).

de los géneros: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Pleurotus*, *Mortierella* y *Fusarium*, (Cuestas, 2019; Lizardi-Jiménez y Hernández-Martínez, 2017; Postemsky y Curvetto, 2015; Manpreet et al., 2005; Pandey, 1992). También, se utilizan levaduras de los géneros: *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Torulopsis*, y ciertas bacterias como, *Lactobacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, y *Bacillus spp.*, (Lizardi-Jiménez y Hernández-Martínez, 2017; Lopes et al., 2016; Paredes-López et al., 1991; Roadjanakamolson y Suntornsuk, 2010; Manpreet et al., 2005; Pandey, 1992).

Los hongos filamentosos y levaduras son más eficaces que las bacterias para desarrollarse en medios sólidos, debido a su capacidad para crecer en sustratos con bajo contenido de agua (Manpreet et al., 2005). A su vez, los hongos filamentosos se adaptan mejor a este tipo de medios, en comparación a las levaduras, por su capacidad de penetración en el interior del sustrato sólido a través de su estructura micelial, y la posibilidad de liberar enzimas hidrolíticas (Manpreet et al., 2005; Curtis, 2001; Pandey, 1992).

La técnica de cultivo sobre medios sólidos, presenta ventajas frente a la de medios líquidos (Manpreet et al., 2005; Paredes-López et al., 1991; Pandey, 1992), ya que es sencilla de implementar, debido a que no necesita de equipos complejos o sistemas de control sofisticados (Postemsky y Curvetto, 2015; Roadjanakamolson y Suntornsuk, 2010; Paredes-López et al., 1991; Pandey, 1992). En consecuencia, requieren una baja inversión de capital (Chilakamarry et al., 2022; Paroldi et al., 2018; Pandey, 1992; Lonsane et al., 1985). Además, los procesos microbianos que ocurren en estos medios, se dan de manera semejante a los de la naturaleza (Paroldi et al., 2018; Postemsky y

Curvetto, 2015; Manpreet et al., 2005; Paredes-López et al., 1991; Pandey, 1992; Lonsane et al., 1985).

Sin embargo, esta técnica de cultivo microbiano, también posee desventajas (Paredes-López et al., 1991; Lonsane et al., 1985). Es decir, ofrece un menor rendimiento del producto microbiano que se desea obtener, lentitud en el proceso de crecimiento/fermentación, acumulación de calor, contaminación biológica, falta de sensores adecuados y de técnicas eficientes de manejo de sólidos, problemas en el escalado y restricciones para la medición del crecimiento de los microorganismos (Manpreet et al., 2005; Paredes-López et al., 1991; Pandey, 1992; Lonsane et al., 1985). No obstante, en estas últimas décadas surgieron nuevas investigaciones que aportan más información y comprensión, de los aspectos fundamentales para esta forma de cultivo. Las mismas se asocian a los efectos de transferencia de calor y masa, la modelización matemática, el diseño de biorreactores y sistemas de control específicos (Chilakamarry et al., 2022; Kumar et al., 2021; Banat et al., 2021; Pandey, 2003).

A pesar de estos avances, aún se necesita un mayor desarrollo en la modelización, con el fin de permitir el escalado de la técnica, (Chilakamarry et al., 2022; Kumar et al., 2021; Manpreet et al., 2005; Pandey, 2003). De esta manera, se podría desarrollar como una tecnología viable y equiparable, en términos de rendimiento, a la producción microbiana en medios líquidos (Kumar et al., 2021; Pandey, 2003). Como consecuencia, el cultivo en medio sólido aún está acotado a trabajos experimentales o a escala de laboratorio, (Cuestas, 2019; Hussein et al., 2018; Feroso et al., 2018; Kuhar et al., 2018; Lopes et al., 2016; Lynch et al., 2016; Panesar et al., 2015; Sánchez-Sánchez, 2020;

Schneider et al., 2013; Roadjanakamolson y Suntornsuk, 2010; Manpreet et al., 2005; Pandey, 2003).

En los medios sólidos, los sustratos empleados pueden ser sintéticos o naturales; siendo estos últimos, más baratos y sencillos de conseguir (Manpreet et al., 2005; Pandey, 1992). Un ejemplo lo constituyen los subproductos agroindustriales (lignocelulósicos y amiláceos), como: bagazo de cebada y caña de azúcar, salvado de arroz y trigo, orujo de uva, alperujo, astillas de madera de aserradero (Ej. *Pinus radiata* D. Don, *Populus nigra* L.), cáscaras de semillas de girasol, rastrojos de maíz, algodón y sorgo (Bidegain et al., 2019; Cuestas, 2019; Hussein et al., 2018; Feroso et al., 2018; Kuhar et al., 2018; Lizardi-Jiménez y Hernández-Martínez, 2017; Socaci et al., 2017; Lopes et al., 2016; Cheng y Yang, 2016; Sánchez-Sánchez, 2020; Postemsky y Curvetto, 2015; Panesar et al., 2015; Aliyu y Bala, 2011; Xiros et al., 2008; Roadjanakamolson y Suntornsuk, 2010; Manpreet et al., 2005; Pandey, 1992; Paredes-López, et al., 1991).

No obstante, estos residuos pueden diferir en sus propiedades (Ej.: la naturaleza química de sus componentes y la capacidad de retención de agua), lo que afecta directamente al crecimiento de los microorganismos (Lopes et al., 2016). En consecuencia, la combinación de residuos agroindustriales, puede compensar la falta de determinados nutrientes y contrarrestar la concentración de compuestos químicos antimicrobianos como, taninos, biofenoles y sales (Cuestas 2019; Lopes et al., 2016; Postemsky y Curvetto, 2015), permitiendo un mejor desarrollo y rendimiento de los microorganismos de interés.

En vista de que el BSG es un desecho lignocelulósico como el alperujo, se decidió analizarlos en conjunto, como medios de cultivo sólidos para el desarrollo de la levadura



*Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638. Teniendo en cuenta que el alperujo constituye una matriz de consistencia y cualidades fisicoquímicas complejas (Ntougias et al., 2013; Ouzounidou et al., 2010; Albuquerque et al., 2004) y el BSG presenta una composición de nutrientes más balanceada, una menor concentración de compuestos antimicrobianos y una consistencia más porosa (Rodríguez et al., 2020; Ravindran et al., 2018; dos Santos et al., 2014; Lynch et al., 2016). La combinación de ambos subproductos, podría ser adecuada para el desarrollo y producción de carotenoides en *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638.

### Objetivo General

Evaluar el potencial del Alperujo y del BSG, como sustratos sólidos para el crecimiento y producción de pigmentos carotenoides por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638

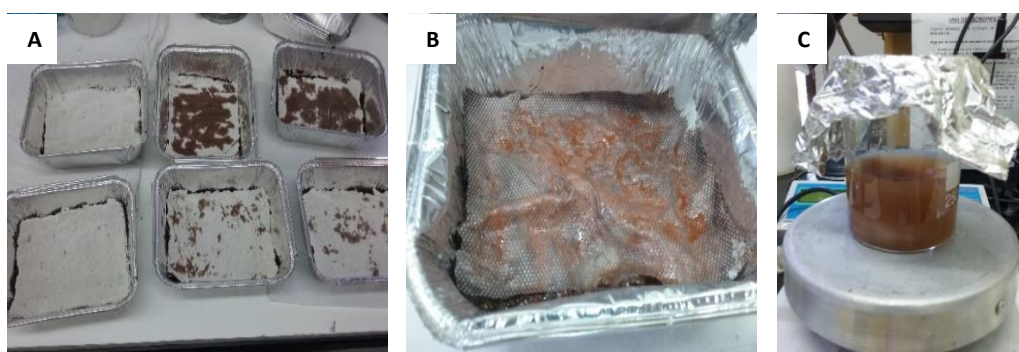
### Objetivos específicos

- Desarrollar un sistema de cultivo en estado sólido para *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638 sobre BSG, Alperujo y una mezcla de ambos sustratos.
- Evaluar la producción de pigmentos carotenoides por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 desarrollada sobre un sistema sólido basado en Alperujo, BSG y una mezcla de ambos sustratos.

## 4.2. Resultados y Discusión

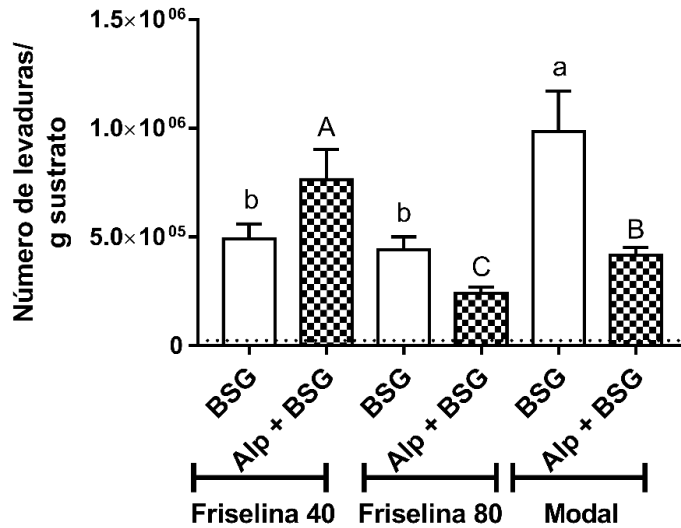
### 4.2.1. Desarrollo de *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638

En los medios sólidos, las bacterias y levaduras crecen sobre la superficie del sustrato, mientras que los hongos filamentosos penetran a través del mismo, mediante sus micelios (Manpreet et al., 2005; Curtis, 2001; Pandey, 1992). Es por esta razón que, para poder recuperar las levaduras en forma limpia para la extracción de los carotenoides, evaluamos primero, diferentes telas como soporte para las mismas. Los géneros que se utilizaron fueron: Friselina de 80 g, Friselina de 40 g y Modal (Fig. 4.6 A-B-C), las cuales fueron probadas sobre alperujo (Alp), Bagazo de cebada (BSG) y la mezcla Alperujo + Bagazo (Alp + BSG). Las características de las mismas, se describieron en la sección Materiales y Métodos, 1.11 Desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre alperujo y bagazo de cebada.



**Fig. 4.6. A)** Bandejas con los diferentes sustratos analizados: Alperujo, Bagazo y Alperujo + Bagazo, cada una con las telas examinadas (Friselina 40, Friselina 80 y Modal), antes de ser esterilizadas. **B)** Bandeja con la mezcla Alperujo y Bagazo (Alp + BSG) con desarrollo de la levadura. **C)** Recuperación de la biomasa crecida mediante lavado del soporte con agua y agitación.

Como se observa en la Fig. 4.7, en el BSG la tela que permitió el mejor crecimiento fue el Modal. El BSG es un sustrato granulado, lo que dificulta la adhesión del soporte y la difusión de nutrientes. Sin embargo, en el caso del modal, tela más blanda y maleable, este efecto se ve disminuido, lo que explicaría el mayor crecimiento. Por otra parte, no hubo diferencias entre las distintas Friselinas.

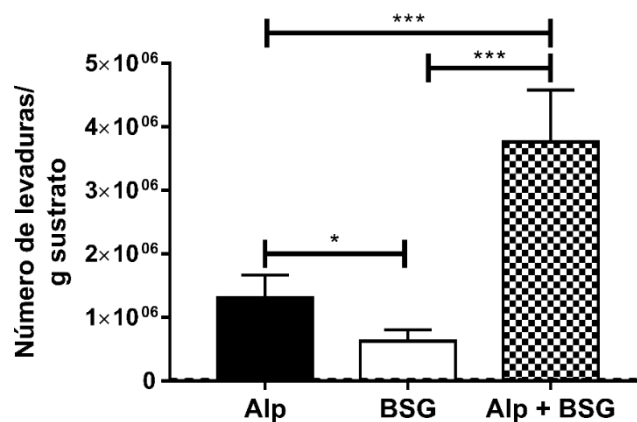


**Fig. 4.7.** Crecimiento de las levaduras (N/g sustrato) en diferentes telas sobre los distintos sustratos. BSG: Bagazo, Alp+BSG: Alperujo + Bagazo. Las barras muestran la media y el S.D. (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas.  $p < 0,05$ . La línea punteada indica la cantidad inicial de levaduras sembradas.

A su vez, la Friselina 80 presentó dificultades tanto para humedecerse, como para desprender las levaduras, debido a su mayor grosor, lo que determinó un menor crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, sobre todo, en la mezcla Alp + BSG (Fig. 4.7). Además, durante los lavados, las colonias de la levadura, se recuperaban con mayor dificultad, en comparación a las telas Friselina 40 y Modal.

En conclusión, las telas que permitieron el mejor crecimiento y desprendimiento de las levaduras fueron, Modal y Friselina 40. En ambas, los nutrientes presentes en el sustrato pudieron difundir y ser accesibles a la levadura para su consumo. Además, la característica de ambos géneros permitió extraer fácilmente la biomasa desarrollada. Sin embargo, en el caso del Modal, se observó alguna percolación de la levadura hacia el sustrato, debido a su entramado más abierto, en comparación a la Friselina 40. Se evaluó entonces, el crecimiento y producción de carotenoides en Alperujo, BSG y la combinación de ambos sustratos, en cantidades iguales, empleando Friselina 40, como soporte de crecimiento.

El crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, fue mayor en la mezcla Alp + BSG, que en los sustratos individuales (Fig. 4.8). En comparación al alperujo, el BSG es muy rico en azúcares, presenta una composición más balanceada de nutrientes y una menor concentración de compuestos inhibidores (sales y polifenoles) (Rodríguez et al., 2020; Ravindran et al., 2018; Ouzounidou et al., 2010; Morillo et al., 2009). Sin embargo, como se mencionó previamente, su granulometría dificulta la accesibilidad de los nutrientes a las levaduras, lo que se traduciría en un menor crecimiento (Fig. 4.8).



**Fig. 4.8.** Crecimiento de las levaduras sobre los distintos sustratos. Las barras muestran la media y el S.D. (n = 3). \* p<0,05, \*\*\* p<0,001. La línea punteada indica la cantidad inicial de levaduras sembradas.

El alperujo por otro lado, tiene una composición desfavorable para el desarrollo de microorganismos ya que, entre otros factores, contiene escasa concentración de nitrógeno y alta concentración de compuestos antimicrobianos, como los compuestos fenólicos (Lopes et al., 2016; Albuquerque et al., 2009; Morillo-Perez, 2007; Vylissides et al., 1998). Sin embargo, su estructura semisólida favorecería la transferencia de masa hacia el soporte de la levadura. De esta manera, la mezcla de ambos sustratos combinaría los beneficios de cada uno. Es decir, la consistencia del alperujo y el contenido de nutrientes del BSG (particularmente carbohidratos), lo que determinaría un mayor crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638.

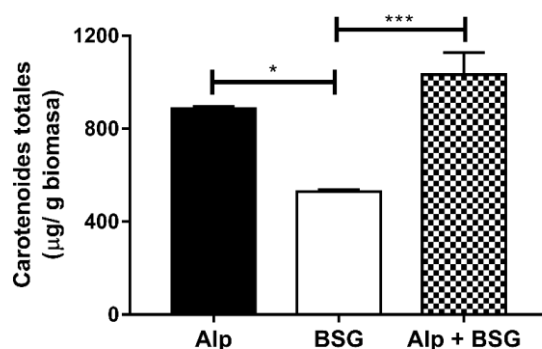
En relación con los resultados obtenidos, Lopes et al. (2016) corroboraron esta hipótesis al combinar alperujo y salvado de trigo (capa exterior del grano, obtenida luego de la molienda). De esta manera, comprueban que la mezcla de ambos subproductos agroindustriales mejora el desarrollo y la biosíntesis de lipasas, en la cepa de levadura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50862. Es decir, ambos residuos lignocelulósicos tienen efectos complementarios cuando son utilizados en proporciones iguales, la combinación aligera la concentración de compuestos fenólicos provenientes del alperujo y aporta una mayor variedad de nutrientes, especialmente nitrógeno.

De forma similar, Cuestas, (2019) documenta la combinación de alperujo con cáscaras de girasol (que constituye otro residuo agroindustrial del SOB), como sustrato para la producción de hongos filamentosos de interés comercial (*Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum*). Demuestra que los mejores resultados, en cuanto a crecimiento y productividad de esta clase de hongos, se observaron con la combinación de ambos residuos agroindustriales. Es decir, se asegura la porosidad de la mezcla y el balance de nutrientes, mejorando las condiciones para el desarrollo del bioproceso.

Sin embargo, como ya se mencionó, las levaduras y hongos filamentosos difieren en su naturaleza celular, lo cual les brinda distintas formas de desarrollo y adquisición de nutrientes en sustratos sólidos (Manpreet et al., 2005; Curtis, 2001; Pandey, 1992). Los hongos filamentosos forman una red multicelular denominada micelio, que constituye su parte vegetativa (Islam et al., 2017; Postemsky y Curvetto, 2015; Curtis, 2001). El mismo, se compone de filamentos tubulares (hifas) cuyas longitudes varían desde pocas micras, a varios metros (Islam et al., 2017; Curtis, 2001). Las hifas pueden penetrar los sustratos sólidos a diferentes profundidades en busca de nutrientes (Islam

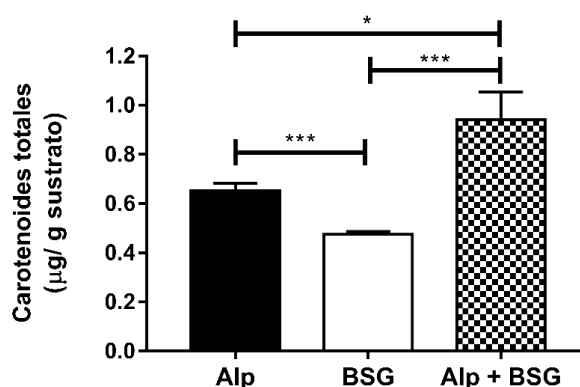
et al., 2017; Postemsky y Curvetto; 2015; Manpreet et al., 2005; Curtis, 2001). Además, secretan, enzimas hidrolíticas extracelulares como ligninasas y celulasas, que les permiten degradar la matriz lignocelulósica (Lizardi-Jiménez y Hernández-Martínez, 2017; Manpreet et al., 2005; Pandey, 1992). De esta manera, habilitan el acceso del organismo a nutrientes que están ubicados a mayor profundidad del sustrato sólido (Manpreet et al., 2005). Por lo tanto, se diferencian de las levaduras y bacterias que, al ser unicelulares, solo pueden desarrollarse y acceder a sustancias nutritivas que se encuentran en la superficie de un medio sólido (Cuestas, 2019; Kuhar et al., 2018; Manpreet et al., 2005; Curtis, 2001). De esta manera, el utilizar un soporte de crecimiento (en este caso, la Friselina 40), permitiría realizar varios ciclos de desarrollo de la cepa sobre el mismo sustrato sólido. De hecho, no se espera que la cantidad de nutrientes consumidos por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en un ciclo de crecimiento, sea significativo respecto a la disponibilidad total de nutrientes ofrecida por la masa de sustrato.

Evaluamos luego, la producción de compuestos carotenoides en los diferentes sustratos. Como muestra la Fig. 4.9, la levadura fue capaz de sintetizar pigmentos carotenoides en todos los sustratos analizados. Cuando el contenido de carotenoides totales se expresa en  $\mu\text{g/g}$  biomasa, no se encuentran diferencias significativas entre la producción de carotenoides en el Alp y Alp + BSG. Aunque se observa una tendencia a obtener valores mayores en Alp + BSG. Por otra parte, los valores más bajos de carotenoides totales, se obtuvieron cuando la levadura desarrolla sobre BSG (Fig.4.9).



**Fig. 4.9.** Carotenoides totales ( $\mu\text{g/g}$  biomasa), producidos por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre alperujo, BSG y Alp + BSG. Las barras muestran la media y el S.D. ( $n = 3$ ). \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Sin embargo, cuando el contenido de carotenoides totales se expresa en función de los g de sustrato empleados (Fig. 4.10), observamos que hay un mayor rendimiento en Alp + BSG, probablemente debido a la combinación de un mayor crecimiento de la levadura (Fig. 4.8) y una mayor producción de carotenoides (Fig. 4.9).



**Fig. 4.10.** Carotenoides totales ( $\mu\text{g/g}$  sustrato), producidos por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre: alperujo, bagazo de cebada (BSG) y la mezcla de ambos sustratos. Las barras muestran media y S.D. ( $n = 3$ ). \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

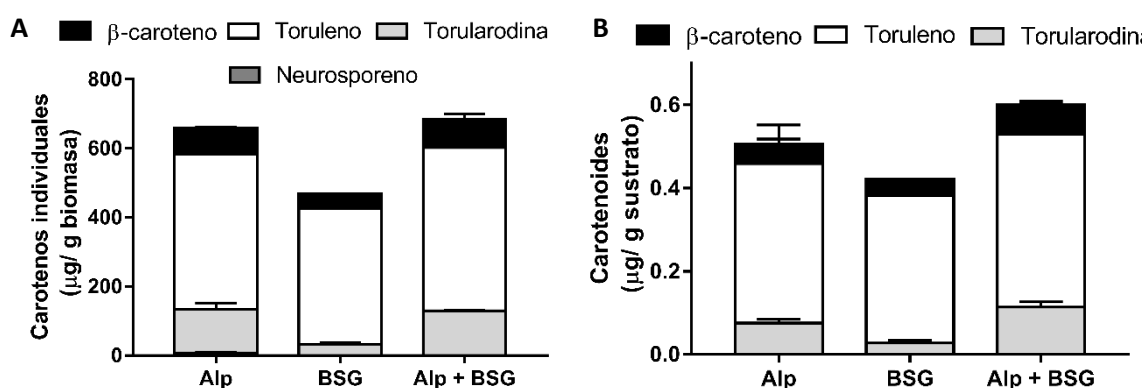
Es importante destacar, que como demostramos en los capítulos previos, el alperujo al poseer una concentración alta de sales y compuestos fenólicos, además de una composición de nutrientes desequilibrada (Ouzounidou et al., 2010; Usaquen-Alvarado, 2008; Borja et al., 2006; Alburquerque et al., 2004), puede provocar una mayor estimulación de la síntesis de carotenoides en *Rh. mucilaginosa* sp.



De esta manera, el bagazo aportaría una mayor concentración y variedad de azúcares, que el alperujo. A la vez, este subproducto olivícola al contener sales y compuestos fenólicos, estimularía la carotenogénesis en *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 (Yoo et al., 2016; Zoz et al., 2015; Moliné et al., 2012; Kim et al., 2004; Libkind et al., 2004; Mares, 1982). Por lo tanto, la combinación Alp + BSG, mejoraría el desarrollo y la síntesis de carotenoides en *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638, brindando una nueva posibilidad de reconversión de estos dos subproductos agroindustriales abundantes en el SOB, como medios de cultivo sólidos.

#### 4.2.2. Perfil de carotenoides identificados

Los principales carotenoides producidos fueron toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno (Fig. 4.11 A-B). Estos resultados, coinciden con lo reportado en capítulos anteriores y la bibliografía (Sharma y Goshal, 2020; Veiga-Rodrigues et al., 2019; Cheng y Yang, 2016; Moliné et al., 2012; Malisorn y Suntornsuk, 2008; Buzzini et al., 2007; Maldonado et al., 2007; Aksu y Tugba, 2005; Libkind et al., 2004; Marova et al., 2004; Frengova et al., 1997; Margauth y Meydav, 1968).



**Fig. 4.11.** Carotenoides individuales en  $\mu\text{g/g}$  biomasa (A) y  $\mu\text{g/g}$  de sustrato (B), producidos por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre los distintos medios. Las barras muestran media y S.D. ( $n = 3$ ).

Estos tres tipos de carotenoides identificados, fueron preponderantes en los sustratos que se analizaron, representando el 73, 89 y 66 % de los carotenoides totales

en Alp, BSG y Alp+BSG respectivamente (Fig. 4.11). Asimismo, el toruleno fue el pigmento de mayor síntesis en los tres medios sólidos, seguido por torularodina y  $\beta$ -caroteno, coincidiendo con Zoz et al., (2015); Frengova y Beshkova, (2008); Libkind et al., (2004); Margauth y Meydav, (1968). Además, en las levaduras crecidas sobre alperujo se encontraron trazas del precursor neuroesporeno ( $6,9 \pm 2,7 \mu\text{g/g}$  de biomasa), indicando que la ruta carotenogénica está más activa cuando la levadura crece sobre este subproducto olivícola.

El neuroesporeno, se transforma en licopeno o  $\beta$ -zeacaroteno, mediante acción de la enzima fitoeno desaturasa (Kot et al., 2018; Zoz et al., 2015; Moliné et al., 2012; Britton, 1998). Luego, ambos, mediante reacciones enzimáticas se transforman en  $\gamma$ -caroteno, que es el precursor tanto del  $\beta$ -caroteno como del toruleno (Kot et al., 2018; Moliné et al., 2012; Britton, 1998; Margauth y Meydav, 1968).

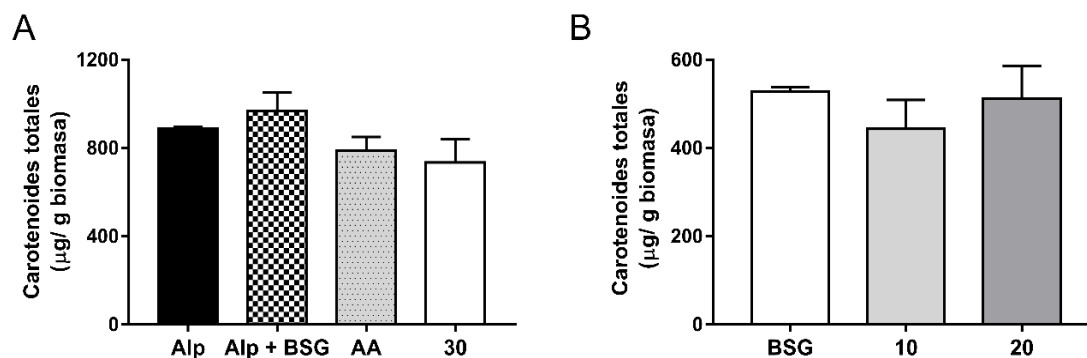
Este paso constituye un punto de ramificación en la síntesis de los carotenoides. Posteriormente, el toruleno es oxidado para convertirse en torularodina (ver Capítulo 3, Fig. 3.1), (Tang et al., 2019; Meléndez-Martínez, 2017; Kot et al., 2018; Zoz et al., 2015; Hernández-Almanza et al., 2013; Britton, 1998).

Por otra parte, en las levaduras desarrolladas sobre BSG, se observa un menor contenido de  $\beta$ -caroteno y torularodina, respecto de las otras condiciones (Tabla 4.1). Sin embargo, en el caso del  $\beta$ -caroteno, su % se mantiene, lo que indicaría que la reducción se debe a un menor contenido de carotenos totales. La proporción de torularodina, por otro lado, es mucho menor cuando la levadura crece en BSG, indicando que, no estaría favorecida la oxidación del toruleno (Tabla 4.1).

	toruleno	Torularodina	$\beta$ -caroteno	Carotenos totales
$\mu\text{g/g}$ de biomasa				
Alp	448.7 $\pm$ 3.5 (50,6)	127.0 $\pm$ 17.6 (14,3)	75.7 $\pm$ 2.8 (8,5)	886,4 $\pm$ 12,6
BSG	392.7 $\pm$ 26.8 (74,3)	32.2 $\pm$ 5.6* (6,1)	43.7 $\pm$ 0.9* (8,3)	528,5 $\pm$ 13,61
Alp + BSG	472.8 $\pm$ 44.2 (45,8)	129.6 $\pm$ 1.7 (12,6)	82.1 $\pm$ 15.5 (7,9)	1032 $\pm$ 96,78

**Tabla 4.1.** Carotenoides individuales ( $\mu\text{g/g}$  de biomasa), sintetizados por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en Alperujo (Al), Bagazo (Bag) y combinación de ambos (Alp + BSG). Los valores representan la media  $\pm$  S.D (n=3), En cada columna, \*p<0,01. Entre paréntesis, el % del total.

Por último, observamos que la cantidad de carotenoides totales sintetizada por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 crecida sobre Alp y Alp+BSG ( $\sim$ 800-1000  $\mu\text{g/g}$  de biomasa), es similar a la obtenida en AA y EA 30% (Fig. 4.12 A). Mientras que, la cantidad sintetizada de carotenoides obtenida sobre BSG ( $\sim$  500  $\mu\text{g/g}$  de biomasa), sería comparable con las halladas en los EAs de menor concentración de alperujo, (Fig. 4.12 B).



**Fig. 4.12.** Carotenoides totales sintetizados por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en **A)** los medios sólidos y **B)** en los medios líquidos derivados del alperujo analizados.

Con respecto al perfil de carotenoides hallado entre los medios sólidos y los medios líquidos analizados, los carotenoides mayoritarios fueron toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno, en todos los casos (Fig. 4.13 A y B).

Sin embargo, la proporción de estos pigmentos varía entre los medios líquidos y sólidos. En los medios sólidos de mayor producción de carotenoides totales (Alp y

Alp+BSG), la proporción de torularodina es menor respecto de los medios líquidos (AA y EA 30%) como muestra la Fig. 4.13 A, lo cual resulta en un mayor porcentaje de toruleno. Esto es más notorio cuando *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638 crece sobre BSG, donde la proporción de torularodina disminuye drásticamente (Fig. 4.13 B). La torularodina es una xantofila con mayor poder antioxidante que el toruleno y el  $\beta$ -caroteno (Tang et al., 2019; Kot et al., 2018), por lo que su disminución en los medios sólidos, podría sugerir que en estos medios las levaduras están menos expuestas a stress oxidativo.

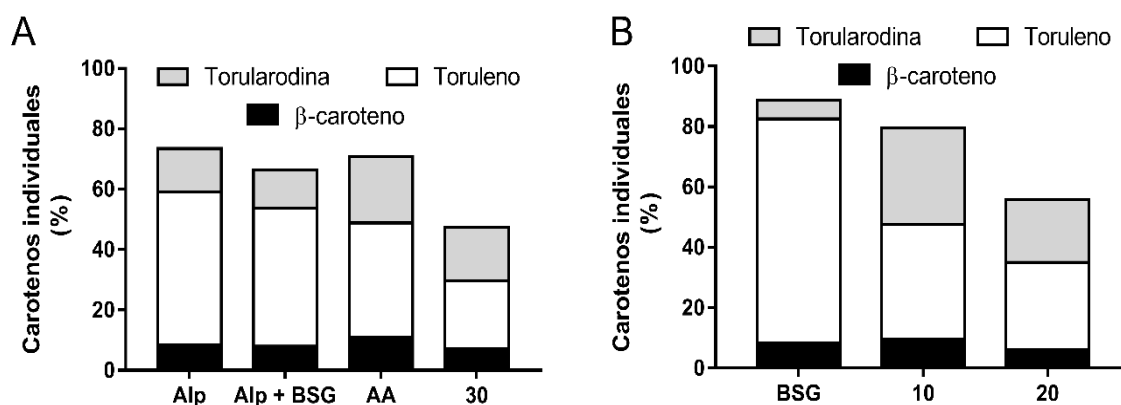


Fig. 4.13. Perfil de carotenoides individuales (%) sintetizados por *Rhodotorula mucilaginosa* LPSC 638 en A) medios sólidos y B) líquidos analizados.

Por otro lado, en los medios líquidos es más significativa la proporción de otros carotenoides como,  $\gamma$ -caroteno y neurosporeno (Fig. 2.15 y 2.17). Este hecho, podría deberse a que, en los medios sólidos, los últimos pasos de la ruta carotenogénica no estarían saturados o transcurren más rápidamente, convirtiendo estos intermediarios en los productos finales (ver Capítulo 3, Fig. 3.1), (Zoz et al., 2015; Hernandez-Almanza et al., 2013; Margauth y Meydav, 1968).

Definitivamente, el rendimiento de la síntesis de carotenoides y las proporciones de toruleno y torularodina sintetizadas, no tienen valores constantes (Kot et al., 2018 ; Cheng y Yang, 2016; Hernandez-Almanza et al., 2014; Zoz et al., 2015; Moliné et al.,

2012; Maldonade et al., 2007; Davoli et al., 2004; Libkind et al., 2004). Como se mencionó en capítulos anteriores, la eficiencia de este proceso está influenciado, principalmente, por la composición del medio (Sharma y Goshal, 2020; Elfeky et al., 2019; Kot et al., 2018; Cheng y Yang, 2016; Voaides y Dima, 2012; Marova et al., 2004). De esta manera, estímulos ambientales como, la concentración de ciertos compuestos inhibidores (sales, ácidos grasos, compuestos fenólicos) y la disponibilidad de fuentes de C y N, actúan para regular la producción de estos pigmentos lipídicos en *Rhodotorula* spp. (Kot et al., 2018; Zoz et al., 2015; Hernandez-Almanza et al., 2014; Moliné et al., 2009; Frengova y Beshkova, 2008; Davoli et al., 2004; Marova et al., 2004; Buzzini, 1999; Moore et al., 1989).

Asimismo, las fracciones de carotenoides individuales, dependen no solamente de la especie, sino también de la cepa de la levadura (Kot et al., 2018; Moliné et al., 2012; Libkind, et al. 2006; Libkind et al., 2004; Buzzini, 1999). *Rh. mucilaginoso* comprende un grupo de cepas heterogéneas, con gran variabilidad fisiológica y fenotípica, capaces de producir distintas proporciones y tipos de carotenoides dependiendo del medio dónde se desarrollen (Moliné et al., 2012; Sampaio, 2010; Libkind et al., 2006; Libkind et al., 2004; Buzzini,1999).

### 4.3. Conclusiones parciales

- *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, puede desarrollarse en medios sólidos formados tanto por alperujo (Alp), bagazo de cebada (BSG) y la mezcla Alp+BSG. De esta manera, se manifestaría la plasticidad fisiológica y fenotípica propia del género de la levadura, pudiendo adaptarse a las características particulares de ambos subproductos.

- El alperujo es una matriz compleja por su consistencia y por las sustancias antimicrobianas que lo conforman. Sin embargo, la combinación con BSG mejoraría sus cualidades como sustrato para el desarrollo de microorganismos de interés biotecnológico.
- No se observaron diferencias significativas en el contenido de carotenoides totales ( $\mu\text{g/g}$  biomasa) que fueron sintetizados por la levadura, sobre Alp y Alp+BSG. Los valores más bajos, se obtuvieron con las levaduras desarrolladas en BSG, probablemente debido a su granulometría.
- Los carotenoides sintetizados por *Rh. mucilaginos*a LPSC 638 fueron: toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno, constituyendo los pigmentos principales sintetizados en los tres medios sólidos, representando aproximadamente el 80% de los carotenoides totales.
- Toruleno fue el pigmento de mayor síntesis en los tres sustratos, seguido por torularodina y  $\beta$ -caroteno.
- En las levaduras crecidas sobre Alperujo, se encontraron trazas del precursor neurosporeno, indicando que la ruta carotenogénica está más activa, cuando la levadura crece sobre este subproducto.
- Probablemente, debido a las propiedades antioxidantes que presentan los pigmentos carotenoides (Zoz et al., 2015 ; Hernandez-Almanza et al., 2013), esta cepa de *Rh. mucilaginos*a podría desarrollar tolerancia a factores estresantes presentes en ambos residuos lignocelulósicos.
- La combinación de ambos subproductos agroindustriales, generaría un medio de cultivo de bajo costo, apto para el desarrollo de microorganismos con interés

biotecnológico, planteando una nueva forma de reconversión de estos residuos lignocelulósicos que son habituales en la región del SOB. Por lo tanto, se evitaría la deposición directa de los mismos y, por otro lado, se generaría una nueva propuesta de reutilización dentro del marco de la economía circular. Este concepto, actualmente está cobrando relevancia e interés, en diferentes regiones del país y el mundo.

#### 4.4. Bibliografía

- Ablin, A. «El Mercado de la Cerveza. Informe Sectorial N° 3.» Informe Técnico., Área de Sectores Alimentarios , Dirección de Agroalimentos, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca., Ciudad Autónoma de Bs As., 2014, 12.
- Aguirre, M., Ottogali, J.M., et al. "Evaluation of Cation and Anion Leaching in a Soil after Treatment with alperujo." *Acta Horticulturae.*, no. 1057 (2014): 321–328.
- Aksu, Z.A., & Tugba, E. "Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source." *Process Biochemistry* 40 (2005): 2985–2991.
- Albuquerque, J.A., Gonzalez, J., et al. "Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction." *Bioresource Technology*, no. 91 (2004): 195–200.
- Aliyu, S., & Bala, M. "Brewer's spent grain: A review of its potencial and applications." *African Journal of Biotechnology* 10, no. 3 (2011): 324-331.
- Banat, I. M., Carboué, Q., et al. "Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. ." *Bioresource Technology.*, no. 320 (2021): 124222.
- Berbel, J., Gutiérrez-Martín, C., et al. «Valorización de los subproductos de la cadena del aceite de oliva.» *Mediterráneo Económico.*, nº 32 (06 2018): 273-289.
- Berlinger, A., entrevista de Ursula Ures. «La agroindustria de la cerveza.» *Revista Super Campo. De la huerta a la Estancia.*, editado por Ursula Ures. Ciudad Autónoma de Bs. As., Buenos Aires: Editorial Perfil S.A., (06 de 08 de 2020).
- Bidegain, A., Postemsky, P.D., et al. "Analysis of the Influence of Substrate Formulations on the Bioactive Chemical Profile of Lingzhi or Reishi (Agaricomycetes) Chemometrics Methods." *International Journal of Medicinal Mushrooms* 6, no. 21 (2019): 537 – 548.
- Bolsa de Cereales Bahía Blanca. *La cebada: un cultivo clave para la región de Bahía Blanca.* Informe Técnico/económico, Area de estudios Económicos, Bahía Blanca: Bolsa de Cereales y Productos de Bahía Blanca, 2021.
- Borja, R., Raposo, F., et al. "Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills." *Grasas y Aceites.* 1, no. 57 (2006): 32-46.
- Borroni, M.V., Gonzalez, M.T. & Carelli, A.A. "Bioproduction of carotenoid compounds using two-phase olive mill waste as the substrate." *Process biochemistry*, 2017: 1-7.
- Britton, G., & Liaaen-Jensen, S. *Carotenoids*. Vol. 3. Boston, 1998.
- Buzzini, P., & Martini, A. "Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin." *Bioresource Technology* 71 (1999): 41-44.
- Buzzini, P., Innocenti, M., et al. "Carotenoids Profiles of yeast belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*." *Can. J. Microbiol.*, no. 53 (2007): 1024-1031.



Capítulo 4. Desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG).

- Ceci, L.N., Pezzuti, A., et al. «Aceites de oliva vírgenes producidos en la Costa Atlántica Argentina. Calidad Química y Sensorial.» *A&G 2*, nº 115 (2019): 294-302.
- Cheng, Y.T., & Yang, C.F. "Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.*, no. 61 (2016): 270-275.
- Chilakamarry, C. R., Sakinah, A. M., et al. « Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. .» *Bioresoursource technology.*, nº 343 (2022): 126065.
- Código Alimentario Argentino. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>. 18 de 07 de 1969. Ley 18284/1969 (último acceso: 21/09/2020).
- Coremberg, A. «Medición de la cadena de valor de la bioeconomía en Argentina:Hacia una cuenta satélite.» Informe técnico., Grupo de Bioeconomía, Bolsa de cereales de Bs.As & Secretaría de Agroindustria, Ministerio de producción y trabajo., Ciudad Autónoma de Bs. As. (CABA)., 2019, 31.
- Cuestas, J.M. *Fermentación en estado sólido del alperujo de olivo con hongos ligninolíticos para la producción de hongos comestibles y medicinales*. Tesis de Grado., Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia., Universidad Nacional del Sur., Bahía Blanca, Buenos Aires: Universidad Nacional del Sur. Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia., 2019, 40.
- Curtis, H., & Barnes, N.S. *Biología*. Sexta Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A., 2001.
- Davoli, P., Mierau, V., et al. "Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus*." *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, no. 4 (2004): 392–397.
- dos Santos, T., Morenzton, P. et al. "Solid wastes in Brewing process: a Review,." *Journal of brewing and destiling* 5, no. 1 (2014): 1-9.
- Driessen, W., & Vereijken, T. "Recent developments in biological treatment of Brewery effluent." *The Institute and Guild of Brewing Convention.*, 2003: 10.
- Efkey, N., Elmahmoudy, M., et al. "Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* with a Combined Cultivation Mode of Nitrogen, Sulfur, and Aluminium Stress." *Applied sciences*, no. 9 (2019): 2-19.
- Esteban-Torrente, S. «Aprovechamiento de los subproductos generados en la industria cervecera.» Tesis de fin de grado, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, España, 2019, 1-20.
- Fermoso, F.G., Serrano, A., et al. "Valuable Compound Extraction, Anaerobic Digestion, and Composting: A Leading Biorefinery Approach for Agricultural wastes." *J. Agric. Food Chem.*, no. 66 (2018): 8451–8468.
- Frengova, G., Simova, E., et al. "Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, no. 18. (1997): 272–277.

Capítulo 4. Desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG).

- Frengova, G.I., & Beshkova, D.M. "Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008: 1-43.
- Godliving, Y., & Mtui, S. "Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products." *African Journal of Biotechnology*. 8, no. 8 (2009): 1398-1415.
- González, G., Tedesco, L., et al. «Evolución del entorno de negocios y análisis económico de la producción de aceite de oliva virgen extra en el Sudoeste Bonaerense.» *Revista de la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, UNMDP.*, nº 47 (2016): 63-79.
- Hashemi, M., Razavi, S. H., et al. "The potential of brewer's spent grain to improve the production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system. ." *New Biotechnol.*, no. 28 (2011): 165–172.
- Hernandez-Almanza, A., Montañez-Sáenz, J., et al. "Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation." *Food Bioscience*. 7 (2014): 31–36.
- Hernandez-Almanza, A.J., Montaneza, C., et al. "Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry." *Food Bioscience* 5 (2013): 64-72.
- Hussein, M.S., Abdelhafez, A.A., et al. "Optimization of  $\beta$ -Carotene Production from *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 Growing on Agro-industrial Substrate Using Plackett–Burman Design." *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 4, no. 88 (2018): 1637-1646.
- IOC, International Olive Council. *Country Profiles (Argentina). Overview of the olive and olive oil sector itemised by country and based on the official replies to IOC questionnaires.* Economic Affairs & Promotion Unit., Madrid: International Olive Council., 2012, 1-8.
- Islam, M.R., Tudry, G., et al. "Morphology and mechanics of fungal mycelium." *Sci Rep*, no. 7 (2017).
- Kim, B.K., Park, K.P., et al. "Effect of Phenol on  $\beta$ -Carotene Content in Total Carotenoids Production in Cultivation of *Rhodotorula glutinis*." *Korean J. Chem. Eng.* 3, no. 21 (2004): 689-692.
- Kot, A.M., Błażej, S., et al. "Torulene and torularhodin: "new" fungal carotenoids for industry?" *Microb Cell Fact.* 17, no. 49 (2018): 1-14.
- Kotlar, C.E., Ponce, A.G., et al. "Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically." *LWT - Food Science and Technology*, no. 50 (2013): 378-385.
- Kuhar, F., Postemsky, P.D., et al. "Conditions Affecting Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) Basidiome Quality, Morphogenesis, and Biodegradation of Wood By-products in Argentina." *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 5, no. 20 (2018): 495–506.
- Kuhar, S., Nair, M.L., et al. "Pretrat of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation improves substrate acid hydrolysis and the eventual conversion to ethanol." *Can. J. Microbiol.* 1, no. 54 (2008): 305-313.

Capítulo 4. Desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG).

- Kumar, V., Ahluwalia, V., et al. "Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. ." *Bioresource Technology.*, no. 323 (2021): 124566.
- Libkind, D., & van Broock, M. "Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeast." *World Journal of Microbiology & Biotechnology.*, 2006: 687-692.
- Libkind, D., Brizzio, S., et al. «*Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake.» *Folia Microbiol.* 1, nº 49 (2004): 19-25.
- Lizardi-Jiménez, M.A., & Hernández-Martínez, R. "Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass." *3 Biotech.* (Springer.) 7, no. 44 (2017).
- Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., et al. "Engineering aspects of solid state fermentation." *Enzyme Microb. Technol.* (Butterworth & Co, (Publishers) Ltd.) 7 (1985): 258-265.
- Lopes, V.R., Farias, M.A., et al. "Nitrogen sources on TPOMW valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia lipolytica*." *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* 33, no. 2 (2016): 261 - 270.
- Lynch, M., Steffen, E.J., et al. "Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health." *Institute of Brewing & Distilling*, 2016: 16.
- Maldonade, I.R., Scamparini, A.R., et al. "Selection and characterization of carotenoids-producing yeast from campinas Region, Brazil." *Brazilian Journal of Microbiology.*, no. 38 (2007): 65-70.
- Malisorn, C., & Suntornsuk, W. "Optimization of B-Carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine." *Bioresource Technology.*, no. 99 (2008): 2281–2287.
- Manpreet, S., Sawraj, S., et al. "Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State fermentation." *Malaysian Journal of Microbiology*, 1, no. 2 (2005): pp. 1-9.
- Mares, D. "Ultra structural and cytochemical study of *Rhodotorula glutinis* in the main growth faces." *Mycopathologia.*, no. 80 (1982): 179-188.
- Margauth, P., & Meydav, S. "Some observations on the carotenogenesis in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*." *Phytochemistry.* 7, no. 5 (1968): 761-766.
- Marova, E., Breierova, E., et al. "Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeast." *Annals of Microbiology* 1, no. 54 (2004): 73-85.
- Martínez, A.T. "How to break down crystalline cellulose." *Science.* 352, no. 6289 (Mayo 2016): 1050-1051.
- Martínez, J.M. *Eficiencia de uso y balance de nitrógeno en sistemas con trigo del sur bonaerense: Dinámica en el suelo y nutrición del cultivo.* . Tesis Doctoral, Departamento de Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca: EdiUNS, 2015, 209.
- McCarthy, A.L., O'Callaghan, Y.C., et al. "Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: A Review." *Proceedings of the Nutrition Society.*, no. 72 (2013): 117–125.

Capítulo 4. Desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG).

- Meléndez-Martínez, A.J. «Carotenoides: Estructura, Propiedades y Funciones.» Cap. 1 de *Carotenoides en agroalimentación y salud.*, de A.J. Meléndez-Martínez, 12-31. Madrid: Editorial Terracota, SA de CV., 2017.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. «Bagazo de cerveza: un subproducto con múltiples aplicaciones.» Ciudad Autónoma de Bs. As, 2018, 9.
- Miravalles, M. «Tecnología de la Cebada.» *Unidad:Tecnología de la Producción Primaria de los alimentos. Cereales y oleaginosas.* Bahía Blanca, Buenos Aires, 03 de 08 de 2016. 102.
- Moliné, M. Libkind, D. & van Brook, M. "Production of Torularhodin, Torulene, and b -Carotene by Rhodotorula yeast." Chap. 13 in *Microbial Carotenoids from fungi. Methods and Protocols.*, by J.L. Barredo, 285. León: Springer, 2012.
- Moliné, M., Libkind, D., et al. "Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.*, no. 95 (2009): 156–161.
- Moore, M.M., Breeveded, M.W., et al. "The Role of Carotenoids in Preventing Oxidative Damage in the Pigmented Yeast, Rhodotorula mucilaginosa." *Archives of biochemistry and biophysics.* 270, no. 2 (1989): 419-431.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., et al. "Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes." *Appl. Microbiol. Biotechnology.*, no. 85 (2009): 25-39.
- Morillo-Perez, J.A. *Biorremediación del alperujo: estudio de la microbiota asociada y producción del exopolisacárido jambilano.* Tesis Doctoral., Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología., Universidad de Granada., Granada, España.: Editorial de la Universidad de Granada., 2007, 136.
- Naciones Unidas (CEPAL). «Oportunidades para la agricultura y la agroindustria.» *Bioeconomía en América Latina y el Caribe 2015.* Santiago de Chile., 2015. 6.
- Nardone, P. «Los senderos de la Bioeconomía en Latinoamérica. .» Informe técnico, Grupo de Bioeconomía, Bolsa de Cereales de Buenos Aires y Secretaría de Agroindustria., Ciudad Autónoma de Bs. As., 2020, 4.
- Ntougias, S., Bourtzis, K., et al. «The Microbiology of Olive Mill Wastes.» *BioMed Research International* 2013 (2013): 1-16.
- Ouzounidou, G., Zervakis, G.I., et al. "Raw and Microbiologically Detoxified Olive Mill Waste and their Impact on Plant Growth." *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology.*, no. 4 (2010): 21-38.
- Palazzolo, M.A., Postemsky, P.D., et al. "From agro-waste to tool: biotechnological characterization and application of *Ganoderma lucidum* E47 laccase in dye decolorization." *Biotech.* (Springer) 9, no. 213 (2019): 2-7.
- Pandey, A. "Recent Process Developments in Solid-State Fermentation." *Process Biochemistry.*, no. 27 (1992): 109-117.
- Pandey, A. "Solid-state fermentation." *Biochemical Engineering Journal*, no. 13 (2003): 81–84.

Capítulo 4. Desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG).

- Panesar, R., Kaur, S., et al. "Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review." *Food Science (issue on Food bioprocessing)*, no. 1 (2015): 70-76.
- Paredes- López, O., Guzman-Maldonado, S.H., et al. "Solid substrate fermentation - A biotechnological approach to bioconversion of wastes." In *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products.*, by A.M. Martin, 117-145. New York.: Elsevier Applied Science., 1991.
- Paroldi, H.E., Medina, E.M., et al. «Variación de las comunidades microbianas en función de las diferentes fases térmicas en el proceso de compostaje del alperujo.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y CUYO*. San Juan, Argentina.: INTA Ediciones., 2018. 314-343.
- Pereyra-Iraola, M.M., Bodega, J.L., et al. «Cebada cervecera. Calidad industrial – Proceso de Malteo.» *Cereales y Oleaginosas. Facultad de Ciencias Agrarias – Balcarce. Universidad Nacional de Mar del Plata.Cursada 2013 / 14*. Mar del Plata, Buenos Aires: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP, 2013. 14.
- Postemsky, P.D., & Curvetto, N.R. "Solid-state fermentation of cereal grains and sunflower seed hulls by *Grifola gargal* and *Grifola sordulenta*." *International Biodeterioration & Biodegradation*. (Elsevier), no. 100 (2015): 52-61.
- Postemsky, P.D. "Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*." *Bioresource Technology.*, no. 231 (2017): 85-93.
- Potes-Vecini, D., Piña, J., et al. «Bioactividad de extractos de bagazo de cerveza.» *International Conference of Production Research-Americas (ICPR)2020*. Bahía Blanca (Prov. Bs. As), Argentina.: Editorial de la Universidad Nacional del Sur (EdiUNS)., 2020. 1728-1732.
- Ravindran, R., Jaiswal, S., et al. "A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of Brewer's spent grain." *Bioresource Technology.*, no. 248 (2018): 272–279.
- Red Nacional de Cebada Cervecera. *Resultados obtenidos en la campaña 2021, EEA INTA Bordenave*. Tecnico/agropecuario., INTA Bordenave, Buenos Aires: INTA, 2021, 62.
- Roadjanakamolson, M., & Suntornsuk,W. "Production of  $\beta$ -Carotene-Enriched Rice Bran Using Solid-State Fermentation of *Rhodotorula glutinis*." *J. Microbiol. Biotechnol.* 3, no. 20 (2010): 525–531.
- Robertson, J.A., l'Anson, K.J., et al. "Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production." *LWT-Food Science and Technology*. (Elsevier), no. 43 (2010): 890-896.
- Rodríguez, L.M., Constenla, D.T., et al. «Evaluación composicional de bagazo d diferentes estilos de cerveza artesanal para su valoración.» *Proceedings of International Conference of Production Research-Americas (ICPR) 2020*. Bahía Blanca: Editorial de la Universidad Nacional del Sur (EdiUNS)., 2020. 1897-1910.
- Rodríguez, M., Cornejo, V., et al. «Valorización de subproductos olivícolas mediante la recuperación,purificación y concentración de antioxidantes naturales.» *Simposio RedBio Argentina Virtual, 2021*. Ciudad Autónoma de Bs. As., 2021. 2.

Capítulo 4. Desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG).

- Rodríguez-Gutierrez, G., & Monetta, P. «Subproductos del olivar: Recuperación de compuestos fenólicos. Experiencias en España y Argentina.» *Ciclo virtual de seminarios internacionales: Avances en olivicultura y elaiotecnía*. INTA, CRILLAR-CONICET, CREA, UNDeC, Chile OLIVA, Min. Agric, Gand y Pesca de la Rep. Arg. San Juan, San Juan, 8 de julio de 2021.
- Sampaio, J.P. "Rhodotorula Harrison (1928)." Chap. 155 in *The Yeasts*, by Cletus, P., & Boekhout, T., 1873-1927. New York, New York: Elsevier Science, 2010.
- Sánchez-Sánchez, C., González-González, A., et al. "Two-phase Olive mill waste: A circular economy solution to an imminent problem in Southern Europe." *Journal of Cleaner Production*, no. 274 (2020): 1-10.
- Saparrat, M.C., Rocca, M., et al. "Celtis tala and Scutia buxifolia leaf litter decomposition by selected fungi in relation to their physical and chemical properties and lignocellulolytic enzyme activity." *European Journal of Soil Biology*. 44, no. 4 (2008): 400-4007.
- Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., et al. "Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents." *Energy*, no. 61 (2013): 34-43.
- Sharma, R., & Ghoshal, G. "Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach." *Biotechnology Reports*, no. 25 (2020).
- Socaci, S.A., Fărcaș, A.C., et al. "Food Wastes as Valuable Sources of Bioactive Molecules." Chap. 4 in *Superfood and Functional Food*, by N. & Waisundara, V. Shiomi, 76-93. Londres: IntechOpen Limited, 2017.
- Szwajgier, D., Waśko, A., et al. "The use of a novel ferulic acid esterase from *Lactobacillus acidophilus* K1 for the release of phenolic acids from brewer's spent grain. ." *J. Inst. Brew.*, no. 116 (2010): 293-303.
- Tang, W., Wang, Y., et al. "Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for enhanced Their Production." *J. Microbiol. Biotechnol.* 4, no. 29 (2019): 507-517.
- Usaquen-Alvarado, S.M. «Aprovechamiento y valorización del alperujo tratado térmicamente como: fertilizante biológico y fuente de Hidroxitirosol.» Tesis de grado, Facultad de Ciencias., Pontificia Universidad Javeriana, Granada, Granada, 2008.
- Veiga-Rodrigues, T., Amore, T.D., et al. "Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agro-industrial Byproducts." *Food Technology & Biotechnology* 3, no. 57 (2019): 388-398.
- Voaides, C., & Dima, R. "The effect of nitrogen source on carotenoids production by *Rhodotorula* sp." *Romanian Biotechnological Letters*. 17, no. 5 (2012): 7570-7575.
- Vylissides, A.G., Loisdou, M., et al. "Olive oil Porecessing wastes production and their characterisitcs in relation to olive oil extraction methods." *Fresenius Envir. Bull.*, 1998: 308-313.
- Xiros, Ch., Topakas, E., et al. "Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*." *Bioresource technology*. (Elsevier), no. 99 (2008): 5427-5435.

Capítulo 4. Desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre Alperujo y Bagazo de cebada cervecera (BSG).

- Yoo, A., Alnaeeli, Y., et al. "Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01." *Process Biochemistry.*, no. 51 (2016): 463-473.
- Zoz, L., Carvalho, J.C., et al. "Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics a Review." *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 58, no. 2 (2015): 278-288.
- Zuorro, A., Iannone, A., et al. "Water–Organic Solvent Extraction of Phenolic Antioxidants from Brewers' Spent Grain." *Processes* 7, no. 126 (2019): 2-11.

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad  
de Extractos acuosos (EAs) y Agua de  
Alperujo (AA) sobre semillas de  
*Lactuca sativa L.*



### 5.1. Introducción

En la olivicultura moderna Argentina, se adoptó el sistema de extracción bifásico, constituyéndose como el principal método de obtención del aceite de oliva (Monetta, 2019; Laurent et al., 2015; IOC, 2011). Sin embargo, a pesar de que nuestro país es el principal productor y exportador en América del Sur, y el décimo a nivel mundial (Paroldi, 2019; Rodríguez, 2018; IOC, 2011), no existen normativas específicas para el tratamiento de este residuo olivícola (Monetta, 2019). No obstante, en la actualidad se están desarrollando alternativas para aprovecharlo, siendo la más relevante hasta el momento, el compostaje (Monetta, 2019; de Bustos y Carabajal, 2018; Moisés, 2018; Paroldi, 2017; Laurent et al., 2015; Monetta y Ibañez, 2014; Aguirre et al., 2014). Este método tiene como función, gestionar y dar valor a residuos de distintos orígenes y calidades (de Bustos y Carabajal, 2018; CCQ Council, 2001).

El compostaje es un proceso biooxidativo controlado, llevado a cabo por microorganismos sobre un sustrato orgánico, dando lugar a un producto maduro, estable, inocuo e inodoro, denominado compost (Monetta, 2019; de Bustos y Carabajal, 2018; Huerta-Muñoz et al., 2015; Lavado, 2012; Alburquerque et al., 2009; CCQ Council, 2001). Este proceso, es considerado una buena práctica para transformar residuos orgánicos en enmiendas de suelos (Monetta y Ibañez, 2014). Durante los últimos años el compostaje ha sido promovido, como una forma de reconversión del alperujo, por instituciones gubernamentales de los principales países productores de aceite de oliva (Berbel 2018; Alburquerque 2009). En la región de Cuyo y en el SOB, por lo general, al alperujo se lo descarta en forma directa, sin seguir ningún control o recomendación, utilizándolo como enmienda orgánica para el suelo (Monetta, 2019; Paroldi, 2019; Cuestas, 2019; Moisés et al., 2018; Carrasco et al., 2018; Laurent et al., 2015; Aguirre et

**Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.**

al., 2014; Filippin et al., 2014). De esta manera, cuando finaliza el proceso de extracción del aceite, a la salida del decanter, el alperujo es cargado a una batea o cisterna para su aplicación en la línea de plantación de la finca (Monetta, 2017), (Fig. 5.1 A-B-C).



**Fig. 5.1. A)** Alperujo depositado en batea, al final del proceso de extracción bifásico del aceite de oliva, para luego ser aplicado al suelo, (Establecimiento RumarOli, General Dorrego, Prov. Bs. As). **B) y C)** Aplicación directa de alperujo crudo en la línea de plantación mediante la descarga de batea y de cisterna respectivamente, en fincas olivícolas de la provincia de San Juan. (Fotografías B y C tomadas de (Monetta, 2017).

Cabe destacar que no se recomienda la deposición directa del alperujo al suelo sin un proceso previo que conduzca a su acondicionamiento o estabilización (Berbel et al., 2018; Monetta, 2015; Pierantozzi et al., 2012; Morillo et al., 2009; Usaquen-Alvarado, 2008). Diferentes trabajos aseguran que este residuo puede provocar, a largo plazo, la contaminación de aguas superficiales y subterráneas debido a escorrentías e infiltraciones que se generan en los sitios donde se lo almacena (Monetta, 2019; Laurent et al., 2015; Ntougias et al., 2013; Dermeche et al., 2013; McNamara et al., 2008; Mekki et al., 2007; Aranda et al., 2006; Dellagreca et al., 2001).

Por otra parte, el alperujo por su bajo pH y los compuestos químicos que lo conforman (compuestos fenólicos, sales y ácidos grasos), provocarían alteraciones en las características fisicoquímicas y biológicas del suelo; ya que incrementaría el contenido de materia orgánica y de ciertos macronutrientes como N, P y K (Mascareño-Varas y de Bustos, 2018; Paroldi, 2017; Ntougias et al., 2013; López-Piñeiro et al., 2011).

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

Estos desbalances alteran la diversidad de los microorganismos del suelo, ya que ocasionan desequilibrios tanto en la abundancia, como en la distribución de sus poblaciones (Paroldi, 2017; Shade et al., 2012). Por consiguiente, la importancia de conservar la diversidad microbiana del sustrato, apunta a que el suelo como sistema, se mantenga estable y funcional frente a una perturbación de origen artificial (manejo agronómico) o natural (sequías, inundaciones e incendios) (Paroldi, 2017; Allison y Martiny, 2008).

Por otra parte, los componentes del alperujo pueden causar fitotoxicidad en semillas y plántulas, ya que producirían efectos supresores en la germinación de semillas y en los primeros estadios del desarrollo en las plantas (Laurent et al., 2015; Alburquerque et al., 2009; Usaquen-Alvarado, 2008; McNamara et al., 2008; Morillo-Perez, 2007). Sin embargo, algunos autores demuestran que estos efectos ocurren cuando el alperujo es aplicado en dosis elevadas (80-800 m<sup>3</sup>/ha), (Monetta, 2019; Paroldi, 2017; Barbera et al., 2013; Gioffré et al., 2004; Casa et al., 2003).

A dosis bajas (50-100 m<sup>3</sup>/ha) se observa estabilidad en diferentes procesos biogeoquímicos del suelo (Ej.: lixiviado y adsorción de iones) y la ausencia de efectos fitotóxicos en plántulas y semillas (Monetta, 2019; Paroldi, 2017; Laurent et al., 2015; Aguirre et al., 2014; Barbera et al., 2013; Lopez-Piñeiro et al., 2011; Saadi et al., 2007). De esta manera, la utilización del alperujo en bajas cantidades serviría como enmienda orgánica, en particular, en suelos de regiones áridas y semiáridas, con el objetivo de mejorar su fertilidad (Monetta, 2019; Moisés et al., 2018; Paroldi, 2017; Laurent et al., 2015; Aguirre et al., 2014; Dermeche et al., 2013; Monetta et al., 2012; López-Piñeiro et al., 2008).

## Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

La fitotoxicidad puede expresarse como una reducción en el número de semillas germinadas y también, como una inhibición del alargamiento de la raíz de la plántula (Andreozzi et al., 2008; Rodríguez et al., 2008). Los efectos fitotóxicos de los residuos agroindustriales, son atribuidos a concentraciones altas de determinados compuestos químicos (orgánicos e inorgánicos) que afectan la productividad de los cultivos (Huerta-Muñoz et al., 2015; CCQ Council, 2001).

Se considera a la germinación como el establecimiento de un estado metabólicamente activo, manifestado fisiológicamente por la división celular y por la diferenciación (Rodríguez et al., 2008). La expresión inicial de este último estadio, es la emergencia de la radícula del embrión (Rodríguez, et al., 2008; Ranal y Garcia-de Santana, 2006). El proceso global de la germinación, está constituido por tres etapas: imbibición, proceso de activación y crecimiento intraseminal. Luego, el proceso se completa con la protrusión del embrión (Ranal y Garcia-de Santana, 2006; Labouriau, 1983). En el sentido práctico, es difícil establecer el inicio y final de cada una de estas etapas debido a que, los eventos moleculares y celulares están involucrados dentro del tejido y, además, se producen de manera gradual (Ranal y Garcia-de Santana, 2006). Así, la precisión en determinar el momento exacto del inicio de la germinación a través de criterios moleculares o celulares, se sustituye por métodos macroscópicos como, el surgimiento del embrión. Este hecho confiere cierto rigor, ya que, es un punto de referencia que puede ser advertido por diferentes observadores (Ranal y Garcia-de Santana, 2006; Labouriau, 1983).

Para detectar de manera indirecta la presencia de sustancias fitotóxicas, uno de los métodos más utilizados consiste en realizar bioensayos de germinación, con semillas

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

sensibles a fitotoxinas (Mascareño-Varas y de Bustos, 2018; Huerta-Muñoz et al., 2015).

Entre ellas, por ejemplo, se encuentran las de *Raphanus sativus* (rabanito), *Lactuca sativa* L. (lechuga), *Cucurbita pepo* (zapallo) y *Cucumis sativus* L. (pepino), (Sánchez-Sánchez, 2015; Daâssi et al., 2014; Barbera et al., 2013; Ouzounidou et al., 2010; Andreozzi et al., 2008; CCQ Council, 2001). En el caso particular de *Lactuca sativa* L., generalmente se la emplea debido a su particular sensibilidad a sustancias como sales o compuestos fenólicos y, además, por la rapidez en su germinación (Mascareño-Varas y de Bustos, 2018; Andreozzi et al., 2008; CCQ Council, 2001).

Existe un consenso general en cuanto a que los parámetros biológicos, como las pruebas de germinación, resultan ser los más adecuados debido a que permiten evaluar el poder germinativo de las semillas en un cierto tiempo (Huerta-Muñoz et al., 2015; Rodríguez et al., 2008; Ranal y Garcia-de Santana, 2006). El procedimiento general de estos tests, se basa en colocar semillas indicadoras en contacto con el extracto acuoso a probar, comparándose luego con un testigo. Posteriormente, se registra la proporción de semillas germinadas y la elongación de radículas emergentes (Huerta-Muñoz et al., 2015; Rodríguez et al., 2008).

Sin embargo, para expresar los resultados obtenidos, lo más frecuente es recurrir a índices de germinación (IG), (Rodríguez et al., 2008). Los mismos, permiten comparar cuantitativamente muestras de semillas sometidas a distintos tratamientos (Rodríguez et al., 2008; Tsioulpas et al., 2002). Estos tienen en cuenta, además de la cantidad de semillas germinadas, otros parámetros como, tiempo, velocidad o energía de germinación (Daâssi et al., 2014; Francáková et al., 2012; Andreozzi et al., 2008;

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

Rodríguez et al., 2008; Carvalho et al., 2005; Tsioulpas et al., 2002; Ranal y Garcia-de Santana, 2006; Labouriau, 1983; Czabator, 1962; Kotowski, 1926).

En este capítulo, se analizó la posible fitotoxicidad de los extractos acuosos (EAs) y la fracción líquida del alperujo fresco (AA), sobre semillas de *Lactuca sativa* L. y la incidencia de la desfenolización y el crecimiento de la levadura *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, en la germinación de las mismas.

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

### Objetivo General

Evaluar la fitotoxicidad sobre semillas de *Lactuca sativa* L de los extractos acuosos (EAs) y la fracción líquida de alperujo fresco (AA), antes y después de la desfenolización y del crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638.

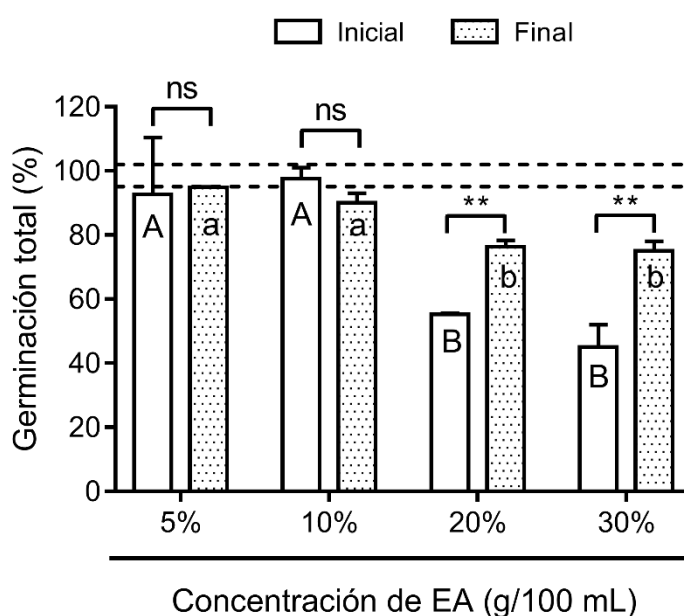
### Objetivos específicos

- Determinar el efecto de los extractos acuosos (EAs) y la fracción líquida de alperujo fresco (AA), antes y después del crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre el número de semillas germinadas de *Lactuca sativa* L.
- Determinar el efecto de los extractos acuosos (EAs) y la fracción líquida de alperujo fresco (AA), antes y después del crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre la longitud de la elongación radical de las plántulas obtenidas.
- Determinar el efecto de la fracción líquida de alperujo fresco (AA), normal y desfenolizada, antes y después del crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 sobre el número de semillas germinadas de *Lactuca sativa* L.
- Calcular índices de germinación (IG): germinación total (%), Velocidad de germinación (n° semillas/día) y crecimiento relativo de radícula (%), para cada condición experimental.

## 5.2. Resultados y Discusión

### 5.2.1. Análisis de Fitotoxicidad de AA y EAs con concentración normal de compuestos fenólicos

El número final de semillas germinadas depende de la concentración de los medios analizados (Fig. 5.2). En los EAs de 5% y 10% no se observa ningún efecto deletéreo en la germinación de las semillas, mientras que en los EAs de 20% y 30%, el porcentaje de semillas germinadas disminuye hasta un 55% y un 45%, respectivamente.



**Fig. 5.2.** Porcentaje total de semillas germinadas en diferentes concentraciones de EAs obtenidas antes (Inicial) y después (Final) del desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, durante 3 días de incubación. Las barras muestran la media y S.D. ( $n = 3$ ). Letras mayúsculas diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas entre medios en la condición Inicial ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas entre medios en la condición Final ( $p < 0,05$ ). \*\*  $p < 0,01$ . Las líneas punteadas indican el % de semillas germinadas del control realizado con  $H_2O$  destilada.

Por otra parte, el desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 no parece influir en la germinación de las semillas tratadas a bajas concentraciones de EAs (5% y 10%), (Fig. 5.2, Inicial vs. Final). Sin embargo, en EA 20% y 30%, se observa un aumento significativo en el % de germinación, luego del crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, aunque no alcanza los valores del control (Fig. 5.2, Inicial vs. Final). Este hecho, no estaría



Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

relacionado con el contenido de compuestos fenólicos, ya que el mismo no varía a lo largo del desarrollo de la levadura (Fig. 2.12).

De hecho, Saadi et al. (2007), Pierantozzi et al. (2011), Barbera et al. (2013) y Huerta-Muñoz et al. (2015), concuerdan en que las sales y ácidos grasos de cadena corta, también son responsables de la fitotoxicidad de residuos olivícolas, tanto como los compuestos fenólicos. En el caso de las sales, la toxicidad radica en su efecto osmótico (estrés osmótico), asociado a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Hanifi y El-Hadrami, 2008). Del mismo modo, los ácidos grasos de cadena corta, pueden alterar la accesibilidad de los nutrientes en las membranas biológicas de las células vegetales, (Saadi et al., 2007; Kistner et al., 2004).

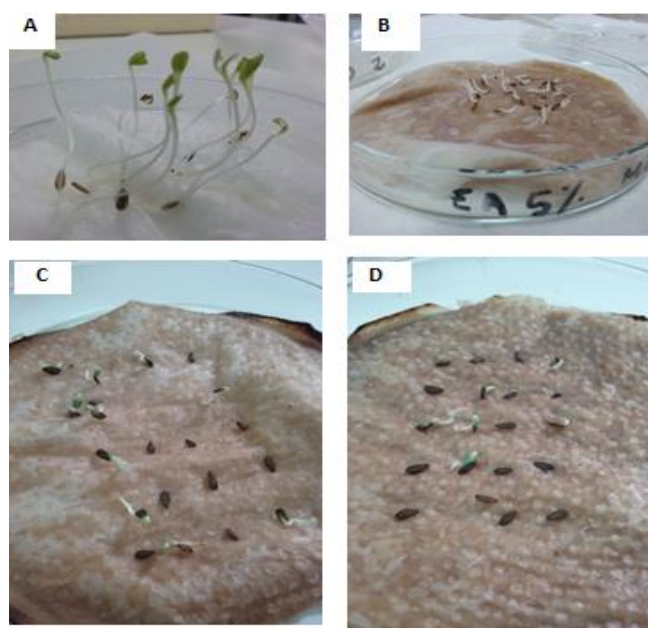
Diferentes autores analizaron los efectos inhibidores de los residuos olivícolas (alperujo y alpechines), relacionados con la germinación y crecimiento temprano de las plántulas tanto de especies silvestres como cultivadas (Pierantozzi et al., 2011; Hanifi y El-Hadrami, 2008; Obied et al., 2005; Martin et al., 2002). La fitotoxicidad del alperujo es una propiedad compleja, ya que más de un componente puede ser responsable de ella (Komilis et al., 2005). Si bien se afirma que los principales responsables son los compuestos fenólicos, no son los únicos (Barbera et al., 2013; Andreozzi et al., 2008; Hanifi y El-Hadrami, 2008; Komilis et al., 2005). De esta manera, los ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, aldehídos, sales y bajos pH, también tienen incidencia en las características de los residuos olivícolas (alperujo y alpechines), (Monetta, 2019; Paroldi, 2017; Albuquerque et al., 2004; Barbera et al., 2013; Pierantozzi et al., 2011).

Los resultados obtenidos respecto al porcentaje de semillas de *Lactuca sativa* L. germinadas, en relación a la concentración de los medios derivados del alperujo

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

analizados, son coincidentes con los reportados en alpechines, por Andreozzi et al. (2008), Ben-Sassi et al. (2006), Pierantozzi et al. (2011) y Komilis et al. (2005). En estos trabajos, se demuestra que, en especies hortícolas, como: *Lactuca sativa* L., *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Cichorium intybus* (achicoria), *Cucumis sativus* L. (pepino) y *Allium cepa* (Cebolla), cuanto mayor es la dilución del alpechín mayor es el porcentaje de semillas germinadas y, por lo tanto, menor el efecto fitotóxico.

Por otra parte, Andreozzi et al. (2008) y Barbera et al. (2013) afirman que la sensibilidad a los compuestos fitotóxicos del alpechín podría ser específica de la especie vegetal, y estaría relacionada con la dimensión de las semillas. Siendo menos resistentes las de menor tamaño, y más tolerantes las de mayor dimensión. De esta manera, las semillas de *Lactuca sativa* L. serían más susceptibles a los efectos fitotóxicos del alperujo, en comparación a otras especies con mayor tamaño seminal. Sin embargo, según estos autores, la hipótesis debe confirmarse con un mayor número de especies.



**Fig. 5.3.** A) Muestra testigo de semillas germinadas de *L. sativa*, luego de 6 días. B) Semillas germinadas, tratadas con extracto acuoso (EA) 5%. C) Semillas tratadas con extracto acuoso (EA) 30% D) Semillas tratadas con la fase acuosa de alperujo fresco (AA). Todas las fotografías fueron tomadas, al final del ensayo de germinación, luego de los 6 días de incubación.

### Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

Como se observa en la Fig. 5.3, los efectos inhibidores se observaron en las semillas tratadas con los EAs de mayor concentración (Fig. 5.3 C) y la fracción líquida del alperujo fresco (AA, Fig. 5.3 D). En efecto, los resultados obtenidos coinciden con, Huerta-Muñoz et al. (2015), Barbera et al. (2013), Pierantozzi et al. (2011), Andreozzi et al. (2008), Ben-Sassi et al. (2006) y Komilis et al. (2005). Comprobándose que, cuanto mayor es la concentración de estos medios, mayor es la influencia negativa sobre la germinación de las semillas y la elongación radical (Huerta-Muñoz et al., 2015).

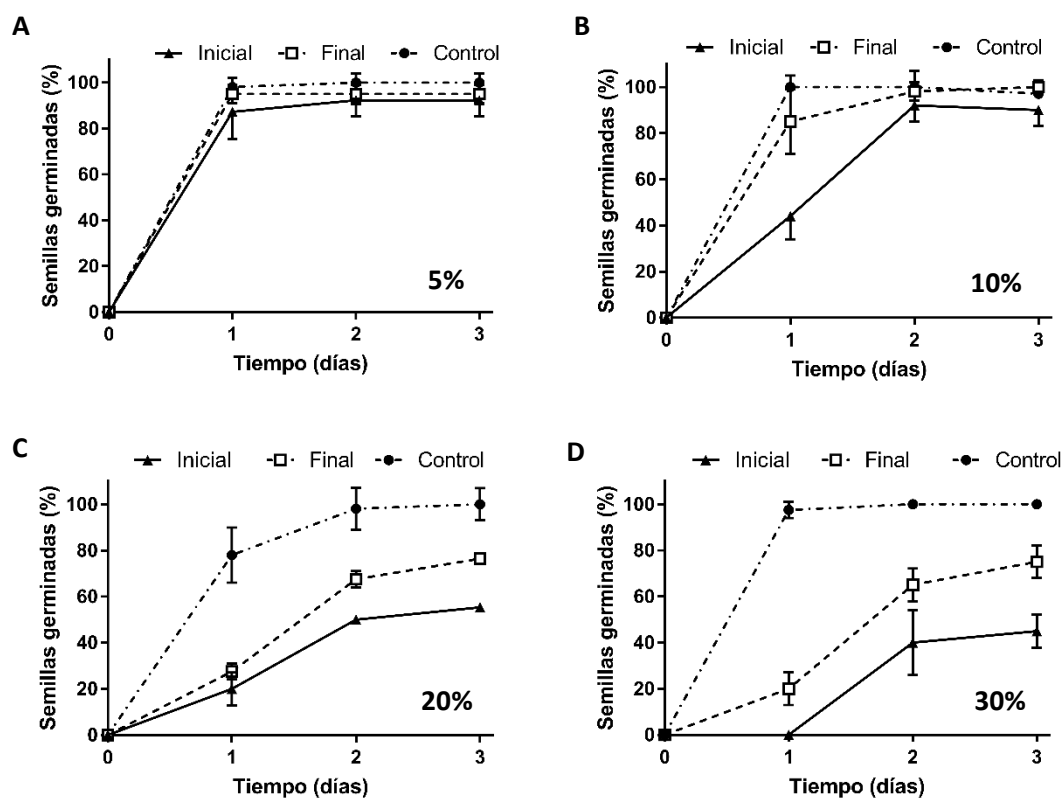
Este hecho probablemente se deba a la elevada proporción de solutos en solución que presenta el alperujo (Ej.: compuestos fenólicos, sales y ácidos grasos). De hecho, Capasso et al. (1992) mencionan que, luego de la extracción total de compuestos fenólicos en alpechines, éstos permanecieron con propiedades fitotóxicas. De lo que se desprende que, además de los compuestos fenólicos, hay otros compuestos químicos que influyen en la fitotoxicidad en los residuos olivícolas.

Es importante destacar que, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, cuya función es proteger a las plantas de diferentes patógenos y herbívoros (Zuorro et al., 2019; dos Santos et al., 2014; McCarthy et al., 2013; Morillo et al., 2009; Xiros et al., 2008; Jay et al., 2008; Čeh et al., 2007; Obied et al., 2005). El alperujo constituye una fuente importante de biofenoles como, por ejemplo: hidroxitirosol, oleuropeína, tirosol, ácido cafeico, verbascósido, entre otros (Rodríguez et al., 2018; Mussio et al., 2017; Soberon et al., 2012; Obied et al., 2005). Los compuestos fenólicos son valiosos para diversas industrias por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antitumorales (IOC, 2021; Lama-Muñoz et al., 2019; Fernández-Prior, 2019). Actualmente, existen distintas propuestas

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

para recuperarlos desde los residuos olivícolas (Ghilardi et al., 2022; Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Fernandez-Prior, 2019; Soberón et al., 2019). De esta manera, además de extraer y emplear estos compuestos en distintos circuitos productivos/comerciales, se genera un subproducto olivícola menos dañino para el ambiente, con grandes posibilidades de ser reutilizado (Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Rodríguez-Gutiérrez, 2018).

Con respecto al porcentaje de semillas germinadas en función del tiempo (Fig. 5.4), se observó que, en el control, el punto máximo de germinación fue a las 24 hs (día 1), estabilizándose a partir de allí, en los dos días posteriores desde el inicio del ensayo.



**Fig. 5.4.** Semillas germinadas (%) en función del tiempo (días), definido por (González-Zertuche (1996), para cada concentración de EA analizado: **A)** EA 5%, **B)** EA 10%, **C)** EA 20%, **D)** EA 30%. Siendo ▲ Inicial (antes del desarrollo de la levadura), □ Final (después del desarrollo del microorganismo) y ● curva de condición control (con H<sub>2</sub>O destilada).

**Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.**

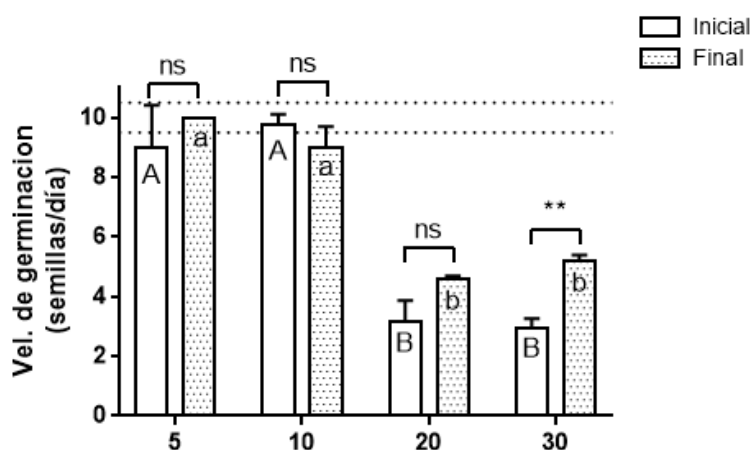
En el EA 5%, en la condición Inicial y Final, el número máximo de semillas germinadas se obtuvo, también, a las 24 horas de iniciado el ensayo. Luego, el porcentaje de germinación se mantuvo constante y similar al control (Fig. 5.4 A). El crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 no cambia la cinética de germinación en este medio.

Por otra parte, en el EA 10% el porcentaje máximo se alcanza en el día 2 (Fig. 5.4 B). Sin embargo, luego del crecimiento de la levadura, se observó en el día 1, al igual que en el EA 5% y el control. Es decir que, si bien el desarrollo de la levadura no cambia el % total de semillas germinadas (luego de 3 días), sí revierte el enlentecimiento en la germinación obtenida.

Por el contrario, en los EAs de mayor concentración de alperujo (20%, 30%), el punto máximo de germinación, en ambas condiciones, ocurre en el día 2 (Fig. 5.4 C-D). Luego, a partir del día 3, la germinación parecería llegar a un valor constante y menor al del control, en ambos casos. Sin embargo, en los medios obtenidos luego del crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, se observa un mayor número de semillas germinadas (Fig. 5.2 y Fig. 5.4). Estos resultados se relacionan con lo observado en el análisis del índice de germinación anterior (Fig. 5.2). Asimismo, en los EAs más diluidos (5% y 10%), no se observa ningún efecto deletéreo en la germinación de las semillas; mientras que en los de mayor concentración de alperujo (20%, 30%), el número de semillas germinadas disminuye notablemente. Por lo tanto, el índice semillas germinadas (%)/tiempo (Fig. 5.4), ilustra que la concentración elevada de alperujo de los EAs no solo disminuiría la germinación de *Lactuca sativa* L., sino que también la retardaría. Sin embargo, este efecto se revierte parcialmente, luego del desarrollo de

*Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Es decir, que el crecimiento de la levadura generaría un medio menos inhibitorio y más propicio para la germinación.

Con respecto a la velocidad de germinación (n° semillas germinadas/día), como muestra la Fig. 5.5, en los EAs más diluïdos (5% y 10%) las velocidades de germinación son similares a las del control y mayores que, en los EA más concentrados (20% y 30%).

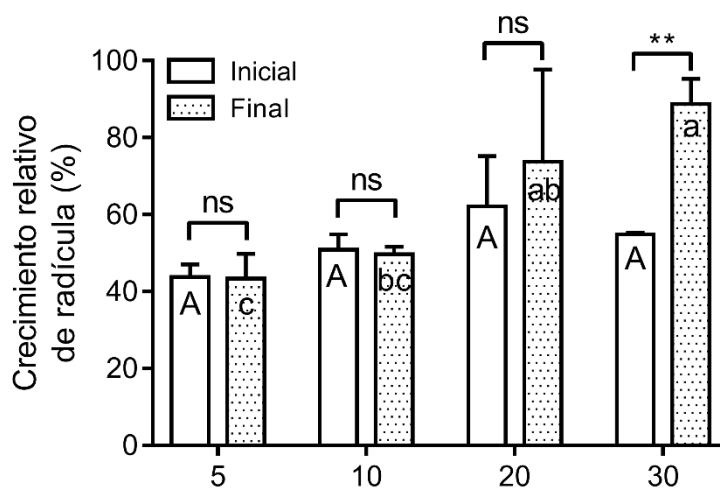


**Fig. 5.5** Velocidad de germinación (número de semillas germinadas/día), definido por (González-Zertuche (1996), para cada concentración de EA analizado (5%, 10%, 20% y 30%). Barras vacías, representan condición inicial (sin desarrollo de la levadura). Barras punteadas condición final (con desarrollo). ns: diferencias no significativas. Las líneas de puntos indican la Vel. de germinación del control realizado con H<sub>2</sub>O destilada. \*\* diferencias significativas. ANOVA ( $\alpha=0.05$ ).

Evaluamos luego, la incidencia del desarrollo de la levadura sobre la velocidad germinativa. Observamos que en los EAs de 5% y 10%, la velocidad de germinación no se ve afectada por el desarrollo de la levadura. En cambio, en el EA 20%, las semillas germinan más lentamente que el control y esta situación no cambia luego del crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Aunque se observa una tendencia a una mayor velocidad de germinación, la misma no resultó estadísticamente significativa. Por otra parte, en el EA 30%, se hallaron diferencias significativas entre la condición Inicial y final. La velocidad de germinación aumentó cuando las semillas se incubaron con el medio en el que creció *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Lo cual, se relaciona con los

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

resultados expuestos al principio. Es decir, la presencia de la levadura parece aumentar el % de germinación total de las semillas de *L. sativa* (Fig. 5.2), y también del % de semillas germinadas/tiempo (Fig. 5.4 D). Además, *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, parecería revertir el efecto del retardo en la germinación de las semillas (Fig. 5.4 D). En otras palabras, la presencia de la levadura parecería generar un EA 30% más favorable para la germinación de semillas, por lo menos en *L. sativa* L.



**Fig. 5.6.** Crecimiento relativo de radícula (%) definido por (Hoekstra et al., 2002) para cada concentración de EA analizado (5%, 10%, 20% y 30%). Barras vacías, representan condición Inicial (el medio antes del desarrollo de la levadura). Barras punteadas condición Final (medio luego del desarrollo de la levadura). ns: diferencias no significativas. \*\* diferencias significativas. ANOVA ( $\alpha=0.05$ ).

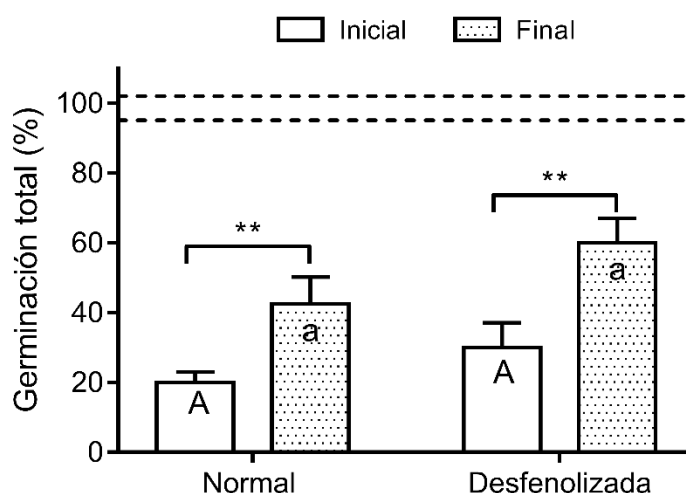
Con respecto a la longitud promedio de radículas (Fig. 5.6), en todos los EAs es menor al control. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes EAs. El desarrollo de la levadura aumentó la elongación radicular, en el EA 30% (Fig. 5.6). En tanto que, en los EAs de menor concentración (5%, 10%, 20%) no se encontraron diferencias significativas entre las radículas de las semillas que germinaron en las condiciones Inicial y Final. Por lo que, en estos medios, el crecimiento de la levadura no influiría en la elongación radical.

## Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

En resumen, el crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 mejora varios índices relacionados a la fitotoxicidad de los EAs, sobre todo en los medios más concentrados. El aumento del pH y la reducción de la carga orgánica (Capítulo 2, pág. 123-131), podrían contribuir a este efecto.

Por consiguiente, tras el crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 se obtendría un medio más adecuado, para prácticas agronómicas y compostaje (de Bustos y Carabajal, 2018; Paroldi, 2017; Barbera et al., 2013; Monetta et al., 2012; Albuquerque et al., 2009; CCQ Council, 2001).

### 5.2.2. Análisis de Fitotoxicidad de AA. Concentración normal y desfenolizada.



**Fig. 5.7.** Germinación total (%) definido por (Hoekstra et al., 2002) para AA con concentración normal de biofenoles y desfenolizada (concentración reducida de biofenoles). Barras vacías, representan condición inicial (sin desarrollo de la levadura). Barras punteadas condición final (medio obtenido luego del desarrollo). \*\* diferencias significativas. ANOVA ( $\alpha=0.05$ ).

Como se desarrolló anteriormente, la concentración de compuestos fenólicos en AA es similar al EA 30% (Fig. 1.3). Siendo ambos, los medios con mayor concentración de todos los analizados. La desfenolización de la fracción líquida del alperujo fresco (AA)

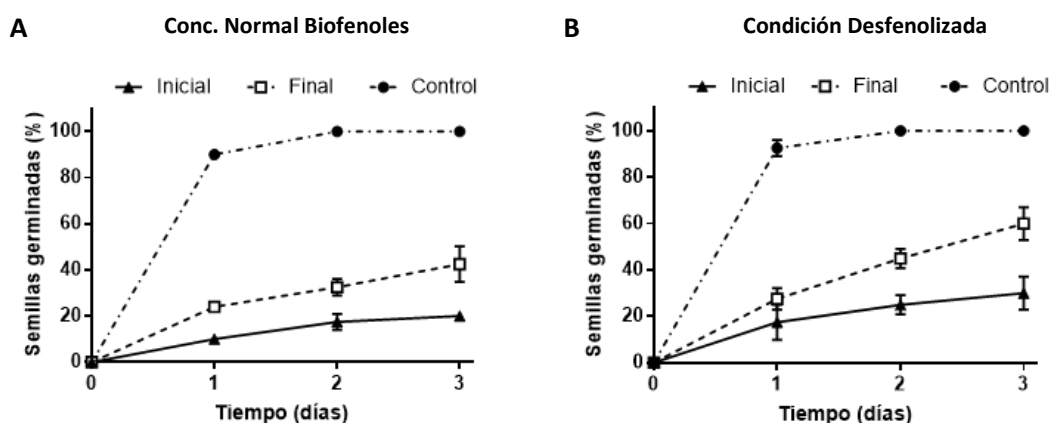


Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

con acetato de etilo, descrita en el Capítulo 1 (Fig. 1.7), redujo el contenido de compuestos fenólicos en aproximadamente un 45%.

La desfenolización del AA no afectó el número total de semillas germinadas, que resultó muy por debajo del control (líneas punteadas) (Fig. 5.7). Sin embargo, se obtuvo un mayor % de semillas germinadas cuando se utilizaron los medios (Normal o Desfenolizado) luego del crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 (Fig. 5.7).

Por otra parte, para la condición Normal y Desfenolizada del AA, se observan curvas similares. Es decir, la germinación de las semillas se prolongaría hacia el día 3 del ensayo, tanto en la condición Inicial, como en la Final, (Fig. 5.8 A y B). Sin embargo, tanto en AA Normal como Desfenolizada, se observa que el porcentaje de semillas germinadas en la condición Final, es mayor que en la Inicial. De todas formas, aunque se ve una mejoría en cuanto a la germinación de las semillas, ningún medio logra alcanzar los niveles del Control.

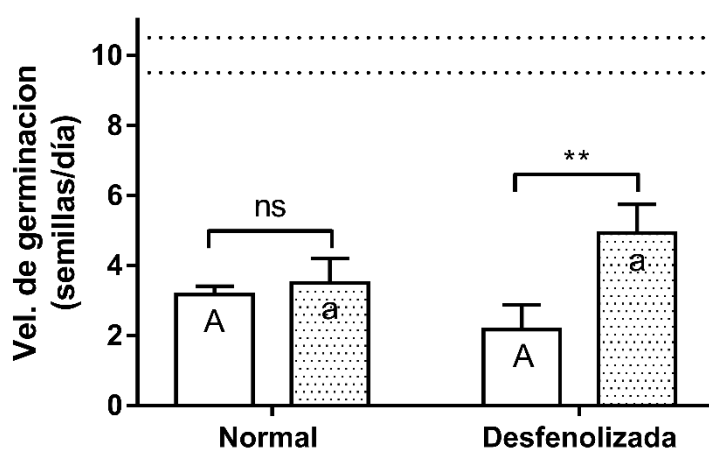


**Fig. 5.8.** Semillas germinadas (%) en función del tiempo (días), definido por (González-Zertuche (1996), para AA en condición normal **(A)** (concentración normal de biofenoles) y desfenolizada **(B)** (concentración reducida de biofenoles). Siendo ▲ la curva de la condición inicial (antes del desarrollo de la levadura), □ la curva de condición final (después del desarrollo del microorganismo) y ● curva de condición control (semillas crecidas con H<sub>2</sub>O destilada).

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

La velocidad de germinación no cambia debido al proceso de desfenolización (Fig. 5.9). Además, en AA normal, el crecimiento de la levadura tampoco afecta este parámetro; no se encontraron diferencias significativas entre las velocidades en la condición Inicial (medio previo al desarrollo de la levadura) y Final (medio luego del desarrollo de la misma).

Sin embargo, en el AA desfenolizada, la velocidad de germinación de las semillas en el medio luego del crecimiento de la levadura es mayor en comparación a la de las semillas que se desarrollaron en el medio previo al crecimiento del microorganismo. De esta manera, el desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 parecería hacer de la fracción líquida del alperujo desfenolizada, un medio menos inhibitorio para la germinación de las semillas.

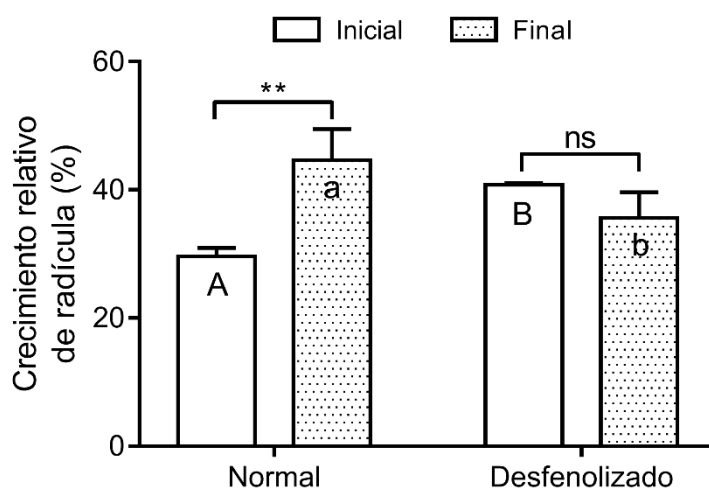


**Fig. 5.9.** Velocidad de germinación (número de semillas germinadas/día), definido por (González-Zertuche (1996), para AA en condición normal (A) (concentración normal de biofenoles) y desfenolizada (B) (concentración reducida de biofenoles). Barras vacías, representan condición inicial (sin desarrollo de la levadura). Barras punteadas condición final (con desarrollo). ns: diferencias no significativas. \*\* diferencias significativas. ANOVA ( $\alpha=0.05$ ).

En cuanto al crecimiento relativo de radícula (Fig. 5.10), podemos observar que la misma aumenta debido a la desfenolización. Además, en las semillas desarrolladas en AA de concentración normal de compuestos fenólicos, observamos que la longitud de

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

las radículas es significativamente mayor en el medio Final (después del desarrollo de la levadura), con respecto aquellas germinadas en el medio Inicial (Fig. 5.10). Mientras que, en AA desfenolizada, el desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 no altera la longitud radicular.

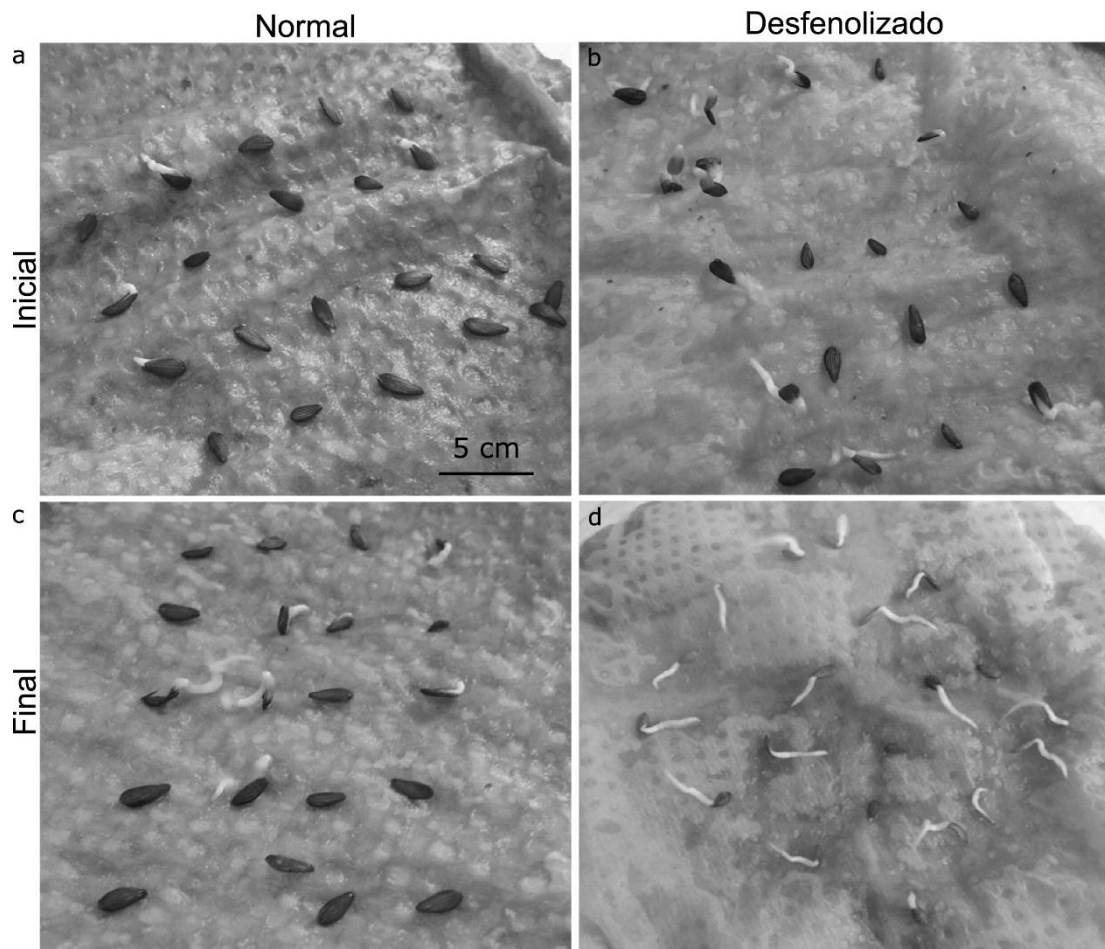


**Fig. 5.10.** Crecimiento relativo de radícula (%) definido por (Hoekstra et al., 2002). Barras vacías, representan condición inicial (sin desarrollo de la levadura), para AA en condición normal **(A)** (concentración normal de biofenoles) y desfenolizada **(B)** (concentración reducida de biofenoles). Barras punteadas condición final (con desarrollo). ns: diferencias no significativas. \*\* diferencias significativas. ANOVA ( $\alpha=0.05$ ).

Por lo tanto, el desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en AA normal, fomentaría la división celular de los tejidos radiculares permitiendo una elongación mayor de las radículas. Por lo que parecería superarse la inhibición asociada a la composición del AA. En la Fig. 5.11 se observa, a modo de ejemplo, cómo en este experimento, las semillas germinadas en AA desfenolizada, luego del crecimiento de la levadura, son más y presentan una mayor elongación radicular.

Los resultados obtenidos coinciden con Andreozzi (2008) dónde documenta que a medida que aumenta la concentración de los alpechines, se incrementa el efecto fitotóxico, afectando las radículas en *L. sativa*. Análogamente, Hanifi (2008) reporta que

el alargamiento de las radículas en semillas de *Zea mays* L. (maíz), disminuye a mayor concentración de alpechines.



**Fig. 5.11.** **A)** Semillas germinadas tratadas con AA con concentración normal de biofenoles, sin la levadura desarrollada. **B)** Semillas germinadas tratadas con AA de concentración disminuida de polifenoles (desfenolizada) y sin levadura desarrollada. **C)** Semillas tratadas con AA de concentración normal de biofenoles con la levadura desarrollada. **D)** Semillas tratadas con AA desfenolizado y el desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638.

A su vez, Kistner et al. (2004) informan una notable disminución en la longitud de las raíces de las plántulas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) tratadas con alpechines crudos, en comparación a las expuestas a alpechines detoxificados biológicamente. Por su parte, Martin et al. (2002) describen la disminución en el desarrollo de las raíces de *Glycine max* (soja), cuando son tratadas con la fracción líquida de alperujo. La hipótesis

del autor se basa en que este hecho, es producto del declive en la colonización de hongos formadores de micorrizas, (*Glomus mosseae* y *Glomus deserticola*).

Para finalizar, existen otros estudios en los cuales se han analizado tanto alpechines como la fracción líquida del alperujo fresco, para el control de malezas (Aguirre et al., 2010). Por ejemplo, Cayuela et al. (2008) encuentran que el líquido crudo de los residuos provenientes de almazaras puede ejercer un control sobre malezas altamente invasivas como, *Amaranthus retroflexus* L., *Solanum nigrum* L. y *Chenopodium album* L., en donde la emergencia de las mismas fue sustancialmente inhibida (Aguirre et al., 2010; Cayuela et al., 2008). Análogamente, Aguirre, et al. (2010) realizaron ensayos de germinación sobre sustratos constituidos con alperujo crudo y extractos acuosos de alperujo en diferentes diluciones, que demostraron un gran poder herbicida. Es decir, el porcentaje de germinación fue menor al 40%, en dos malezas comunes en el SOB (*Wedelia glauca* y *Centaurea solstitialis* L.). Los autores consideran que la combinación de altas concentraciones de compuestos fenólicos y sales, sumados a los bajos pH, son los responsables del efecto herbicida del alperujo y sus extractos acuosos.

### 5.3. Conclusiones parciales

- El número de semillas germinadas y la velocidad de germinación dependen de la concentración de los medios analizados. Siendo nulo el efecto de fitotoxicidad, en los medios de menor concentración de alperujo (EAs de 5% y 10%), y mayor en los medios más concentrados (EAs 20%, 30%).
- Las longitudes de las radículas no dependen de manera significativa de la concentración de los EAs.

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

- El desarrollo de la levadura, influye positivamente en la germinación de las semillas en el EA 10 %, EA 20% y 30%, en la elongación radicular y la velocidad de germinación de las plántulas de *Lactuca sativa* L., cuando crecen sobre el EA 30%.
- En el AA Normal, el número de semillas germinadas disminuye hasta un 20%. Observándose efectos inhibitorios en la elongación de las radículas embrionarias, en comparación a la condición desfenolizada.
- El desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 afecta positivamente la germinación total y la elongación radicular en AA Normal.
- El desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 afecta positivamente la germinación total y la velocidad de germinación en AA Desfenolizada.

#### 5.4. Bibliografía

- Aguirre, M.E., Elisei, V.R., et al. «Reutilización de los subproductos de la industria olivarera.» *AgroUNS* (EdiUNS), nº 13 (2010): 16-19.
- Aguirre, M.E., Ottogali, J.M., et al. "Evaluation of Cation and Anion Leaching in a Soil after Treatment with alperujo." *Acta Horticulturae.*, no. 1057 (2014): 321–328.
- Albuquerque, J.A., Gonzalez, J., et al. "Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction." *Bioresource Technology*, no. 91 (2004): 195–200.
- Albuquerque, J.A., Gonzalez, J., et al. «Evaluation of “alperujo” composting based on organic matter degradation, humification and compost quality.» *Biodegradation*, nº 20 (2009): 257-270.
- Allison, S.D. & Martiny, J.B.H. "Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities." *PNSA* 105 (2008): 11512–11519.
- Andreozzi, R., Canterino, M., et al. "Effect of combined physico-chemical processes on the phytotoxicity of olive mill wastewaters." *Water Research*, 2008: 1684 – 1692.
- Aranda, E., Sampedro, I., et al. "Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth." *International Biodeterioration & Biodegradation*, no. 58 (2006): 176-179.
- Barbera, A.C., Maucieri, C., et al. "Effects of spreading olive mill wastewater on soil properties and crops, a review." *Agricultural Water Management*, no. 119 (2013): 43-53.
- Ben-Sassi, A., Boularbah, A., et al. "A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco." *Process Biochemistry*, no. 41 (2006): 74-78.
- Berbel, J., Gutiérrez-Martín, C., et al. «Valorización de los subproductos de la cadena del aceite de oliva.» *Mediterráneo Económico.*, nº 32 (06 2018): 273-289.
- Capasso, R., Cristinzio, G., et al. "Isolation, Spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetative waste waters." *Phytochemistry* 31, no. 12 (1992): 4125-4128.
- Carrasco, E., Hidalgo, A., et al. «Revalorización del guano de gallina y alperujo de oliva, para la producción de biogás.» *II Simposio de Residuos Agroindustriales y Agropecuarios del NOA y CUYO*. San Juan, Argentina.: INTA Ediciones., 2018. 51-55.
- Carvalho, M.P., Santana, D.G., et al. «Emergência de plântulas de *Anacardium humile* A. St. Hil. (Anacardiaceae) avaliada por meio de amostras pequenas.» *Revista Brasileira de Botânica.*, nº 28 (2005): 627-633.
- Casa, R., D’Annibale, A., et al. "Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability." *Chemosphere.*, no. 50 (2003): 959–966.

**Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.**

- Cayuela, M.L., Millner, P.D., et al. "Potential of olive mill waste and compost as biobased pesticides against weeds, fungi, and nematodes." *Sci Total Environ.*, no. 399 (2008): 11-18.
- CCQ Council. *Compost Maturity Index*. Informe Técnico., California Compost Quality Council, Nevada city, California: California Compost Quality Council, 2001, 26.
- Čeh, B., Kač, M., et al. "Relationships between Xanthohumol and Polyphenol Content in Hop Leaves and Hop Cones with Regard to Water Supply and cultivar." *Int. J. Mol. Sci.*, no. 8 (2007): 989-1000.
- Cuestas, J.M. «Fermentación en estado sólido del alperujo de olivo con hongos ligninolíticos para la producción de hongos comestibles y medicinales.» *Tesis de Grado para optar por el Título de Lic. en Cs. Biológicas*. Bahía Blanca, Buenos Aires: Universidad Nacional del Sur. Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia., Octubre de 2019. 40.
- Czabator, F.J. «Germination value: an index combining speed and completeness of pine seed germination.» *Forest Science* ., nº 8 (1962): 386-396.
- Daâssi, D., Belbahri, L., et al. "Enhanced reduction of phenol content and toxicity in olive mill wastewaters by a newly isolated strain of *Corioliopsis gallica*." *Environ Sci Pollut Res*. 21 (2014): 1746–1758.
- de Bustos, M.E. & Carabajal, D. «Compost a base de alperujo como parte de un sustrato en plantinera de hortalizas.» *II Simposio de Residuos Agroindustriales y Agropecuarios del NOA y CUYO*. San Juan, Argentina.: INTA Ediciones., 2018. 62-64.
- de Paula Ruiz, M.M. «Alteraciones bioquímicas en semillas envejecidas de girasol (*H. annuus* L.) relacionadas con la viabilidad, funcionalidad de membranas y cambios asociados con la capacidad antioxidante.» Tesis Doctoral, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, universidad Complutense, Madrid, 2005, 331.
- Deiana, A.C. «Aprovechamiento de residuos olivícolas. Carbón activado y Bioetanol.» *Curso de posgrado: Gestión y Aprovechamiento de Efluentes y Residuos Olivícolas*. San Juan, San Juan: INTA EEA San Juan., 6 de Junio de 2019.
- Dellagrecia, M., Monaco, P., et al. "Phytotoxicity of Low Molecular Weight Phenols from Olive Mill Waste Waters." *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, no. 67 (2001): 352–359.
- Dermeche, S., Nadour, M., et al. "Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization." *Process Biochemistry* 48 (2013): 1532–1552.
- dos Santos, T.R., Moretzohn, P.P., et al. "Solid Wastes in brewing process: a Review." *Journal of brewing and Distilling*. 5, no. 1 (2014): 1-9.
- Elisei, V.R., Aguirre, M.E., et al. «El desafío de la olivicultura en el Sudoeste bonaerense.» *AgroUNS*. (Departamento Agronomía.) IV, nº 7 (2007): 11-14.
- European Regional Development Fund. «Horizonte 2020 – La Financiación de la UE de la investigación y el desarrollo Tecnológico para el sector agroalimentario.» informe Técnico, 2013, 8.
- Federici, E., Pepi, M., et al. «Two-phase olive mill waste composting: Community dynamics and functional.» *Bioresource Technology* 102 (2011): 10965–10972.



**Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.**

- Fernandez-Prior, A. «Disminución del Impacto ambiental a través del uso de nuevos disolventes 'verdes' para la extracción de fenoles del alperujo y el estudio de éstos como fitorreguladores naturales en agricultura ecológica o para disminuir el uso de agroquímicos.» *Curso de Posgrado. Gestión y aprovechamiento de efluentes y residuos olivícolas*. San Juan, San Juan: INTA EEA San Juan., 6 de Junio de 2019.
- Filippin, A., Pozzi, J., et al. «Subproductos del olivar y sus procesamientos para obtención de productos con valor agregado.» *V Jornadas de la RedVITEC*. Córdoba, Argentina.: UNC (Universidad Nacional de Córdoba), 2014. 1-9.
- Francáková, H., Lisková, M., et al. "Germination Index as an Indicator of Malting Potential." *Czech J. Food Sci.* 30, no. 4 (2012): 377–384.
- Galoppini, C., Andrich, G., et al. «Lo spandimento nel terreno agrario, una biodepurazione dei reflui di frantoio.» En *Trattamento e riutilizzazione dei reflui agricoli e dei fanghi.*, de Conte & Lecce., 175–186. Catania, 1992.
- Gatti, M.G., & González, L.A. *Caracterización de suelos del partido de Coronel Dorrego. Comparación de dos perfiles bajo un mismo cultivo y manejo*. Tesina de Grado: Tecnico superior de suelos y agua., Departamento de Agronomía., UNS, Bahía Blanca.: EdiUNS, 2009, 87.
- Ghilardi, C., Sanmartin-Negrete, P., Rodríguez- Gutierrez, G., et al.,. "Influence of olive mill waste phenolic compounds levels on carotenoid production by *Rhodotorula* spp." *Process Biochemistry*, no. 120 (2022): 275–286.
- Gioffré, D., Cannavò, S., et al. «Risultati sugli effetti delle acque reflue olearie somministrate con diverse modalità su terreno uliveto in pieno campo su piante di olivo allevate in mastello.» En *Valorizzazione di acque reflue e sottoprodotti dell'industria agrumaria e olearia.*, 81–98. Laruffa, 2004.
- González, G., Tedesco, L., et al. «Evolución del entorno de negocios y análisis económico de la producción de aceite de oliva virgen extra en el Sudoeste Bonaerense.» *Revista de la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, UNMDP.*, nº 47 (2016): 63-79.
- González-Zertuche, L. & Ürozco-Segovia, A. «Métodos de Análisis de datos en la Germinación de semillas un ejemplo: MANFREDA BRACHYSTACHYA.» *Bol. Soc. Bol. México*, (1996): 15-30.
- Hanifi, S., & El-Hadrami, I. "Phytotoxicity and fertilising potential of olive mill wastewaters for maize cultivation." *Agronomy for sustainable development*. 2, no. 28 (2008): 313-319.
- Hoekstra, N.J. Bosker, T., Lantinga, E.A. "Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.)." *Agriculture, Ecosystems and Environment*, no. 93 (2002): 189–196.
- Huerta-Muñoz, E., Hernández, J., et al. «Toxicidad de fertilizantes orgánicos estimada con bioensayo de germinación de lechuga.» *Terra Latinoam.* 33, nº 2 (2015): 179-185.
- IOC, International Olive Council. <https://www.internationaloliveoil.org/olive-world/olive-oil-health/#antioxidant> (último acceso: 11/03/2021).

**Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.**

- IOC, International Olive Council. "The local olive growing industry in Argentina: development, prospects and potential." *OLIVAE 116* (COI), no. 116 (2011): 1-8.
- Jay, A.J., Parker, M.L., et al. "A systematic micro-dissection of brewers' spent grain." *Journal of cereal Science* (Elsevier), no. 47 (2008): 357-364.
- Kistner, T., Jung, V., et al. "Effect of olive mill wastewater on young hydroponically grown tomato plants." *Journal of Applied Botany*, no. 78 (2004): 25–31.
- Komilis, D.P., Karatzas, E., et al. "The effect of olive mill wastewater on seed germination after various pretreatment techniques." *Journal of Environmental Management.*, no. 74 (2005): 339–348.
- Kotowski, F. "Temperature relations to germination." *Proceedings of the American Society for Horticultural Science.*, no. 23 (1926): 176-184.
- Labouriau, L.G. *A germinação das sementes. Série de Biologia. Monografia 24.* Monografia técnica., Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Organização dos Estados Americanos., Washington (EE.UU): SGOEA, 1983, 174.
- Lama-Muñoz, A., Rubio-Senent, F., et al. "The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization." *Innovative Food Science and Emerging Technologies.*, 2019: 11-17.
- Laurent, G.C., Suñer, L., et al. «Adición al suelo de Residuos de la Industria Olivícola.» *III Jornadas Nacionales de Suelos de Ambientes semiáridos y II Taller Nacinal de Cartografía Digital.* Sta. Rosa, La pampa.: INTA Ediciones, 2015. 130-134.
- Lavado, R.S. «Origen del compost, proceso de compostaje y potencial de uso.» En *Compostaje en la Argentina: Experiencias de producción, calidad y uso*, de Mazzarino & Satti., 349. Buenos Aires: Gráfica Editora. Buenos Aires, 2012.
- López-Piñeiro, A., Albarrán, A., et al. "Long-term impacts of de-oiled two-phase olive mill waste on soil chemical properties, enzyme activities and productivity in an olive grove." *Soil & Tillage Research.*, no. 114 (2011): 175–182.
- López-Piñeiro, A., Albarrán, A., et al. «Short and medium-term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under semiarid mediterranean conditions.» *Bioresource Technology.*, nº 99 (2008): 7982–7987.
- Martin, J., Sampedro, I., et al. "Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues." *Soil Biology & Biochemistry* 34 (2002): 1769–1775.
- Mascareño-Varas, M., & de Bustos, M.E. «Fitotoxicidad en *Lactuca sativa* L. por aplicación de extractos acuosos de compost a base de alperujo.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y CUYO.* San Juan.: INTA Ediciones., 2018. 136-139.
- McCarthy, A.L., O'Callaghan, Y.C., et al. "Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: A Review." *Proceedings of the Nutrition Society.*, no. 72 (2013): 117–125.

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

- McNamara, J.Ch., Anastasiou, Ch.C., et al. "Bioremediation of olive mill wastewater." *International Biodeterioration & Biodegradation.*, no. 61 (2008): 127-134.
- Mekki, A., Dhouib, A., et al. "Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters." *Journal of Environmental Management.*, no. 84 (2007): 134–140.
- Moisés, J., Martínez, J.M., et al. «Caracterización de residuos biotransformados y efectos de diferentes estrategias de aplicación.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y CUYO*. San Juan: Inta Ediciones, 2018. 145-148.
- Monetta, P. «Caracterización de residuos Sólidos y semisólidos del proceso de extracción de aceite de oliva.» *Curso de Posgrado. Gestión y aprovechamiento de efluentes y residuos olivícolas*. Villa Aberastain, San Juan: INTA, 6-8 de Junio de 2019.
- Monetta, P. *Reutilización de residuos sólidos y semisólidos del proceso de extracción de aceite de oliva como enmienda orgánica. Agroindustria/Olivo*. Informe Técnico., Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires: INTA ediciones , 2017, 17.
- Monetta, P.D. «Guía de Mejores Técnicas Disponibles para el manejo y Disposición Final de los Residuos Sólidos Generados en la Producción y Procesamiento de Aceite de Oliva Virgen» *Manejo y Disposición Final Adecuada de los Residuos Sólidos Orgánicos Generados en el Proceso de Producción y Procesamiento del aceite de Oliva Virgen*. Santiago: Ministerio de Economía, Fomento y Turismo de Chile, Agosto de 2015. 16.
- Monetta, P., & Ibañez, A. "Preliminary Results of Soil Biological and Chemical Properties after land spreading Alperujo in Intensively-Managed Olive Orchards in San Juan, Argentina." Edited by Vita Serman F. et al. *Acta Hort.*, 2014: 693-700.
- Monetta, P., Bueno, L., et al. "Short-term dynamics of soil chemical parameters after application of alperujo in high-density drip-irrigated olive groves in Argentina." *International Journal of Environmental Studies*. 69, no. 4 (2012): 578–588.
- Morillo, J.A. *Biorremediación del alperujo: estudio de la microbiota asociada y producción del exopolisacárido jamilano*. Tesis Doctoral., Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología., Universidad de Granada., Granada, España.: Editorial de la Universidad de Granada., 2007, 136.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., et al. "Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes." *Appl. Microbiol. Biotechnology.*, no. 85 (2009): 25-39.
- Mussio, D., Ceci, L.N., et al. «Recuperación de Biofenoles de Alperujo con diferentes solventes.» *XVI CYTAL*. Mar del Plata, Argentina., 2017. 1-7.
- Ntougias, S., Bourtzis, K., et al. «The Microbiology of Olive Mill Wastes.» *BioMed Research International* 2013 (2013): 1-16.
- Obied, H.K., Allen, M.S., et al. "Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste." *J. Agric. Food Chem.* 53, no. 4 (2005): 823-837.
- Ouzounidou, G., Zervakis, G.I., et al. "Raw and Microbiologically Detoxified Olive Mill Waste and their Impact on Plant Growth." *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology.*, no. 4 (2010): 21-38.

**Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.**

- Paroldi, H.E. *Efectos de la Utilización de Residuos olivícolas como enmienda orgánica sobre la calidad biológica y fisicoquímica de suelos cultivados con *Olea europea* L. en San Juan.* Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Cuyo., San Juan: Universidad Nacional de Cuyo., 2017, 158.
- Pierantozzi, P., Zampini, C., et al. "Physico-chemical and toxicological assessment of liquid wastes from olive processing-related industries." *J Sci Food Agric.*, no. 92 (2012): 216–223.
- Ranal, M.A., & Garcia-de Santana, D. "How and why to measure the germination process?" *Revista Brasil. Bot* 29, no. 1 (2006): 1-11.
- Rodríguez, I., Adam, G., et al. «Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas.» *Agricultura*, nº 912 (2008): 836-838.
- Rodríguez, M., Gil, R., Rodríguez, L., Vallejo, M., Cornejo, V., Gines, L., Rodríguez Gutiérrez, G., Monetta, P. «Recuperación de compuestos fenólicos de residuos olivícolas: selección de variables relevantes y optimización del proceso.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y agroindustriales del NOA y Cuyo.* San Juan., 2018. 200-204.
- Rodríguez-Gutiérrez, G. *Prólogo.* Vol. 1, de *Libro de Comunicaciones y Trabajos completos, del II Simposio de Residuos Agropecuarios del NOA y Cuyo, Argentina.*, de Monetta, P.M., Paroldi, H.E., & Miguel, R.E., 343. San Juan, San Juan: INTA Ediciones., 2018.
- Rodríguez-Gutierrez, G., & Monetta, P. «Subproductos del olivar: Recuperación de compuestos fenólicos. Experiencias en España y Argentina.» *Ciclo virtual de seminarios internacionales: Avances en olivicultura y elaiotecnia.* INTA, CRILLAR-CONICET, CREA, UNdeC, Chile OLIVA, Min. Agric, Gand y Pesca de la Rep.Arg. San Juan, San Juan, 8 de julio de 2021.
- Saadi, I., Laor, Y., et al. "Land spreading of olive mill wastewater: Effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity." *Chemosphere (2007)*, no. 66 (2007): 75–83.
- Sánchez-Sánchez, R. *Relaciones entre diversidad microbiana y parámetros ambientales durante el compostaje de alperujo.* Tesis de Grado, Facultad de Ciencias., Universidad de Chile., Santiago de Chile.: Universidad de Chile., 2015, 85.
- Shade, A., Peter, H., et al. "Fundamentals of microbial community resistance and resilience." *Frontiers in Microbiology* 3, no. 417 (2012): 19.
- Soberón, L.F., Carelli, A.A., et al. "Method for phenol recovery from “alperujo”: numerical optimization." *European Food Research and Technology.*, 2019: 1-10.
- Tsioulpas, A., Dimou, D., et al. "Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity." *Bioresource Technology.*, 2002: 251–257.
- Usaquen-Alvarado, S.M. «Aprovechamiento y valorización del alperujo tratado termicamente como: fertilizante biológico y fuente de Hidroxitirosol.» Tesis de Grado., Facultad de Ciencias., Pontificia Universidad Javeriana, Granada, Granada, 2008.
- Xiros, Ch., Topakas, E., et al. "Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*." *Bioresource technology.* (Elsevier), no. 99 (2008): 5427-5435.

Capítulo 5: Análisis de fitotoxicidad de Extractos acuosos (EAs) y Agua de Alperujo (AA) sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

Zuorro, A. Iannone, A., et al. "Water–Organic Solvent Extraction of Phenolic Antioxidants from Brewers' Spent Grain." *Processes* 7, no. 126 (2019): 2-11.

Capítulo 6: Desarrollo y producción de carotenoides por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, *Rh. glutinis* Y54 y *Rh. graminis* Y52 sobre medios derivados del Alperujo con diferentes niveles de compuestos fenólicos.

## 6.1. Introducción

El alperujo constituye un hábitat único y complejo del que se han aislado una importante biodiversidad de levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Ntougias et al., 2013; Bleve et al., 2011; Romo-Sanchez et al., 2010; Borja et al., 2006; Ben-Sassi et al., 2008; Giannoutsou et al., 2004; Ramos-Cormenzana, 1986). No obstante, las altas concentraciones de sales, azúcares y el pH ácido, favorecerían en mayor medida al desarrollo de levaduras osmotolerantes, en detrimento de otros microorganismos presentes (Ntougias et al., 2013; Arroyo-Lopez et al., 2006; Romo-Sanchez et al., 2010; Giannoutsou et al., 2004; Mouncif et al., 1993; Ben-Sassi et al., 2008). En efecto, la población de levaduras en alperujo y alpechines es notablemente heterogénea (Bleve et al., 2011; Ntougias et al., 2013; Romo-Sanchez et al., 2010; Mouncif et al., 1993). Asimismo, la diversidad de estos microorganismos suele ser mayor en los subproductos olivícolas, en comparación a la de las aceitunas (Romo-Sanchez, et al., 2010; Ben-Sassi et al., 2008; Mouncif et al., 1993). Usualmente, los géneros más representativos aislados en los residuos olivícolas son: *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Debaryomyces* y *Kluyveromyces* (Bleve et al., 2011; Jarboui et al., 2012; Romo-Sanchez et al., 2010; Ntougias et al., 2013; Arroyo-Lopez et al., 2006; Borja et al., 2006; Morillo-Perez, 2007; Ben-Sassi et al., 2008; Giannoutsou et al., 2004; Mouncif et al., 1993).

En el caso de las levaduras aisladas en el alperujo, tienen actividad celulasa,  $\beta$ -glucanasa,  $\beta$ -glucosidasa, peroxidasa y poligalacturonasa, lo que les permite poder degradar sales, azúcares, proteínas, celulosa y polifenoles de bajo peso molecular (Ntougias et al., 2013; Romo-Sanchez et al., 2010; Jarboui et al., 2012; Giannoutsou et al., 2004; Ramos-Cormenzana et al., 1986).

Como se mencionó en los capítulos anteriores, el impacto ambiental y fitotóxico que se le adjudica al alperujo, se debe principalmente a la elevada concentración de compuestos fenólicos (Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Lama-Muñoz et al., 2019; Soberón et al., 2019; Morillo-Perez, 2007). El alperujo retiene alrededor del 98% de estos compuestos, mientras que menos del 2% se transfiere al aceite (Fermoso et al., 2018; Mussio et al., 2014). De ahí que, diferentes autores afirman que, sin un tratamiento previo, este residuo lignocelulósico puede provocar la contaminación del suelo y el agua a largo plazo (Monetta et al., 2012; Aranda et al., 2006; McNamara et al., 2008; Ntougias et al., 2013; Dellagreca et al., 2001; Dermeche et al., 2013; Mekki et al., 2007; Laurent et al., 2015; González et al., 1994).

Sin embargo, son numerosos los antecedentes referidos a las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos del alperujo y sus beneficios para la salud y para la conservación de alimentos; por lo que, los compuestos fenólicos generan gran interés para diferentes sectores (Usaquen-Alvarado, 2008; Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Obied et al., 2005; Lama-Muñoz et al., 2019). Además, el cambio en la preferencia por parte de los consumidores hacia productos con ingredientes y aditivos naturales, incrementan la tendencia del mercado hacia su uso, estimulando la búsqueda de nuevas fuentes (Thakur y Azmi, 2013; Socaci et al., 2017; Fermoso et al., 2018; Mihalcea et al., 2011). Por lo tanto, la recuperación de compuestos fenólicos desde los subproductos olivícolas, permitiría su aprovechamiento e incorporación en el circuito industrial, para ser utilizados con diferentes aplicaciones (Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Lama-Muñoz et al., 2019; Berbel et al., 2018; Fermoso et al., 2018; Fernández-Bolaños et al., 2008).



Actualmente, se están evaluando distintos métodos de extracción y purificación de los compuestos fenólicos presentes en desechos olivícolas. Por ejemplo, extracciones líquido-líquido y con fluídos supercríticos. También, separaciones por membranas y a partir de sistemas cromatográficos específicos (Rodríguez-Gutierrez y Monetta, 2021; Çelik et al., 2020; Lama-Muñoz et al., 2019; Renzi et al., 2018; Rubio-Senent et al., 2013; Lama-Muñoz et al., 2011).

Sin embargo, el uso integral del alperujo requiere previamente, de tratamientos para romper su compleja estructura lignocelulósica y así poder liberar los compuestos de interés (Lama-Muñoz et al., 2011; Rubio-Senent et al., 2013; Rodríguez-Gutierrez et al., 2007; Usaquen-Alvarado, 2008). Fernández-Bolaños y colaboradores (Instituto de la Grasa- (CSIC)- Sevilla, España), desarrollaron y patentaron un nuevo tratamiento hidrotermal para el Alperujo que facilita la solubilización y recuperación de hidroxitirosol (Sevilla, España. Patent No. US 6,849,770 B2 , 2005). Mediante este método, la biomasa es tratada con vapor de agua a elevadas presiones, por períodos breves de tiempo, al que se le suma un corto período de despresurización (Rubio-Senent, 2011; Lama-Muñoz et al., 2019; Fernández-Bolaños et al., 2008; Fernandez-Bolaños et al., 2002; Usaquen-Alvarado, 2008).

Mediante este tratamiento se obtiene, por un lado, la fracción líquida (L) enriquecida en compuestos bioactivos (compuestos fenólicos y azúcares) y, por otro lado, un sólido rico en celulosa que presenta una mejor digestibilidad lo que permite ser reutilizado, por ejemplo, como suplemento nutricional en piensos de rumiantes (Lama-Muñoz et al., 2019; Rodríguez-Gutierrez et al., 2007; Ghilardi et al., 2022; Molina-Alcaide y Yañez-Ruiz, 2008; Couto y Salerno, 2019; Valiente et al., 1995). No obstante, durante

el proceso se generan nuevos compuestos que resultan de la degradación de los azúcares como, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos (Ghilardi et al., 2022; Puc-Blanco 2021 ). Sin embargo, estos productos resultantes se los puede extraer mediante cromatografía en columna (Fernández-Bolaños et al., 2002). De esta manera, se obtiene un líquido con gran potencial para ser utilizado en distintos bioprocesos (Caroca, E., et al 2021; Rodríguez-Gutierrez et al., 2007). El método hidrotermal genera un residuo más amigable con el medio ambiente, y reduce los costos económicos y energéticos debido a que elimina el uso de productos químicos ácidos y básicos (Rubio-Senent, 2011). Asimismo, permite que se separen de manera más eficiente las fases líquida y sólida del alperujo (Lama-Muñoz et al., 2019).

Como ya se mencionó, los carotenoides presentan gran importancia económica (Rodríguez-Concepcion et al., 2018; Gavilán-Bravo, 2017; Vargas-Murga, 2017; Ungureanu et al., 2012), debido a que se emplean como colorantes y aditivos en suplementos nutricionales, piensos, productos cosméticos y farmacéuticos, (Aksu y Tugba-Eren, 2005 ; Cheng y Yang, 2016 ; Veiga-Rodrigues et al., 2019; Surai et al., 2001; Husseiny et al., 2018). Además, es un opción interesante obtenerlos mediante bioprocesos mas amigables con el medio ambiente y que abaranten los costos de producción (ver Introducción General, páginas 20-28).

En los capítulos anteriores, se demostró que la cepa *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 puede crecer y sintetizar carotenoides en extractos acuosos de alperujo (EAs) de diferente concentración en la fracción líquida del alperujo fresco (AA), y en medios sólidos constituidos por este subproducto. Sin embargo, la elevada concentración de

compuestos fenólicos, característicos de estos medios, podría limitar el rendimiento del proceso. En este capítulo, se evaluó la capacidad de desarrollo y síntesis de carotenoides de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, cuando desarrolla en medios desfenolizados por diferentes métodos (EAs y AA desfenolizados mediante extracción con solventes y L desfenolizada mediante cromatografía en columna). Además, el uso de cepas provenientes de ambientes similares al proporcionado por los medios derivados del alperujo podría sumar un factor de mejora en el proceso. Es por ello que también se comparó la capacidad de crecimiento y producción de carotenoides de *Rh. glutinis* Y54 y *Rh. graminis* Y52, en L desfenolizada mediante cromatografía en columna. Estas cepas fueron aisladas desde el proceso de fermentación de aceitunas de mesa.

### Objetivo General

- Explorar una estrategia para revalorizar el alperujo acoplando la recuperación de compuestos fenólicos con la producción de carotenoides.

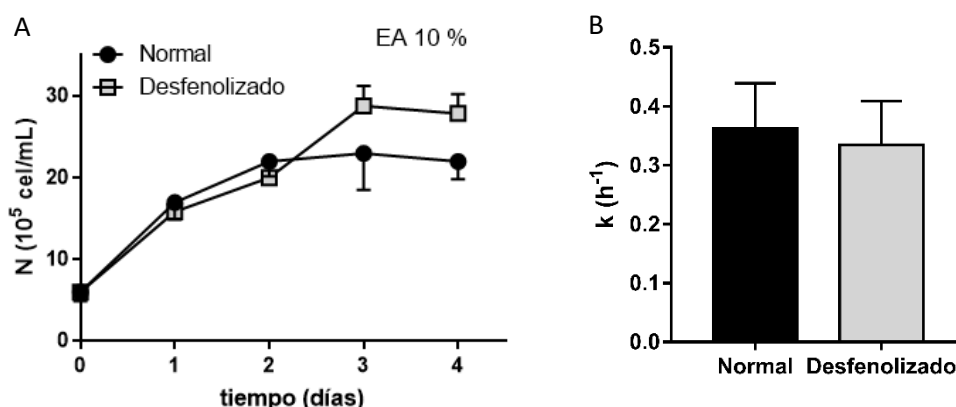
### Objetivos Específicos

- Caracterizar y comparar el desarrollo y producción de carotenoides por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, en EA 10 %, EA 30 % y AA de concentración de compuestos fenólicos normal y reducida mediante partición líquido-líquido (desfenolizados).
- Caracterizar la fracción líquida obtenida del Alperujo sometido a tratamiento hidrotermal normal y desfenolizada mediante cromatografía en columna para utilizarla como medio de cultivo de levaduras del género *Rhodotorula* (*Rh. mucilaginoso* LPSC 638, *Rh. glutinis* Y54, *Rh. graminis* Y52)..
- Evaluar el rendimiento en el desarrollo y la producción de carotenoides de dos cepas del género *Rhodotorula* (*Rh. glutinis* Y54 y *Rh. graminis* Y52), aisladas de la fermentación de aceitunas de mesa sobre la fase líquida desfenolizada derivada del Alperujo sometido a tratamiento hidrotérmico.
- Comparar el crecimiento y la producción de carotenos de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, *Rh. glutinis* Y54, *Rh. graminis* Y52 en la fase líquida desfenolizada derivada del Alperujo sometido a tratamiento hidrotérmico.

## 6.2. Resultados y Discusión

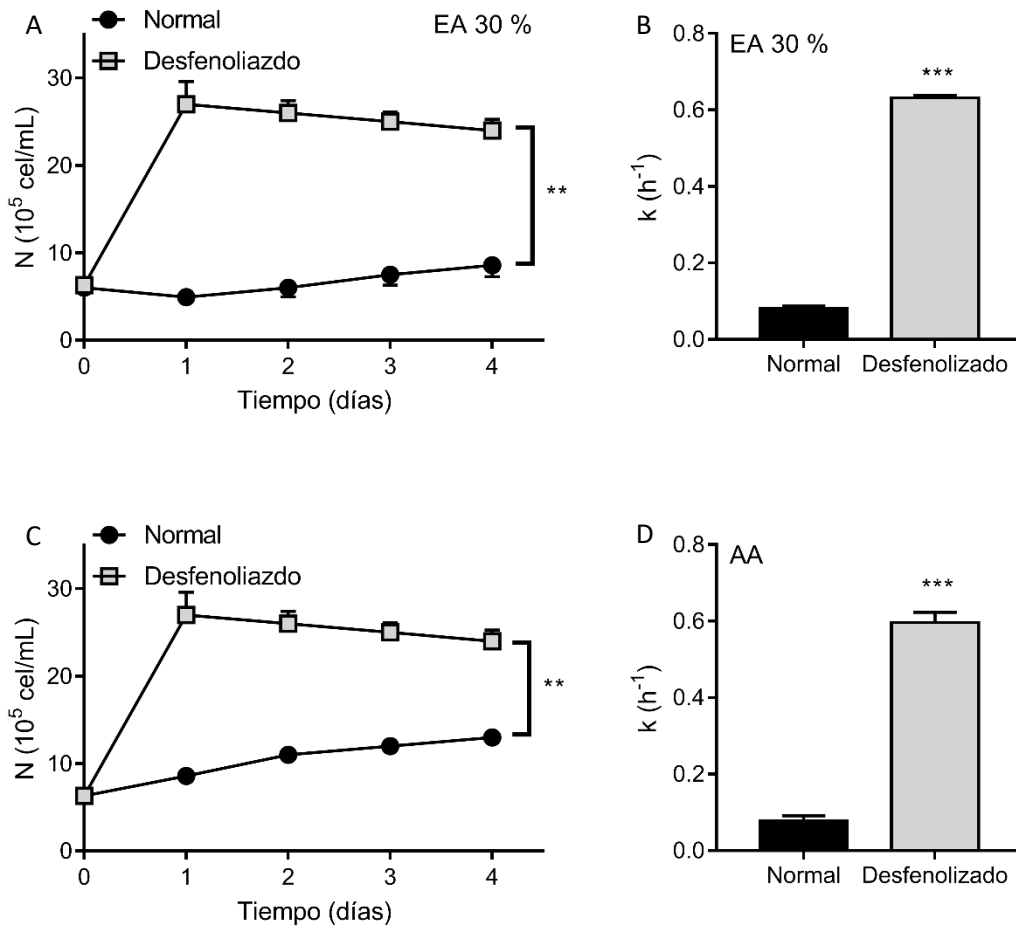
### 6.2.1. Caracterización del crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en medios normales y desfenolizados.

Como se mencionó en la Introducción General (pag. 15-17) y en el Capítulo 1 (pág. 73), los compuestos fenólicos presentes en los subproductos olivícolas tienen actividad antimicrobiana (Morillo et al., 2009; Usaquen-Alvarado, 2008; Sayadi et al., 2000; Allouche et al., 2004). En consecuencia, la extracción de los mismos, permitiría que los medios derivados del alperujo (EAs y AA), sean sustratos más adecuados para ser empleados en bioprocesos como, la producción de pigmentos carotenoides por levaduras del género *Rhodotorula*. Al mismo tiempo, se recuperarían los compuestos fenólicos que, como se explicó anteriormente, tienen múltiples aplicaciones. Por esta razón, se decidió desfenolizar los medios de mayor concentración (EA 30% y AA) y, además, el EA 10%, como modelo de un medio menos concentrado. En el Capítulo 1 (Fig. 1.7) también se demostró que, mediante la técnica de desfenolización partición líquido-líquido, (acetato de etilo), se obtuvo una reducción en el contenido de compuestos fenólicos de un 45% para los EAs y de un 30% para el AA.



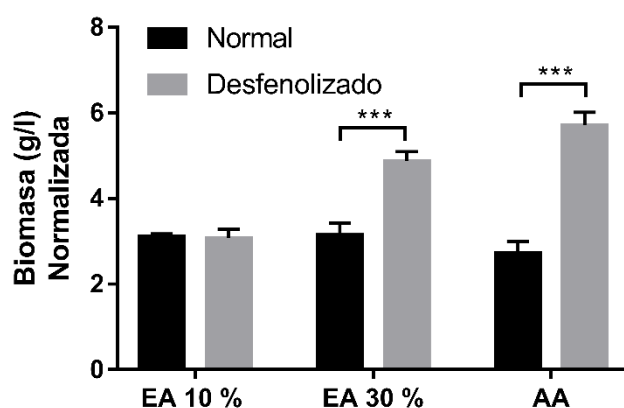
**Fig. 6.1. A)** Desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, (n° de células/ mL) en EA 10% bajo la condición normal (círculos negros) y desfenolizada (cuadrados grises) de compuestos fenólicos, durante cuatro días de incubación. **B)** Tasa de crecimiento máxima específica. Los datos se muestran como la media y S.D. (n = 5).

Como se observa en la Fig. 6.1, la levadura alcanza la fase estacionaria a los 2 días en el EA 10% (normal y desfenolizado), y no se detecta un período de latencia. Asimismo, ambas curvas de crecimiento están casi superpuestas, por lo que la desfenolización del EA 10% no modificaría el crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 38 (Fig. 6.1). Esto sugiere que la concentración de compuestos fenólicos presentes en el EA 10% no es inhibitoria para esta levadura, y por lo tanto la extracción de los mismos no afecta el crecimiento.



**Fig. 6.2.** A y C) Desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, (n° de células/ mL) en EA 30% y AA, bajo condición normal (círculos negros) y desfenolizada (cuadrados grises) durante cuatro días de incubación. B y D) Tasa de crecimiento máxima específica. Los datos se muestran con media y S.D. (n = 5).

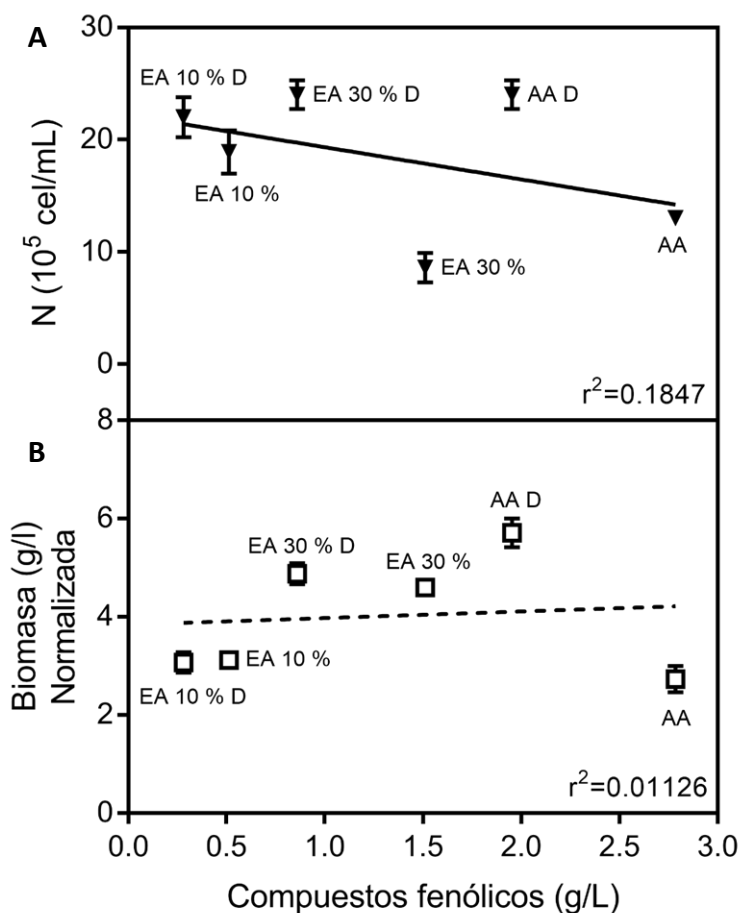
Sin embargo, en el EA 30% y en AA se halló un número significativamente mayor de células, cuando la levadura crece bajo la condición desfenolizada, respecto a la normal, siendo este efecto más evidente en el EA 30% (Fig. 6.2 A y C). En los medios desfenolizados se alcanzó la fase estacionaria en el día 1 y no se observó fase Lag, a diferencia de los medios normales en los cuales se observó la fase Lag y se alcanzó la fase estacionaria en el día 2 (ver Fig. 2.5). Además, fue evidente una aceleración en la división celular producto de la desfenolización (Fig. 6.2 B y D). Cuando se mide la biomasa como peso seco (g/L), se observa un comportamiento similar. Es decir, al comparar la condición normal con la desfenolizada, se detecta un aumento de la biomasa cuando la levadura crece en EA 30 % y en AA. (Fig. 6.3).



**Fig. 6.3.** Biomasa final de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 medida como peso seco (g/L), obtenida en los tres medios analizados bajo la condición normal y desfenolizada. Los datos se muestran con media y S.D. (n = 5). \*\*\* indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Aunque es evidente que la desfenolización favorece el desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, el contenido de compuestos fenólicos y el crecimiento de la levadura (medido como número de células o peso seco) no están correlacionados linealmente (Fig. 6.4). De hecho, se obtiene casi el mismo número de células en todos los medios desfenolizados a pesar de que el contenido de compuestos fenólicos varía

entre 0,3 g/L (EA 10 % desfenolizado) y 1,95 g/L (AA desfenolizado). Por ejemplo, si bien la condición desfenolizada del AA tiene un contenido de compuestos fenólicos mayor al EA 30% sin desfenolizar ( $1,95 \pm 0,08$  g/L vs.  $1,51 \pm 0,03$  g/L), se triplicó el número de levaduras y casi se duplicó la biomasa (Fig. 6.4).



**Fig. 6.4. A)** Número final de células obtenidas en función de la concentración de compuestos fenólicos (g/L) de los distintos medios. **B)** Valores de peso seco (g/L) en función de la concentración de compuestos fenólicos (g/L) de los distintos medios. Los datos se muestran con media y S.D. ( $n = 5$ ).

Estos resultados sugieren que la clase de compuestos fenólicos remanentes, podrían ser determinantes para el crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, más que la concentración total de compuestos fenólicos. El acetato de etilo extrae con diferente selectividad los distintos compuestos fenólicos presentes en los subproductos olivícolas,



siendo más eficiente para los de bajo peso molecular, como hidroxitirosol, tirosol y flavonoides (Allouche et al., 2004). A diferencia de éstos, los de alto peso molecular, son más recalcitrantes a la biodegradación. Es decir, no pueden ingresar a las células y por lo tanto, se espera que sean menos tóxicos para los microorganismos (Sayadi et al., 2000).

En efecto, tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína, luteolina y apigenina son eficaces contra cepas de levaduras de las especies *Aureobasidium pullulans* y *Saccharomyces cerevisiae* (Canal et al., 2019). Asimismo, levaduras oleaginosas como *Candida rugosa* (PYCC 3238 y CBS 2275), *Candida cylindracea* (CBS 7869) y *Yarrowia lipolytica* (W29) fueron capaces de crecer en presencia de 1 g/L de compuestos fenólicos comúnmente encontrados en subproductos olivícolas (catecol, hidroxitirosol, ácido cafeico, tirosol y oleuropeína) (Gonçalves et al., 2009). En todos los casos se obtuvo menos biomasa; y con ácido cafeico y catecol, se observó una disminución significativa de la tasa de crecimiento.

Estudios realizados en nuestro laboratorio, utilizando el mismo método de extracción que en esta tesis, mostraron que el ácido cafeico y el catecol no estaban presentes entre los compuestos fenólicos extraídos del alperujo de la variedad Arbequina. Sin embargo, se encontraron niveles significativos de hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína, demetiloleuropeína y verbascósido ( $45,3 \pm 4,1$ ;  $33,4 \pm 5,2$ ;  $53,7 \pm 12,4$ ;  $86,5 \pm 4,3$  y  $82,4 \pm 16,5$  mg/Kg) de alperujo (b.s.), respectivamente, en el extracto de acetato de etilo (Mussio et al., 2014 ; Mussio et al., 2017). Es decir, que la extracción con acetato de etilo, removería una parte de los compuestos fenólicos presentes en los EAs y el AA, que correspondería a los de mayor actividad antimicrobiana.

Sin embargo, todavía quedarían algunos que limitarían el desarrollo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638. Genethliou, et al., (2020) demostraron que tras un proceso de digestión anaeróbica, los ácidos 4-hidroxibenzoico, el ácido p-cumárico y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, eran los compuestos fenólicos más recalcitrantes presentes en las aguas residuales de las almazaras. Estos compuestos no se extrajeron eficientemente con acetato de etilo. Además de lo mencionado, otros factores como el alto contenido de materia orgánica y la concentración elevada de sales, también contribuyen a la toxicidad del alperujo (Ntougias et al., 2013; Ouzounidou et al., 2010; Ben-Sassi et al., 2008; Borroni et al., 2017; Ghilardi et al., 2022). La mayoría de estos compuestos permanecen en los medios derivados del alperujo (normales y desfenolizados), lo que perjudicaría el crecimiento microbiano.

#### 6.2.2. Caracterización de los medios normales y desfenolizados luego del crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638.

Como podemos observar en la Fig. 6.5, se registraron variaciones en el pH durante el período de desarrollo de la levadura en EA 10 % (normal y desfenolizado) y en EA 30 % (normal y desfenolizado). Cabe recordar que, si bien la desfenolización con acetato de etilo acidifica el medio, el pH fue corregido previo a la inoculación con *Rh. mucilaginoso* LPSC 638.

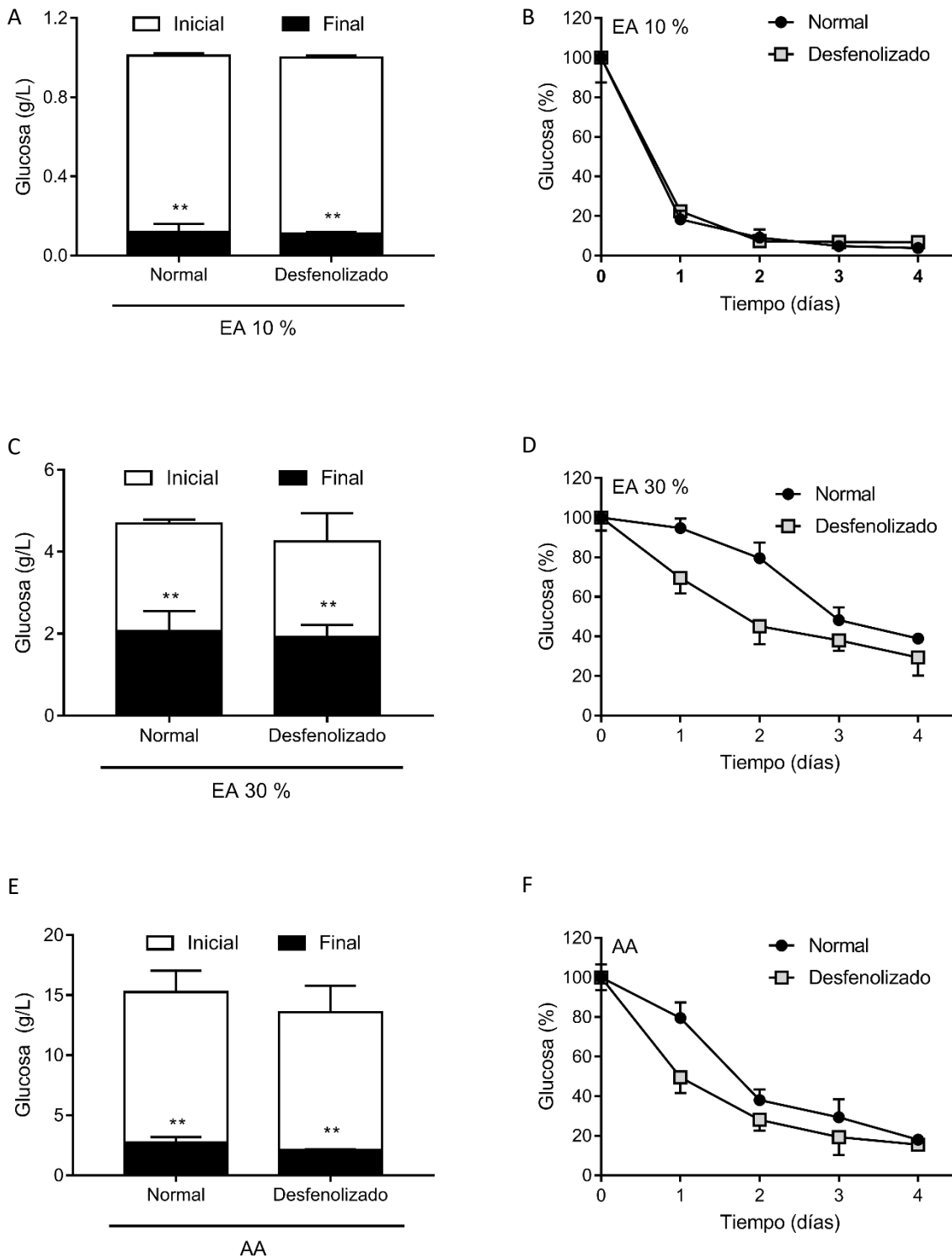
En el EA 10%, en la condición normal (Fig. 6.5 A), los valores de pH fueron significativamente superiores a los registrados en las muestras desfenolizadas ( $p < 0,0001$ ). Esta tendencia se observó durante todo el período de incubación de la levadura. Además, en ambos medios se observa una alcalinización producto del crecimiento de la levadura (Fig. 6.5 B). Las levaduras con un fuerte metabolismo

oxidativo como *Rhodotorula spp.*, pueden consumir ácidos orgánicos como sustrato y, por lo tanto, aumentar el pH del medio durante su crecimiento (ver Fig. 2.9).

En el EA 30 %, en cambio, no se observaron diferencias en el pH durante el crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en los medios normal y desfenolizado (Fig. 6.5 C), aunque en ambos medios se obtiene un pH mayor a la inicial, hacia el fin de la incubación (Fig. 6.5 D). El incremento en el pH en los EAs ocurre en el primer día de cultivo y luego se llega a una meseta. Mientras que, en el AA, por otro lado, no hay variaciones en el pH (Fig. 6.5 D y F).

Como se describió en el Capítulo 1, (Tabla 1.1, Figs 1.4), el alperujo presenta una gran concentración de azúcares simples y complejos (Fernandez-Bolaños et al., 2004; Ouzounidou et al., 2010). Estos carbohidratos, se hallan en diferentes concentraciones según la variedad de aceitunas y las condiciones climáticas durante su desarrollo (Borja et al., 2006). Por otra parte, el contenido de glucosa no se vio afectado por la extracción de compuestos fenólicos (Fig. 1.9 A), debido a que este azúcar no es soluble en acetato de etilo (Mussio et al., 2017), por lo que estaría disponible para la levadura. En la Fig. 6.6, se muestra el consumo de glucosa por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, en todos los medios y en ambas condiciones.

En el Capítulo 2 (Tabla 2.1) se observó que, si bien la levadura asimila eficientemente la glucosa presente en AA y EAs normales, el consumo es significativamente mayor en el EA 10%, seguido por AA y el EA 30 %. Este mismo patrón se repite en los medios desfenolizados (Fig. 6.6). En el EA 10 % el consumo de glucosa fue de ~ 88 %, en el EA 30 % de ~ 56 %, mientras que en AA de ~ 82 %.



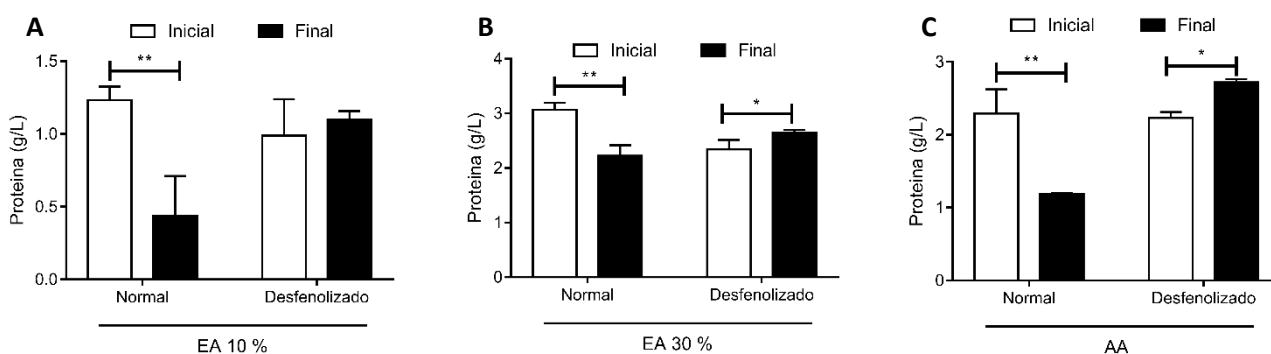
**Fig. 6.6.** Consumo de glucosa (g/L) por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 luego de crecer durante 4 días en **A)** EA 10%, **C)** 30% y **E)** AA, normal y desfenolizado. Consumo de glucosa, expresado como (%) en función del tiempo en EA 10% (**B)** EA 30% (**D)** y AA (**F)** en la condición normal (círculos negros) y desfenolizada (cuadrados grises). Los datos se muestran con media y S.D. (n = 5).

La desfenolización no afectó el consumo final de glucosa en ninguno de los medios.

Asimismo, en la Fig. 6.6 B, D y F se puede observar en los tres medios analizados y en

ambas condiciones, el consumo de glucosa de la levadura, en función del tiempo. En el EA 10 %, el curso temporal de la concentración de glucosa es similar en el medio normal y desfenolizado (Fig. 6.6 B). Sin embargo, en el EA 30 % y en el AA desfenolizados se observa una aceleración en el consumo de glucosa respecto de los medios con concentración normal de compuestos fenólicos (Fig. 6.6 C y D). Esto probablemente esté relacionado con el crecimiento más rápido de *R. mucilaginoso* LPSC 638 en estos medios.

Algunos flavonoides (luteolina y apigenina) y ciertos alcoholes fenólicos (hidroxitirosol y tirosol), pueden actuar como inhibidores de enzimas asociadas al metabolismo de azúcares, como la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa desde una concentración inhibitoria media máxima (IC50) de 0,6 mg/L (Figueiredo-González et al., 2019; Hamden et al., 2010; Lim et al., 2019; Rasouli et al., 2017). Es posible entonces, que la concentración de estos compuestos en la condición normal de AA y EA 30%, sea suficiente como para limitar el consumo de glucosa, respecto a la condición desfenolizada.



**Fig. 6.7.** Concentración de proteínas (g/L) en **A)** EA 10%, **B)** EA 30% y **C)** AA en medios normales y desfenolizados, antes (Inicial, barras blancas) y después (Final, barras negras) del desarrollo de *Rh. Mucilaginoso* LPSC 638 durante 4 días. Los datos se muestran como la media y S.D. (n = 6).

En cuanto al metabolismo de fuentes de nitrógeno, sólo observamos una disminución del contenido de proteínas (g/L) en los medios con concentración normal

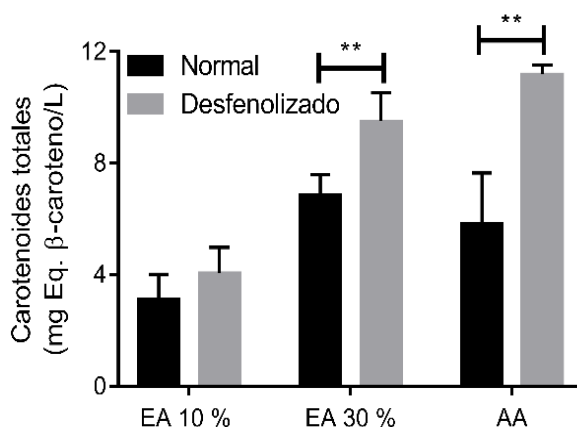
de compuestos fenólicos (Fig. 6.7). Mientras que, en el EA 30 % y AA desfenolizados el contenido de proteínas aumenta luego del desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 (Fig. 6.7 B y C). Este hecho podría deberse a la producción de enzimas extracelulares necesarias para el crecimiento de la levadura (Gunsalus et al., 1955). Es decir que, estimulando el crecimiento en los medios desfenolizados, el requerimiento de sustratos llevaría a la producción de enzimas para su utilización. Además de monosacáridos como glucosa y fructosa, *R. mucilaginosa* LPSC 638 consume estaquiosa, sacarosa y manitol (Ghilardi et al., 2020). Algunos de estos compuestos requieren la secreción de enzimas para su metabolización (Wang et et al., 2021; Barbosa et al., 2018). Además, las levaduras del género *Rhodotorula* pueden producir lipasas, invertasas, glucosidasas, quitinasas y proteasas, entre otras enzimas (Barbosa et al., 2018; Hu et al., 2016; Lario et al., 2020; Ayadi et al., 2018). Asimismo, es posible que, luego de la desfenolización, otras fuentes de nitrógeno pueden estar disponibles (Messenguy et al., 2006).

Como se ha mencionado en el Capítulo 1 (Fig 1.10), *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 utiliza la proteína de manera menos eficiente que otras fuentes de nitrógeno como, peptona, urea y  $\text{NO}_3$ . Este hecho, podría limitar su crecimiento y también modificar su metabolismo, favoreciendo la síntesis de diversos compuestos, como los carotenoides, y acumulado el exceso de carbono como sustancias de reserva (Ghilardi et al., 2020).

### 6.2.3. Producción de carotenoides de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en medios desfenolizados y con concentración normal de biofenoles.

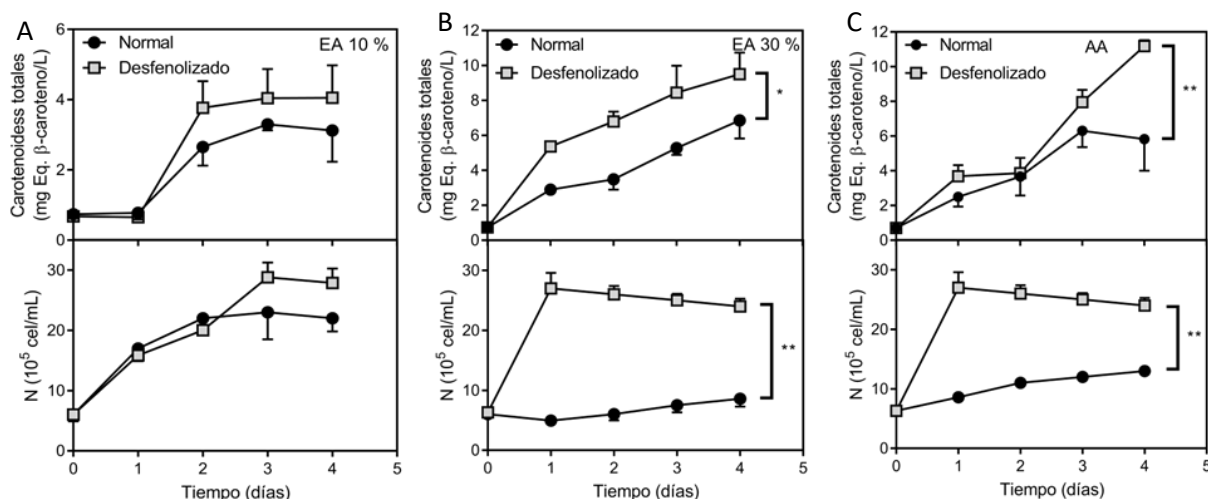
La producción total de carotenoides también se vio afectada por la desfenolización. En el EA 30% y AA, la reducción en la concentración de compuestos fenólicos, genera un aumento en la síntesis de carotenoides respecto a la condición

normal, aumentando la productividad volumétrica en ambos medios (Fig. 6.8). El efecto es mayor en AA respecto de EA 30% (Fig. 6.8). Por otro lado, en el EA 10%, la producción de carotenoides (mg Eq.  $\beta$ -caroteno/ L) no se ve afectada por el proceso de desfenolización.



**Fig. 6.8.** Producción volumétrica total de carotenoides (mg Eq.  $\beta$ -caroteno/L) producidos por *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 en EA 10%, 30% y AA, bajo condición normal (barras negras) y reducida en compuestos fenólicos (barras grises), luego de 4 días de cultivo. Las barras muestran la media y S.D. (n = 3). \*\* p < 0,001).

En la Fig. 6.9, se puede observar la evolución temporal de la concentración de carotenos para todos los medios junto con el crecimiento de la levadura. La producción de estos pigmentos aumenta cuando la levadura inicia la fase estacionaria, la cual en el EA 10%, ocurre en el 2° o 3° día (Fig. 6.9 A), y en el EA 30% y en el AA, en el 1° día de incubación (Fig. 6.9 B-C). Esta característica es esperable, debido a que los carotenoides son metabolitos secundarios y su acumulación en la mayoría de las levaduras, comienza en la fase logarítmica tardía y continúa en la fase estacionaria (Moliné et al., 2009; Mannazzu et al., 2015; Frengova y Beshkova, 2008). La síntesis de estos pigmentos constituiría, un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo presente en el medio (Moliné et al., 2009).



**Fig. 6.9.** Producción de pigmentos carotenoides en mg Eq. β-caroteno/L (panel superior) y biomasa en cel./mL (panel inferior en **A**) EA 10%, **B**) EA 30% y **C**) AA, en la condición normal (círculos negros) y desfenolizada (cuadrados grises) de cada medio. Los datos se muestran como la media y S.D. (n = 5). \* p < 0,01 \*\* p < 0,001.

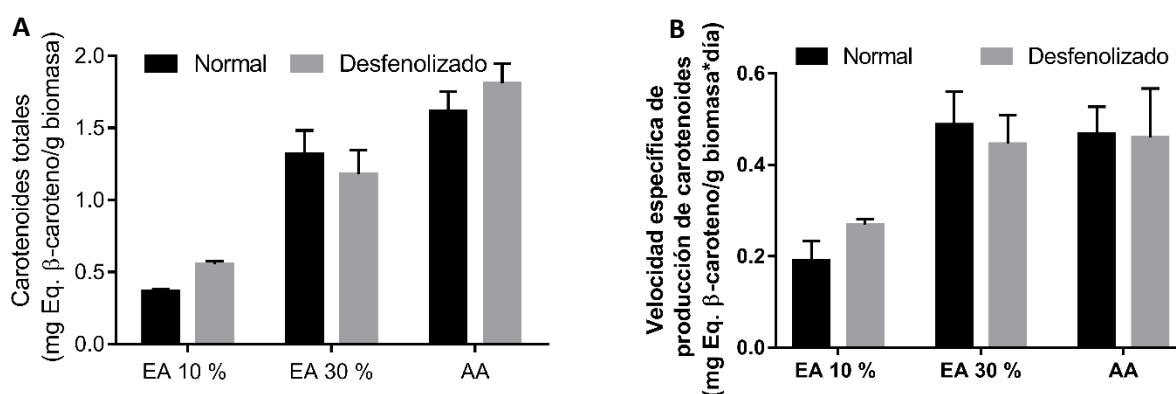
En AA, la desfenolización no solo aumenta la cantidad total de carotenoides, sino que también cambia el patrón de producción (Fig. 6.9 C). Es decir, en la condición normal de AA, la levadura alcanza una meseta de producción a los 3 días, mientras que en la condición desfenolizada la síntesis de carotenoides continúa inclusive, hasta el 4° día de incubación. De esta manera, el proceso de desfenolización permitiría el aumento en la producción volumétrica de carotenoides, tanto en EA 30% como en AA. Este hecho, podría deberse a la mayor biomasa producida (Fig. 6.9, panel inferior).

Como se ha mostrado en el Capítulo 2, (Fig. 2.13), la producción volumétrica total de carotenoides en medios de concentración normal de compuestos fenólicos, fue significativamente mayor en EA 30% y AA, en comparación a los EAs de menor concentración de alperujo, como el EA 10%. De ahí que, tanto EA 30% y AA, constituyan para *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, mejores medios para la producción de estos pigmentos lipídicos.



Dado que la desfenolización mejora el crecimiento de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, el aumento en la producción volumétrica de carotenoides podría deberse a la mayor biomasa producida. De hecho, cuando determinamos la producción específica de carotenoides, no se observaron diferencias entre los medios normales y desfenolizados (Fig. 6.10 A). Lo mismo ocurre con la tasa de producción de carotenoides específicos calculada al final del experimento (Fig. 6.10 B). Por lo tanto, en los medios desfenolizados, la disminución de la toxicidad podría cambiar el metabolismo de *Rhodotorula* hacia la división celular (es decir, la producción de biomasa) sin un efecto perjudicial sobre el contenido de carotenoides celulares (Fig. 6.10 A).

Es decir que, mediante la desfenolización, no solo se obtienen compuestos fenólicos valiosos y más carotenoides, sino también más biomasa. La biomasa de levadura es un producto rico en proteínas y carbohidratos que podría recuperarse fácilmente, una vez que se extraen los carotenoides (Banerjee et al., 2022; Liu et al., 2021).

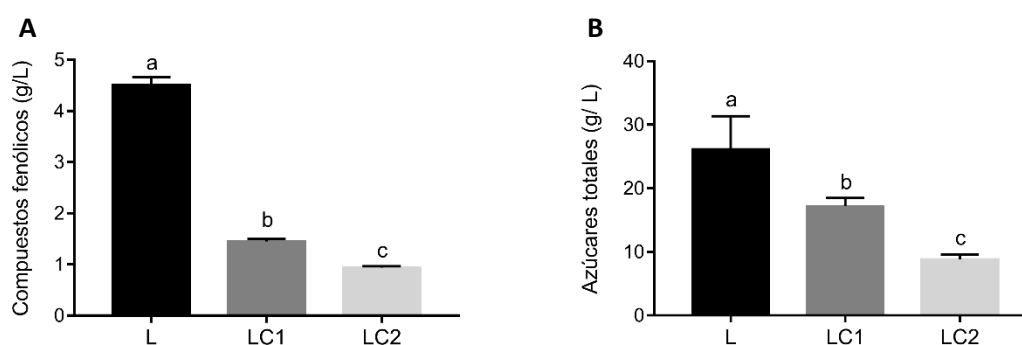


**Fig. 6.10. A)** Producción de carotenoides (mg Eq.  $\beta$ -caroteno/g biomasa por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en EA 10%, 30% y AA en condición normal (barras negras) y desfenolizada (barras grises). **B)** Tasa específica de producción de carotenoides (mg/g biomasa x día) de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en medios normales y desfenolizados calculada al final del experimento. Los datos se muestran con media y S.D. (n = 5).

#### 6.2.4. Crecimiento de tres especies de levaduras del género *Rhodotorula* en la fracción líquida del alperujo (AA) tratada hidrotermalmente

Fernández-Bolaños et al. (2002) desarrollaron y patentaron un tratamiento hidrotermal para el alperujo, que facilita la solubilización y recuperación de compuestos fenólicos. Con este tratamiento se obtiene una fracción líquida enriquecida en compuestos bioactivos (L) y un sólido de mayor digestión y fermentable (Lama-Muñoz et al., 2019). Los compuestos fenólicos presentes en L pueden purificarse fácilmente mediante cromatografía en columna (Fernández-Bolaños et al., 2002).

Como se muestra en la Fig. 6.11, después del tratamiento térmico, L mostró niveles altos de azúcares totales y compuestos fenólicos. Como era de esperar, se formó



**Fig. 6.11. A)** Concentración de polifenoles totales (g/L) hallados en L, LC1 y LC2 **B)** Concentración de azúcares totales (g/L), hallados en las fracciones Líquidas: (L) original, (LC1) con una pasada y (LC2) con dos pasadas a través de la columna cromatográfica. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

hidroximetilfurfural (HMF) durante el proceso, debido a las altas temperaturas (Tabla 6.1). Después del paso por la columna cromatográfica, la concentración de compuestos fenólicos se reduce en aproximadamente, un 68 % con una pasada (LC1) y en un 80 % con dos (LC2), (Fig. 6.11 A). Junto con los compuestos fenólicos, la concentración de azúcares totales también disminuyó, pero en menor medida (Fig. 6.11 B).

Los compuestos fenólicos más relevantes encontrados fueron el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG), tirosol e hidroxitirosol (Tabla 6.1). Los niveles de HMF se redujeron al pasar por la columna cromatográfica (Tabla 6.1).

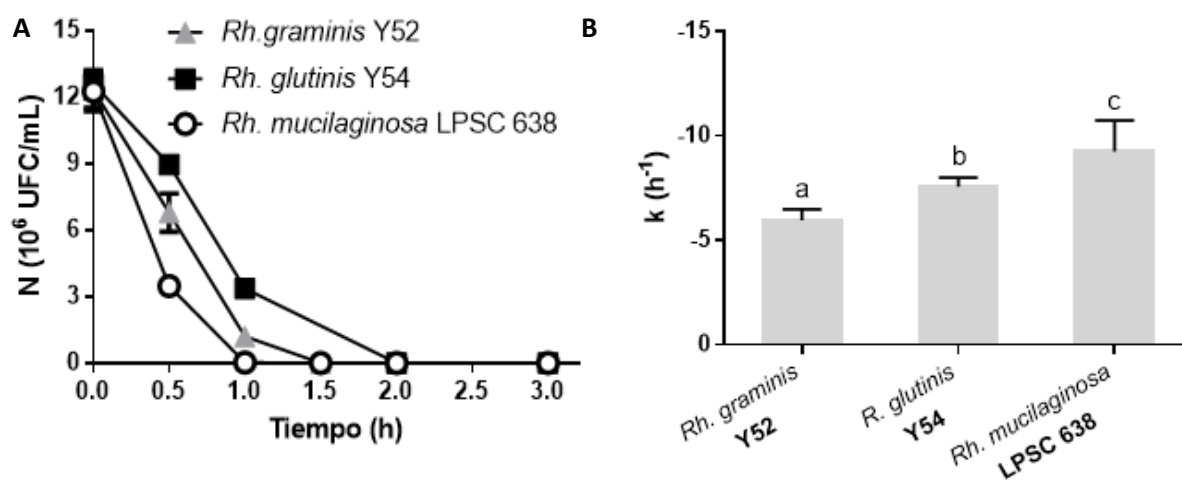
	Compuestos fenólicos totales (g/L)	HMF (mg/L)	DHPG (mg/mL)	Tirosol (mg/L)	Hidroxitirosol (mg/L)
L	4,5±0,2 <sup>a</sup>	4255±155 <sup>a</sup>	11.23±2.08 <sup>a</sup>	226.5±12.4 <sup>a</sup>	535.8±23.9 <sup>a</sup>
LC1	1,45±0,05 <sup>b</sup>	1365±84 <sup>b</sup>	7.84±1.34 <sup>a</sup>	94.50±8.50 <sup>b</sup>	22.55±3.30 <sup>b</sup>
LC2	0,94±0,03 <sup>c</sup>	298.5±15.6 <sup>c</sup>	7,74±1,7 <sup>a</sup>	5.10±0.98 <sup>c</sup>	7.17±2.80 <sup>c</sup>
LC2 Inicial*	0,93±0,05 <sup>c</sup>	401.68±24.78 <sup>d</sup>	8.81±1.14 <sup>a</sup>	5.88±0.46 <sup>c</sup>	6.75±1.01 <sup>c</sup>

**Tabla 6.1.** Concentración de compuestos fenólicos totales, HMF y los compuestos fenólicos más relevantes encontrados en los diferentes medios derivados del alperujo tratado hidrotermalmente. \*LC2 Inicial es el medio LC2 luego de ser autoclavado. Los valores se expresan como la media ± D.E., (n=3). En cada columna, letras diferentes significan valores estadísticamente diferentes (p<0.05). HMF: 5-hidroximetilfurfural DHPG: 3,4-dihidroxifenilglicol.

El proceso de esterilización por autoclavado, no modificó la concentración total de compuestos fenólicos (tirosol, hidroxitirosol o DHPG), (LC2 vs LC2 Inicial en Tabla 6.1). Sin embargo, aumentó la cantidad de HMF, aunque no llega a los niveles de L ni de LC1. Por lo tanto, luego de la recuperación de los compuestos fenólicos, se obtiene un medio (LC2) rico en azúcares, que presenta baja concentración de inhibidores como el HMF. Así, esta fracción líquida, podría ser utilizada como medio de cultivo para el crecimiento y producción de carotenoides por *Rhodotorula spp.* Para comprobar esta hipótesis, se realizaron cultivos con tres cepas del género *Rhodotorula*: *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, *Rh. glutinis* Y54 y *Rh. graminis* Y52. Estas dos últimas cepas, fueron aisladas durante el

procesamiento de aceitunas de mesa, mientras que, *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 fue obtenida a partir del banco de levaduras del Instituto de Botánica “Carlos Spegazzini” (ver capítulo Materiales y métodos).

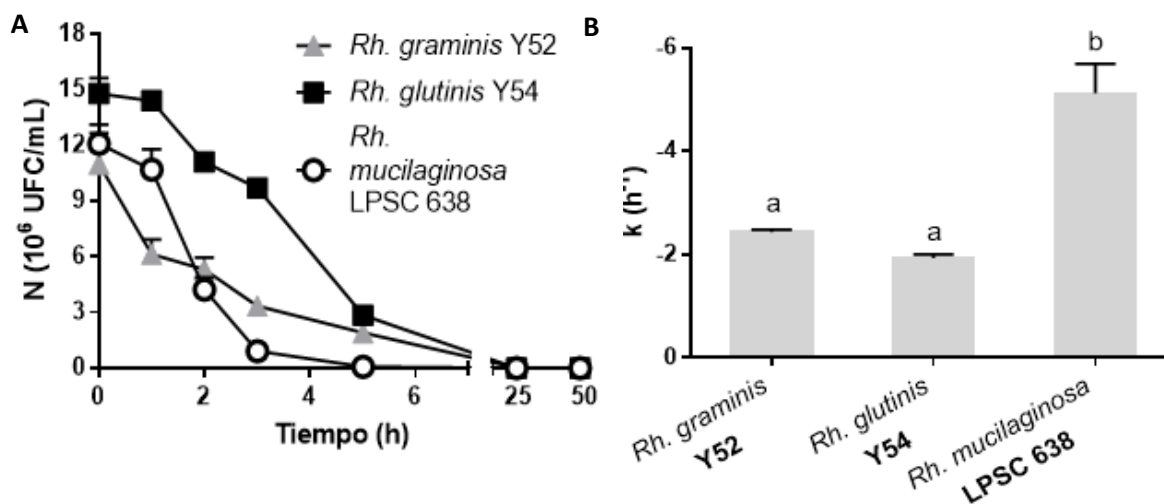
Como se observa en la Fig. 6.12 A, luego de 3 h de cultivo en L, el número de levaduras viables cae a 0 para las tres cepas analizadas.



**Fig. 6.12. A)** Desarrollo de *Rh. graminis* Y52, *Rh. glutinis* Y54 y *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 (UFC/mL), durante 3 horas de incubación, en la fracción líquida del alperujo luego del tratamiento térmico (L). **B)** Constante de inactivación (k) de cada levadura. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Esto demuestra la alta toxicidad de L, probablemente debida a los elevados niveles de compuestos fenólicos y HMF (Fig. 6.12 y Tabla 6.1) que inhibirían la capacidad de desarrollo de las levaduras. Además, *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 fue la levadura más sensible, como lo demuestra su mayor constante de inactivación (k), (Fig. 6.12 B). Es decir, *Rh. glutinis* Y54 y *Rh. graminis* Y52 que fueron aisladas de un subproducto olivícola estarían mejor adaptadas al entorno complejo que proporcionan estos medios, en comparación a *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. En consecuencia, serían más resistentes

(Romo-Sanchez et al., 2010; Ntougias et al., 2013; McNamara et al., 2008; Giannoutsou et al., 2004; Ramos-Cormenzana, 1986; Jarboui, et al. 2012).



**Fig. 6.13. A)** Desarrollo de las tres especies del género *Rhodotorula* (UFC/mL) en LC1. **B)** Constante de inactivación (k). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Por otra parte, en LC1 se observó la misma tendencia que en L (Fig. 6.13 A), aunque se obtienen menores constantes de inactivación (Fig. 6.13 B). Por lo tanto, LC1 sería menos tóxico que L, pero todavía persiste la capacidad de inhibir el desarrollo de las levaduras (Fig. 6.13 B).

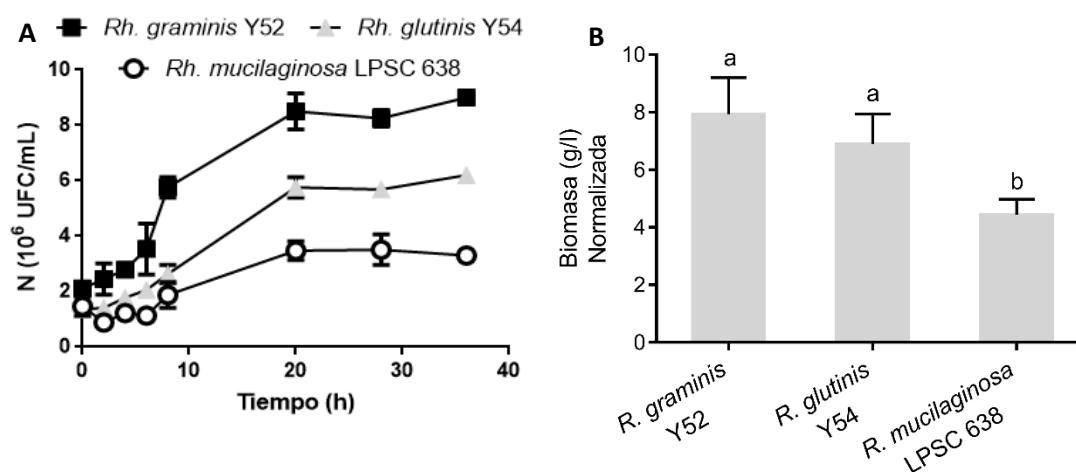
Es decir, si bien las tres cepas evaluadas sobrevivieron por más tiempo, no se observó crecimiento para ninguna de ellas (Fig. 6.13 A). Galafassi et al. (2012) reportaron que con 0,75 g/L de HMF, no hay efectos negativos en la tasa de crecimiento de la cepa *Rh. graminis* DBVPG 702. Mientras que, a concentraciones más altas (hasta 3,5 g/L), se observó una inhibición dependiente de la dosis. Sin embargo, a concentraciones de 1,5 g/L la producción de biomasa (g/L) y lípidos aumentó ligeramente (Galafassi et al., 2012). Asimismo, a concentraciones mayores de 3,5 g/L de HMF, hubo una inhibición completa del desarrollo de esta cepa.

Asimismo, Lin et al., (2017) reportan que la cepa *Rh. glutinis* CGMCC, obtuvo el 90% de biomasa cuando se cultivó con 0,8 g/L de HMF. Por otra parte, Vajzovic, et al. (2012) afirmaron que la producción de xilitol por una cepa de *Rh. mucilaginosa* (PTD3), no se vió afectada por la presencia de este inhibidor, sino hasta concentraciones de 3 g/L. Por lo tanto, no se espera que la concentración de HMF hallada en LC1, inhiba de manera contundente el crecimiento de estas cepas del género *Rhodotorula*.

	Compuestos fenólicos totales (g/L)	HMF (mg/L)	DHPG (mg/mL)	Tirosol (mg/L)	Hidroxitirosol (mg/L)
LC2 Inicial*	0,93±0,05 <sup>a</sup>	401.68±24.78 <sup>a</sup>	8.81±1.14 <sup>a</sup>	5.88±0.46 <sup>a</sup>	6.75±1.01 <sup>a</sup>
LC2 Final**					
S/I	0,94±0,03 <sup>a</sup>	371.89±47.18 <sup>a</sup>	8.37±0.65 <sup>a</sup>	5.52±1.27 <sup>a</sup>	6.06±0.56 <sup>a</sup>
<i>R. glutinis</i> Y54	1,05±0,06 <sup>a</sup>	1.56±0.53 <sup>b</sup>	8.27±0.21 <sup>a</sup>	5.83±0.47 <sup>a</sup>	5.98±1.05 <sup>a</sup>
<i>R. graminis</i> Y52	1,13±0,09 <sup>a</sup>	3.07±0.66 <sup>b</sup>	8.91±0.10 <sup>a</sup>	5.82±0.56 <sup>a</sup>	6.10±0.75 <sup>a</sup>
<i>R.</i> <i>mucilaginosa</i> LPSC 638	0.98±0.08 <sup>a</sup>	2.02±0.09 <sup>b</sup>	8.15±0.34 <sup>a</sup>	5.44±0.04 <sup>a</sup>	6.85±0.89 <sup>a</sup>

**Tabla 6.2.** Concentración de compuestos fenólicos totales, HMF y compuestos fenólicos relevantes encontrados en los medios derivados del alperujo tratado hidrotérmicamente antes y después del desarrollo de la levadura indicada. \*LC2 Inicial es el medio LC2 luego de ser autoclavado. \*\*LC2 Final es el medio LC2 luego de 3 días de incubación a con la correspondiente cepa de *Rhodotorula* o sin ser inoculado (S/I). Los valores se expresan como la media ± D.E., (n=3). En cada columna, letras diferentes significan valores estadísticamente diferentes (p<0.05). HMF: 5-hidroximetilfurfural DHPG: 3,4-dihidroxifenilglicol.

De hecho, cuando determinamos el contenido de HMF luego de la incubación con las diferentes cepas encontramos que disminuye significativamente (Tabla 6.2). El efecto es dependiente del crecimiento de las levaduras, ya que no se observa cuando el medio se incuba sin inocular, lo que indicaría que las 3 cepas pueden utilizar el HMF como sustrato (Tabla 6.2). Este dato es coincidente, con trabajos dónde se documenta el consumo de HMF por parte de *Rhodotorula* spp. (Kumar et al., 2020; Nakagame et al., 2020; Mota et al., 2022; Vajzovic et al., 2012). A su vez, la concentración de los compuestos fenólicos determinados en el medio, no varía luego del crecimiento de las levaduras.



**Fig. 6.14. A)** Crecimiento de las levaduras en LC2 **B)** Biomasa normalizada (g/L), producida por *Rh. graminis* Y52, *Rh. glutinis* Y54 y *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Por consiguiente, el efecto tóxico de LC1 puede atribuirse a otros factores como, el tipo y la concentración de los compuestos fenólicos que aún se hallen presentes en esta fracción líquida. El tratamiento hidrotermal provoca la liberación y solubilización de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, como el hidroxitirosol, que como ya se mencionara, tiene una gran actividad antimicrobiana y del que todavía quedan concentraciones altas en LC1 (Tabla 6.2) (Rubio-Senent, 2011; Fernandez-Bolaños et al.,

2004; Lama-Muñoz et al., 2019; Rubio-Senent et al., 2013; Lesage-Meessen et al., 2001; Canal et al., 2019).

En LC2, las tres cepas fueron capaces de crecer, alcanzando la fase estacionaria a las 20 h (Fig. 6.14 ). Asimismo, *Rh. graminis* Y52 mostró la mayor producción de biomasa, seguida de *Rh. glutinis* Y54 y como se esperaba, el menor rendimiento lo obtuvo *Rh. mucilaginoso* LPSC 638. De manera análoga, se observó la misma tendencia para la biomasa normalizada medida en g/L (Fig. 6.14 B).

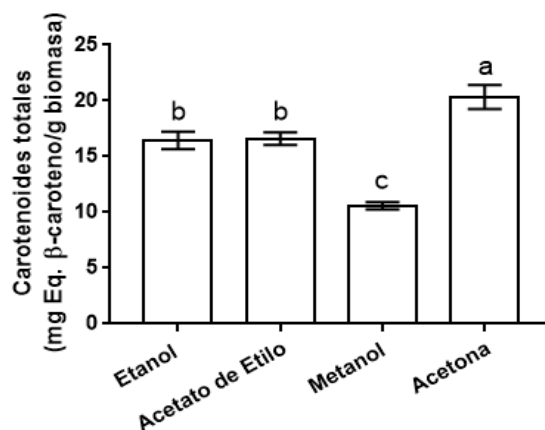
#### 6.2.5. Determinación del solvente para la extracción de carotenoides.

Con el objetivo de elegir el solvente más apropiado para la extracción de carotenoides sintetizados por las cepas de *Rhodotorula* spp., fueron evaluados acetona, etanol, metanol y acetato de etilo. Todos ellos son solventes eficientes para extraer este tipo de pigmentos (Martínez, 2020; Saini y Keum, 2018; Mussagy et al., 2020). Como modelo, se utilizó un cultivo en medio YM, de *Rh. glutinis* Y54.

Como se muestra en la Fig. 6.15, el orden de la eficiencia en la extracción de los carotenoides totales fue: acetona ( $20,4 \pm 1,1$  mg Eq.  $\beta$ -caroteno / g biomasa) > etanol ( $16,5 \pm 0,7$  mg Eq.  $\beta$  -caroteno / g biomasa) = acetato de etilo ( $16,6 \pm 0,6$  mg Eq.  $\beta$  -caroteno / g biomasa) > metanol ( $10,6 \pm 0,3$  mg Eq.  $\beta$  -caroteno / g biomasa). De esta manera, la acetona fue el solvente de mayor eficacia de todos los evaluados. No obstante, es importante destacar que, con etanol, también se obtuvo un buen rendimiento (Fig. 6.15). Considerando que este solvente puede obtenerse mediante bioprocesos, su utilización haría más sustentable la producción y extracción de



carotenoides microbianos (González-Álvarez, 2021; Berbel et al., 2018; Filippin et al., 2014; Herrero et al., 2018; Rosso y Pérez, 2018; Hernández-Guijarro et al., 2018).

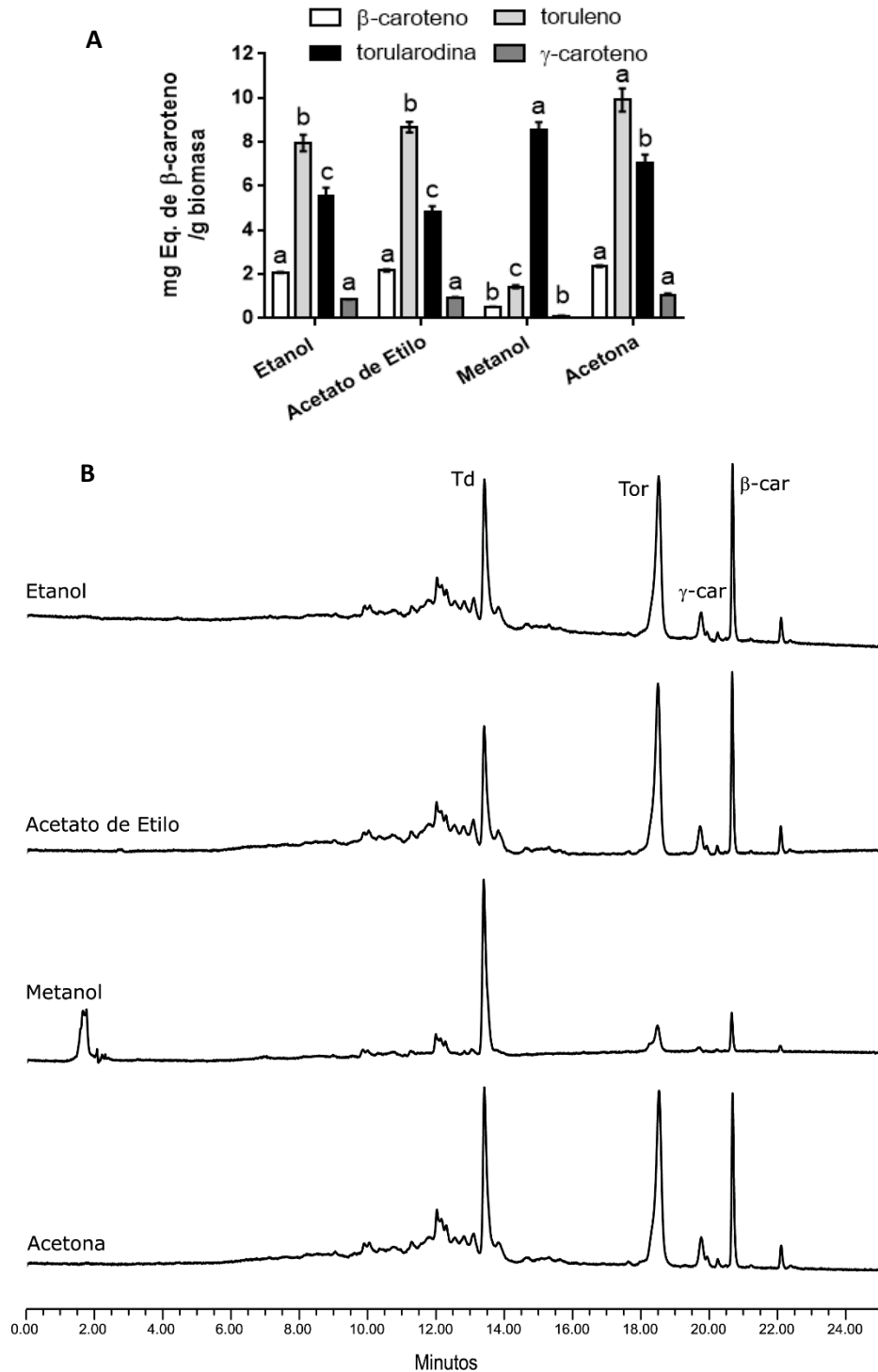


**Fig. 6.15.** Carotenoides totales obtenidos (mg Eq.  $\beta$ -caroteno/g biomasa) mediante la extracción con diferentes solventes. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Respecto al perfil de carotenoides extraídos por los diferentes solventes, podemos observar que *Rh. glutinis* Y54 (como otras especies del género *Rhodotorula*), produce como carotenoides principales: toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno (Fig. 6.16; Malisorn y Suntornsuk, 2008; Hernandez-Almanza et al., 2013; Buzzini et al., 2007; Elfeky et al., 2019; Frengova y Beshkova, 2008; Buzzini y Martin, 1999; Schneider et al., 2013). La suma de estos carotenoides representa aproximadamente, el 95% del total de carotenoides extraídos. Asimismo, se observaron cantidades menores del precursor  $\gamma$ -caroteno (Fig. 6.16 A-B). Cuando en la extracción se empleó etanol, acetato de etilo o acetona, el toruleno fue el componente principal (Fig. 6.16 B). La cantidad máxima de toruleno se obtuvo con acetona. Por el contrario, el metanol fue más selectivo para la torularodina, probablemente debido a su mayor polaridad. Cuando se utilizó este solvente, se recuperaron cantidades muy bajas de toruleno,  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno, representando la torularodina el 80 % de los carotenoides totales. Con etanol, acetato

de etilo y acetona se extraen cantidades similares de  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno (Fig. 6.16

B).

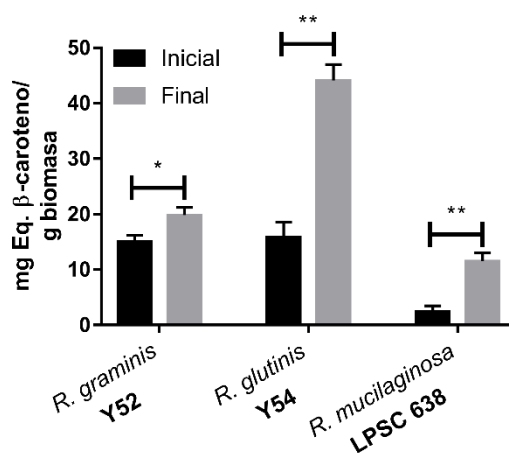


**Fig. 6.16. A)** Concentración específica de carotenoides producidos por *Rh. glutinis* Y54 ( $\beta$ -caroteno, toruleno, torularodina,  $\gamma$ -caroteno), utilizando Acetona, Etanol, Ac. de etilo y Metanol. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ). **B)** Cromatogramas obtenidos en la extracción de carotenoides individuales:  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ -car), toruleno (Tor) torularodina (Td),  $\gamma$ -caroteno ( $\gamma$ -car), utilizando etanol, acetato de etilo, metanol y acetona, como solventes.

En conclusión, dado que la acetona fue el solvente que más carotenoides totales extrajo y que además es el que mejor extrajo a la mayoría de los carotenoides, fue seleccionado para realizar los siguientes experimentos.

#### 6.2.6. Producción de carotenoides por *Rhodotorula* spp. en la fracción LC2 del alperujo tratado hidrotermalmente

Podemos observar en la Fig. 6.17, que la producción de carotenoides específicos fue mayor en *Rh. glutinis* Y54 y *Rh. graminis* Y52 al comienzo del experimento, lo que indica una mayor capacidad intrínseca de estas cepas de sintetizar carotenoides-



**Fig. 6.17.** Producción específica de carotenoides totales, para las tres cepas analizadas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  S.D. (n=3) \*  $p < 0,01$  \*\*  $p < 0,001$ .

Las tres cepas produjeron torularodina, toruleno,  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno, coincidiendo con la bibliografía analizada, aunque la proporción fue diferente para cada una de ellas (Tabla 6.3). El principal carotenoide sintetizado inicialmente fue el toruleno, representando aproximadamente el 45% del contenido total de carotenoides (Tabla 6.3, Inicial). Esta reportado que las levaduras del género *Rhodotorula* son importantes productoras de toruleno, por sobre los demás carotenoides que suelen sintetizar (Kot et al., 2018; Buzzini et al., 2007; Yoo et al., 2016; Frengova y Beshkova, 2008; Elfeky et al., 2019; Hernandez-Almanza et al., 2013; Cheng y Yang, 2016; Zoz et al., 2015; Kot et al.,

2018). De esta manera, *Rh. graminis* Y52 presentó el nivel más alto de  $\beta$ -caroteno, mientras que *Rh. glutinis* Y54 produjo una mayor cantidad de torularodina. Sin embargo, *Rh. glutinis* Y54 sintetizó cantidades semejantes de toruleno y torularodina, mientras que la producción de  $\beta$ -caroteno fue menor, teniendo el mismo orden de magnitud que la del precursor  $\gamma$ -caroteno (Tabla 3, Inicial).

Este dato sugiere que se favorecerían los pasos finales de la ruta biosintética, es decir, la conversión de  $\gamma$ -caroteno en toruleno y luego, mediante reacciones de hidroxilación y oxidación, a torularodina (Fig. 6.18), (Tang et al., 2019; Kot, 2018; Frengova y Beshkova, 2008; Margarlith, 1968).

Levadura		Torularodina	Toruleno	$\beta$ -caroteno	$\gamma$ -caroteno
(mg Eq. de $\beta$ -caroteno/g biomasa)					
<i>R. graminis</i> Y52	Inicial	5.4 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 1.1	2.7 $\pm$ 0.1	0.90 $\pm$ 0.02
	Final	4.7 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.4*
<i>R. glutinis</i> Y54	Inicial	8.02 $\pm$ 1.9	7.5 $\pm$ 0.9	0.25 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02
	Final	9.3 $\pm$ 0.7	25.6 $\pm$ 2.6*	2.2 $\pm$ 0.2*	5.1 $\pm$ 0.3*
<i>R. mucilaginoso</i> LPSC 638	Inicial	0.54 $\pm$ 0.02	1.05 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.01
	Final	2.9 $\pm$ 0.5*	5.1 $\pm$ 0.6*	2.0 $\pm$ 0.7*	1.3 $\pm$ 0.3*

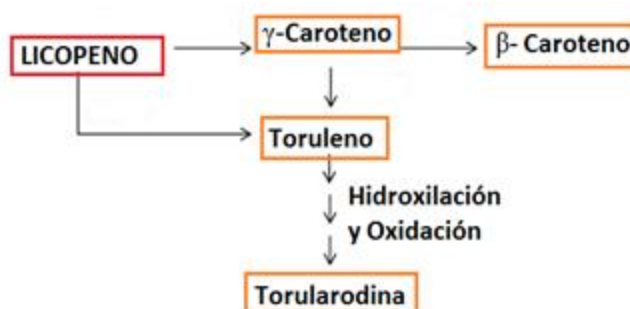
**Tabla 6.3.** Cantidades de carotenoides individuales (media  $\pm$  S.D.) producidas por las diferentes levaduras al inicio (Inicial) y después de 3 días de cultivo en LC2 (Final). Cada valor Final fue comparado con el correspondiente valor Inicial. \*  $p < 0.01$ . (n=3)

Con respecto al perfil de carotenoides hallados al final del ensayo, luego de 3 días de incubación, se encontró que en *Rh. glutinis* Y54, el perfil de carotenoides cambió respecto a la etapa inicial. El extracto obtenido presentó cantidades significativamente mayores de toruleno,  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno, en comparación a las concentraciones iniciales. El toruleno constituyó aproximadamente, el 60 % del total de carotenoides hallados obteniéndose así, un extracto enriquecido en este pigmento.

Por otra parte, la torularodina se mantuvo constante (Tabla 6.3, Final). Este hecho podría deberse a una saturación en la oxidación del toruleno, provocando la acumulación de este carotenoide, evitando que se produzcan mayores cantidades de torularodina, (Zoz et al., 2015; Mihalcea et al., 2011; Margarlith y Meydav, 1968).

Respecto a *Rh. graminis* Y52, la situación es diferente ya que, además de un menor incremento en el contenido total de carotenoides, se observa la acumulación del precursor  $\gamma$ -caroteno (Tabla 6.3, Final). Este precursor representa un punto de ramificación en la biosíntesis de carotenos, generando por un lado  $\beta$ -caroteno o toruleno y torularodina (Fig. 6.18), (Buzzini et al., 2007; Kot et al., 2018; Zoz et al., 2015; Mihalcea et al., 2011; Margarlith y Meydav, 1968). Dado que los productos finales de las dos ramas ( $\beta$ -caroteno, toruleno y/o torularodina), no cambiaron su concentración en esta cepa, los últimos pasos de la carotenogénesis parecieran ralentizarse cuando la levadura se desarrolla en LC2. Por el contrario, el perfil de carotenoides no cambió en *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, luego de crecer en LC2 (Tabla 6.3, Final). Todos los carotenoides aumentaron su concentración específica en la misma proporción.

La principal función de estos pigmentos en levaduras ubicuas, aerobias y heterótrofas, como *Rhodotorula spp.*, está asociada a proteger moléculas y componentes celulares vitales, de las reacciones fotooxidativas (Buzzini et al., 2007; Moore et al., 1989; Kot et al., 2018; Zoz et al., 2015; Frengova y Beshkova, 2008). En consecuencia, estos pigmentos antioxidantes les permiten sobrevivir en una gran variedad de ambientes complejos, como los subproductos olivícolas (alperujo y alpechines), (Jarboui et al., 2012; Ntougias et al., 2013; Marova et al., 2004; Moore et al., 1989; Veiga-Rodrigues et al., 2019; Margarlith y Meydav, 1968; Cheng y Yang, 2016; Mihalcea et al., 2011). Es así que, estos resultados consolidan el concepto de que el rendimiento en la biosíntesis de carotenoides y la proporción que se sintetiza de cada uno de estos pigmentos, dependen de la especie y la cepa de levadura, por lo menos en



**Fig. 6.18.** Pasos finales de la ruta biosintética de carotenoides en levaduras. Se observa la conversión del precursor  $\gamma$ -caroteno a toruleno. Esta reacción es mediada por la enzima licopeno ciclasa. Luego a través de reacciones de hidroxilación y oxidación, el toruleno se transforma en torularodina. Esquema adaptado de Tang et al., 2019.

el género *Rhodotorula* (Aksu y Tugba-Eren, 2005; Libkind et al., 2004; Moliné et al., 2012; Cheng y Yang, 2016).

Cabe señalar que, independientemente de las variaciones que se hallaron en el perfil de carotenoides sintetizados, se observó un aumento en el contenido total de carotenoides en las tres especies analizadas. Sin embargo, la cepa que obtuvo el mejor

desempeño fue *Rh. glutinis* Y54, mientras que, *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 presentó la menor producción específica en LC2. No obstante, se obtuvieron mejores resultados en cuanto a su desarrollo y síntesis de carotenoides en LC2, en comparación a la fracción líquida del alperujo (AA) y los extractos acuosos (EAs) que se analizaron en este capítulo y en capítulos anteriores.

### 6.3. Conclusiones parciales

- *Rh. mucilaginoso* LPSC 638, puede desarrollarse en todos los medios desfenolizados que se estudiaron. El proceso de desfenolización favorece el desarrollo de la levadura.
- En los medios constituidos por una mayor concentración de alperujo (EA 30% y en AA), se halló un número significativamente mayor de células cuando la levadura crece en la condición desfenolizada, en comparación a la normal.
- No hubo diferencias significativas en el desarrollo de la levadura en ambas condiciones del EA 10%.
- El contenido de compuestos fenólicos y el crecimiento de la levadura (medido como número de células o peso seco) no están correlacionados. De hecho, se obtiene aproximadamente el mismo número de células en todos los medios desfenolizados, a pesar de las diferencias en la concentración de compuestos fenólicos.
- En todos los medios analizados, hay un consumo marcado de glucosa en las dos condiciones evaluadas.

- La levadura consume proteínas, solamente en la condición normal de los medios analizados.
- En EA 30% y AA desfenolizados, la concentración de proteínas aumenta e debido al crecimiento de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638.
- La desfenolización aumenta la producción volumétrica total (mg Eq.  $\beta$ -caroteno/L) en EA 30% y AA. Y en el caso del último medio, también modifica el patrón de síntesis. Por lo que, este procedimiento mejoraría el desempeño de la levadura en cuanto a la síntesis de carotenoides.
- En EA 10%, no se hallaron diferencias significativas en la producción volumétrica total de carotenoides entre la condición normal y la desfenolizada.
- En relación a la Tasa específica de producción de carotenoides (mg/ g biomasa x día), no se observaron diferencias significativas entre las muestras normales y desfenolizadas en ninguno de los medios analizados.
- En los medios desfenolizados la disminución de la toxicidad puede cambiar el metabolismo de *Rh. mucilaginoso* LPSC 638 hacia la división celular.
- La extracción de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, que usualmente presentan actividad antimicrobiana y fitotóxica, convierte a la fracción líquida del alperujo tratada hidrotermalmente, en un medio adecuado para el desarrollo de levaduras del género *Rhodotorula*.
- El uso de levaduras del género *Rhodotorula* aisladas desde residuos olivícolas (*Rh. glutinis* Y54 y *Rh. graminis* Y52) mejora la productividad de biomasa y carotenoides, respecto a una levadura obtenida de un banco de levaduras (*Rh.*



*mucilaginoso* LPSC 638). Estas especies, estarían mejor adaptadas a las características fisicoquímicas de los subproductos olivícolas, en comparación a aquellas provenientes de otras fuentes, como *Rh. mucilaginoso* LPSC 638.

- El tratamiento hidrotermal sobre alperujo, permite la liberación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular y la mayor solubilidad de azúcares, quedando disponibles, como fuentes de C, para las levaduras estudiadas.
- Las tres especies del género *Rhodotorula* (*Rh. graminis* Y52, *Rh. glutinis* Y54, *Rh. mucilaginoso* LPSC638), pudieron desarrollar en el medio resultante del tratamiento hidrotermal, solo cuando fue desfenolizado mediante 2 pasajes a través de una columna cromatográfica.
- Los principales pigmentos carotenoides sintetizados fueron: toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno.
- La estrategia de acoplar la recuperación de compuestos fenólicos desde el alperujo, con la producción de carotenoides por levaduras del género *Rhodotorula*, brindaría resultados prometedores para la reutilización integral del alperujo. Si, además, se utilizan levaduras aisladas de un entorno similar al del alperujo, mejora aún más el rendimiento del bioproceso. Esto, permitiría aplicar uno de los principios rectores de la bioeconomía el cual es, el aprovechamiento de los residuos agroindustriales mediante su reconversión.

## 6.4. Bibliografía

- Aksu, Z., & Tugba-Eren, A. "Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*." *Biochemical Engineering Journal*. 35 (2007): 107–113.
- Aksu, Z.A., & Tugba-Eren, A. "Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginoso*: Use of agricultural wastes as a carbon source." *Process Biochemistry* 40 (2005): 2985–2991.
- Allouche, N., Fki, I., et al. «Toward a High Yield Recovery of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters.» *J. Agric. Food Chem.*, nº 52 (2004): 267-273.
- Aranda, E., Sampedro, I., et al. "Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth." *International Biodeterioration & Biodegradation*, no. 58 (2006): 176-179.
- Arroyo-Lopez, F.N., Durán-Quintana, M.C., et al. "Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives." *Food Microbiology*, no. 23 (2006): 791-796.
- Ayadi, H. Belghith, A. Gargouri, M. Guerfali. "Screening of new oleaginous yeasts for single cell oil production, hydrolytic potential exploitation and agro-industrial by-products valorization." *Process Saf. Environ. Prot.*, no. 119 (2018): 104-114.
- Banerjee, A., N. Bansal, J. Kumar, T. Bhaskar, A. Ray, D. Ghosh. "Characterization of the de-oiled yeast biomass for plausible value mapping in a biorefinery perspective." *Bioresour. Technol.*, no. 337 (2021): 125422.
- Barbosa, P. M. G., de Morais, T. P., de Andrade Silva, C. A., et al. « Biochemical characterization and evaluation of invertases produced from *Saccharomyces cerev* CAT-1 and *Rhodotorula mucilaginoso* from the production of fructoglicosacaridaes.» *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 6, nº 48 (2018): 506-513.
- Ben-Sassi, A., Ouazzani, N., et al. "Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast isolated." *Biodegradation*. 19 (2008): 337-346.
- Berbel, J., Gutiérrez-Martín, C., et al. «Valorización de los subproductos de la cadena del aceite de oliva. .» *Mediterráneo Económico*, nº 32 (06 2018): 273-289.
- Bleve, G., Lezzi, C., et al. "Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters." *Bioresource Technology*, no. 102 (2011): 982–989.
- Borja, R., Raposo, F., et al. "Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills." *Grasas y Aceites*. 1, no. 57 (2006): 32-46.
- Borroni, M.V., Gonzalez, M.T., et al. "Bioproduction of carotenoid compounds using two-phase olive mill waste as the substrate." *Process biochemistry*, 2017: 1-7.
- Buzzini, P., & Martini, A. "Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin." *Bioresource Technology* 71 (1999): 41-44.

- Buzzini, P., Innocenti, M., et al. "Carotenoids Profiles of yeast belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*." *Can. J. Microbiol.*, no. 53 (2007): 1024-1031.
- Canal, C., Ozen, B., & Baysal, A. H. "Characterization of antimicrobial activities of olive phenolics on yeasts using conventional methods and mid-infrared spectroscopy." *Journal of food science and technology*. 1, no. 56 (2019): 149-158.
- Çelik, G., Saygın, O., et al. "Multistage recovery process of phenolic antioxidants with a focus on hydroxytyrosol." *Separation and Purification Technology*, 2020.
- Cheng, Y., & Yang, C. "Using strain *Rhodotorula mucilaginoso* to produce carotenoids using food wastes." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 61 (2016): 270–275.
- Couto, A.M., & Salerno, C.M. *Uso de harina de chía e hidroxitirosol en pollos parrilleros . Dinámica microbiana de las excretas*. Tesis de grado, Departamento de Agronomía., Universidad Nacional del Sur (UNS), Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.: Edi UNS., 2019, 37.
- Dellagrecia, M., Monaco, P., et al. "Phytotoxicity of Low Molecular Weight Phenols from Olive Mill Waste Waters." *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, no. 67 (2001): 352–359.
- Dermeche, S.M., Nadour, C., et al. "Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization." *Process Biochemistry* 48 (2013): 1532–1552.
- Caroca, E., A. Serrano, R. Borja, A. Jiménez, A. Carvajal, A.F.M. Braga, G. Rodríguez-Gutierrez, F.G. Feroso., "Influence of phenols and furans released during thermal pretreatment of olive mill solid waste on its anaerobic digestion." *Waste Management* 120 (2021): 202-208.
- Efkey, N., Elmahmoudy, M., et al. "Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* with a Combined Cultivation Mode of Nitrogen, Sulfur, and Aluminium Stress." *Applied sciences*, no. 9 (2019): 2-19.
- Feroso, F.G., Serrano, A., et al. "Valuable Compound Extraction, Anaerobic Digestion, and Composting: A Leading Biorefinery Approach for Agricultural wastes." *J. Agric. Food Chem.*, no. 66 (2018): 8451–8468.
- Fernandez-Bolaños, J. Rodríguez G., Gomez E., et. al. "Total Recovery of the Waste of Two-Phase Olive Oil Processing: Isolation of Added-Value Compounds." *J. Agric. Food Chem.* 52, no. 19 (2004): 5849-5855.
- Fernandez-Bolaños, J., Heredia-Moreno, A., et al. Method for obtaining purified hydroxytyrosol from products and by-products derived from the olive tree. . Sevilla, España. Patent US 6,849,770 B2. Febrero 1, 2005.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., et al. "Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid– solid waste of two-phase olive oil processing or “Alperujo” ." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, no. 23 (2002): 6804-6811.

- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G., et al. "Production, recovery and purification of antioxidant and interesting compounds from olive." *EJEAFChe.* 7, no. 8 (2008): 3237-3242.
- Figueiredo-González, M., Reboredo-Rodríguez, P., et al. "The involvement of phenolic-rich extracts from Galician autochthonous extra-virgin olive oils against the  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase." *Food Research International*, no. 116 (2019): 447-454.
- Filippin, A.J., Pozzi, J., et al. «Subproductos del olivar y sus procesamientos para obtención de productos con valor agregado.» *V Jornadas de la RedVITEC*. Córdoba, Argentina.: UNC (Universidad Nacional de Córdoba), 2014. 1-9.
- Frengova, G.I., & Beshkova, D.M. "Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, 2008: 1-43.
- Galafassi, S., Cucchetti, D., et al. "Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*." *Bioresource Technology.*, no. 111 (2012): 398-403.
- Gavilán-Bravo, A. «Consideraciones para el uso de los carotenoides en los alimentos funcionales.» Cap. 29 de *Carotenoides en agroalimentación y salud.*, de A.J. Meléndez-Martínez, 670-686. Sevilla: Editorial Terracota S.A de CV., 2017.
- Genethliou, C., Kornaros, M., et al. "Biodegradation of olive mill wastewater phenolic compounds in a thermophilic anaerobic upflow packed bed reactor and assessment of their toxicity in digester effluents." *Journal of Environmental Management*, no. 255 (2020).
- Ghilardi, C., Sanmartín-Negrete, P., Carelli, A.A., & Borroni, M.V. "Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*." *Bioresour. Bioprocess.* 7, no. 52 (2020): 2-11.
- Ghilardi, C., Sanmartín-Negrete, P., Rodríguez-Gutiérrez, G., et al.,. "Influence of olive mill waste phenolic compounds levels on carotenoid production by *Rhodotorula* spp." *Process Biochemistry*, no. 120 (2022): 275–286.
- Giannoutsou, E.P., Meintanis, C., et al. "Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation." *Bioresource Technology*, no. 93 (2004): 301–306.
- Gonçalves, Cr., Lopes, M., et al. "Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts." *Bioresource Technology.*, no. 100 (2009): 3759-3763.
- González, J.L., Bellido, E., et al. "Reduction of total polyphenols in olive mill wastewater by physico-chemical purification." *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology.* 29, no. 5 (Diciembre 1994): 851-865.
- González-Álvarez, J. «La Biorefinería: concepto y tipos. Nivel II. Capacitación: Biorrefinerías.» *Las biorrefinerías: aplicación a materiales y residuos lignocelulósicos. Horizonte 2050.*

Editado por Bolsa de Cereales de Bs. As. Ciudad Autónoma de Bs. As., Buenos Aires, 15 de 06 de 2021.

- Gunsalus, I.C., Horecker, B.L., et al. "Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms." *Bacteriological reviews*. 2, no. 19 (1955): 79.
- Hamden, K., Allouche, N., et al. "Inhibitory action of purified hydroxytyrosol from stored olive mill waste on intestinal disaccharidases and lipase activities and pancreatic toxicity in diabetic rats." *Food Sci. Biotechnol.*, 2010: 439-447.
- Hernandez-Almanza A., Montaneza, J.C., et al. "Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry." *Food Bioscience* 5 (2013): 64-72.
- Hernández-Guijarro, K., Portocarrero, R., et al. «Efecto de la aplicación de vinaza sobre la dinámica de poblaciones microbianas edáficas.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y CUYO*. San Juan: Inta Ediciones., 2018. 100-104.
- Herrero, L., Mamaní, A., et al. «Bioetanol a partir de residuos de la actividad olivícola.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y CUYO*. San Juan, Argentina: INTA Ediciones., 2018. 110-114.
- Hu, K., X. I Zhu, H. Mu, Y. Ma, N. Ullah, Y. s Tao. "A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: its application potential in wine aroma enhancement." *Let. Appl. Microbiol.* , no. 62 (2016): 169–176.
- Husseiny, M.S., Abdelhafez, A.A., et al. "Optimization of b-Carotene Production from *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 Growing on Agro-industrial Substrate Using Plackett–Burman Design." *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 4, no. 88 (2018): 1637-1646.
- Jarboui, R., Baatia, H., et al. "Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginosa*." *Environmental Technology*. 33, no. 8 (2012): 951–960.
- Kot, A.M., Błażejczak, S., et al. "Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry?" *Microb Cell Fact.* 17, no. 49 (2018): 1-14.
- Kumar, K.K. Deeba, S. Yuvraj, S.N., et al. "Harnessing pongamia shell hydrolysate for triacylglycerol agglomeration by novel oleaginous yeast *Rhodotorula pacifica* INDKK." *Biotechnology for Biofuels*. 13, no. 175 (2020): 14.
- Lama-Muñoz, A., et al. "New Hydrothermal Treatment of Alperujo Enhances the Content Bioactive Minor Components in Crude Pomace Olive Oil." *J. Agric. Food Chem.* , no. 59 (2011): 1115–1123.
- Lama-Muñoz, A., Rubio-Senent, F., et al. "The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization." *Innovative Food Science and Emerging Technologies.*, (2019): 11-17.
- Lario, L.D., O.S. Pillaca-Pullo, L. Dur~aes Sette, A. Converti, P. Casati, C. Spampinato, et al. "Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528." *Biotechnol. Rep.*, no. 28 (2020).

- Laurent, G.C., Suñer, L., et al. «Adición al suelo de Residuos de la industria olivícola. .» *III Jornadas Nacionales de Suelos de Ambientes Semiáridos y II Taller Nacional de Cartografía Digital*. Sta. Rosa, La pampa.: INTA Ediciones, 2015. 130-134.
- Lesage-Meessen, L., Navarro,D., et al. «Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems.» *Food Chemistry. (Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section)*., nº 75 (2001): 501-507.
- Libkind, D., Brizzio, S., et al. «Rhodotorula mucilaginosa, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake.» *Folia Microbiol.* 1, nº 49 (2004): 19-25.
- Lim, J., Zhanga, X., et al. "Starch digested product analysis by HPAEC reveals structural specificity of flavonoids in the inhibition of mammalian  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidases." *Food Chemistry*, no. 288 (2019): 413-421.
- Lin, Z., Zhou,Y., et al. "The effect of multiple inhibitions in corncob hydrolysate on the lipid production by Rhodotorula glutinis." *Energy and fuels. American Chemical Society.*, (2017): 12247–12255.
- Liu, Z., van den Berg, C., Weusthuis, R. A., Dragone, G., & Mussatto, S. I. (2021). Strategies for an improved extraction and separation of lipids and carotenoids from oleaginous yeast. *Separation and Purification Technology*, 257, 117946.
- Malisorn, C., & Suntornsuk, W. "Optimization of B-Carotene production by Rhodotorula glutinis DM28 in fermented radish brine." *Bioresource Technology.*, no. 99 (2008): 2281–2287.
- Mannazzu, I., Landolfo, S., et al. "Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeast of biotechnological interest." *World J Microbiol Biotechnol.*, 2015.
- Margarith, P., & Meydav, S. "Some observations on the carotenogenesis in the yeast Rhodotorula mucilaginosa." *Phytochemistry.* 7, no. 5 (1968): 761-766.
- Marova, E., Breierova, E., et al. "Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeast." *Annals of Microbiology* 1, no. 54 (2004): 73-85.
- McNamara, Ch. J., Anastasiouc, Ch. C., et al. "Review: Bioremediation of olive mill wastewater." *International Biodeterioration & Biodegradation.* 61 (2008): 127-134.
- Mekki, A., Dhoub, A., et al. "Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters." *Journal of Environmental Management.*, no. 84 (2007): 134–140.
- Messenguy, F., André, B., et al. "Diversity of Nitrogen Metabolism Among Yeast Species: Regulatory and Evolutionary aspects." Chap. 7 in *The Yeast handbook. Biodiversity and ecophysiology of yeast.*, by Carlos Rosa & Gábor Péter, 578. Berlin: Springer, 2006.
- Mihalcea, A., Ungureanu, C., et al. "The Influence of Operating Conditions on the Growth of the Yeast Rhodotorula Rubra ICCF 209 and on Torularhodin Formation." *REV. CHIM.* 62, no. 6 (2011): 1-7.
- Molina-Alcaide, E., & Yañez-Ruiz, D.R. "Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review." *Animal Feed Science and Technology.*, no. 147 (2008): 247–264.

- Moliné, M., Libkind, D., et al. "Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.*, no. 95 (2009): 156–161.
- Moliné, M., Libkind, D., et al. "Production of Torularhodin, Torulene, and  $\beta$ -Carotene by *Rhodotorula* yeast." Chap. 13 in *Microbial Carotenoids from fungi. Methods and Protocols.*, by J.L. Barredo, 285. León: Springer, 2012.
- Monetta, P. Bueno, L. Cornejo, V. et al. "Short-term dynamics of soil chemical parameters after application of alperujo in high-density drip-irrigated olive groves in Argentina." *International Journal of Environmental Studies.* 69, no. 4 (2012): 578–588.
- Moore, M.M., Breeveded, M.W., et al. "The Role of Carotenoids in Preventing Oxidative Damage in the Pigmented Yeast, *Rhodotorula mucilaginoso*." *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 270, no. 2 (1989): 419-431.
- Morillo-Perez, J. A. *Biorremediación del alperujo: estudio de la microbiota asociada y producción del exopolisacárido jambilano*. Tesis Doctoral., Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología., Universidad de Granada., Granada, España.: Editorial de la Universidad de Granada., 2007, 136.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., et al. "Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes." *Appl. Microbiol. Biotechnology.*, no. 85 (2009): 25-39.
- Mota, M.N., Múgica, P., Sá-Correia, I. "Exploring Yeast Diversity to Produce Lipid-Based Biofuels from Agro-Forestry and Industrial Organic Residues." *J. Fungi* 8, no. 687 (2022): 46.
- Mouncif, M., Tamoh, F., et al. "A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco." *Grasas y Aceites.* 44, no. 6 (1993).
- Mussagy, C.U., Santos-Ebinuma, V.C., et al. "Integrative platform for the selective recovery of intracellular carotenoids and lipids from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186 yeast using mixtures of bio-based solvents." *Green Chemistry*, no. 22 (2020): 8478–8494.
- Mussio, D., Ceci, L.N., et al. «Recuperación de Biofenoles de Alperujo con diferentes solventes.» *XVI CYTAL*. Mar del Plata, Argentina., 2017. 1-7.
- Mussio, D.F., Ceci, L.N., et al. «Biofenoles en las corrientes de procesamiento de aceite de oliva virgen.» Editado por et al. Cecilia Penci. *V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC)*. Córdoba, Argentina., 2014. 129-135.
- Nakagame, S. Shimizu, Y. & Saddler, J.N. "The Production of Lipids Using 5-Hydroxymethyl Furfural Tolerant *Rhodotorula graminis* Grown on the Hydrolyzates of Steam Pretreated Softwoods." *Sustainability* 12, no. 755 (2020): 9.
- Ntougias, S., Bourtzis, K., et al. «The Microbiology of Olive Mill Wastes.» *BioMed Research International* 2013 (2013): 1-16.
- Obied, H.K., Allen, M.S., et al. "Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste." *J. Agric. Food Chem.* 53, no. 4 (2005): 823-837.

- Ouzounidou, G., Zervakis, G.I., et al. "Raw and Microbiologically Detoxified Olive Mill Waste and their Impact on Plant Growth." *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology.*, no. 4 (2010): 21-38.
- Puc-Blanco, N. "Optimización de la hidrólisis ácida para la obtención de azúcares totales a partir de algas pardas (*Sargassum* spp.)." Tesis Doctoral., Universidad Autónoma de Nuevo León., 2021.
- Ramos-Cormenzana, A. "Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water." In *Actas Int.Symp. Olive By-products Valorization.*, by Organisation and the United Nations (FAO), pp. 19–40. Sevilla: Food and Agriculture Organisation and the United Nations (FAO)., 1986.
- Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, S.M., et al. "Differential  $\alpha$ -amylase/ $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes." *Food and Function*, no. 8 (03 2017): 1942-1954.
- Renzi, L., Monetta, P., et al. «Cadena de valor del alperujo, una oportunidad de innovación: obtención de biofenoles y su aplicación en alimentos balanceados.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y CUYO*. San Juan, Argentina.: INTA Ediciones., 2018. 314-315.
- Rodríguez-Concepcion, M., Avalos, J., et al. "A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health." *Progress in Lipid Research.*, no. 70 (2018): 62-93.
- Rodríguez-Gutierrez, G., & Monetta, P. «Subproductos del olivar: Recuperación de compuestos fenólicos. Experiencias en España y Argentina.» *Ciclo virtual de seminarios internacionales: Avances en olivicultura y elaiotecnia*. INTA, CRILLAR-CONICET, CREA, UNDeC, Chile OLIVA, Min. Agric, Gand y Pesca de la Rep.Arg. San Juan, San Juan, 8 de julio de 2021.
- Rodríguez-Gutierrez, G., Rodríguez, R., et al. "Effect of Steam Treatment of Alperujo on the Composition, Enzymatic Saccharification, and in Vitro Digestibility of Alperujo." *J. Agric. Food Chem.*, no. 55 (2007): 136-142.
- Romo-Sanchez, S., Alves-Baffi, M., et al. "Yeast biodiversity from oleic ecosystems: Study of their biotechnological properties." *Food Microbiology*. (Elsevier Ltd.), no. 7 (2010): 487-492.
- Rosso, M.C., & Pérez, M.A. «Calidad de burlanda húmeda de maíz para su utilización en alimentación animal.» *II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y CUYO*. San Juan: INTA Ediciones., 2018. 215-217.
- Rubio-Senent, F. *Recuperación de compuestos bioactivos a partir de subproductos del aceite de oliva*. Tesis Doctoral, Departamento de Nutrición y Bromatología., Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla., Sevilla: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de la Grasa, España., 2011, 358.
- Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., et al. "Phenolic extract obtained from steam-treated olive oil waste: characterization and antioxidant activity." *LWT-Food Sci Technol.*, no. 54 (2013): 114-124.



- Saini, R.K., & Keum, Y.S. "Carotenoid extraction methods: A review of recent developments." *Food chemistry*, no. 240 (2018): 90–103.
- Sayadi, S., Allouche, N., et al. "Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment." *Process Biochemistry*, no. 35 (2000): 725-735.
- Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., et al. "Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents." *Energy*, no. 61 (2013): 34-43.
- Soberón, L.F., Carelli, A.A., et al. "Method for phenol recovery from "alperujo": numerical optimization." *European Food Research and Technology*, 2019: 1-10.
- Socaci, S.A., Fărcas, A., et al. "Food Wastes as Valuable Sources of Bioactive Molecules." Chap. 4 in *Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*, by N. & Waisundara, V. Shiom. Rijeka, : ItechOpen, 2017.
- Surai, P.F., Speake, B.K., et al. "Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk." *The Journal of Poultry Science* 1, no. 38 (2001): 1-27.
- Tang, W., Wang, Y., et al. "Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for enhanced Their Production." *J. Microbiol. Biotechnol.* 4, no. 29 (2019): 507–517.
- Takaç, S., & Karakaya, A. "Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater." *Recent Patents on Chemical Engineering*. 2, no. 3 (2009): 230-237.
- Thakur, M., & Azmi, W. "Nutraceutical B-carotene from natural non conventional sources and its applications." *Annals of Phytomedicine*. 1, no. 2 (2013): 59-73.
- Ungureanu, C., Ferdes, M., et al. "Torularhodin Biosynthesis and Extraction by Yeast cells of *Rhodotorula rubra*." *REV. CHIM.* 63, no. 3 (2012): 316-318.
- Usaquen-Alvarado, S.M. «Aprovechamiento y valorización del alperujo tratado termicamente como: fertilizante biológico y fuente de Hidroxitirosol.» *Tesis de grado para optar por el título de Microbiólogo Industrial*. Granada, Granada: Pontificia Universidad Javeriana, 10 de Enero de 2008.
- Vajzovic, A., Bura, R., et al. "Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 II: Production of xylitol and ethanol in the presence of inhibitors." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 10, no. 39 (2012): 1453-1463.
- Valiente, C., Arigoni, E., et al. «Composición de la fibra alimentaria en el orujo de la aceituna. Aminoácidos asociados a la fibra insoluble, soluble y total.» *Grasas y Aceites* 46, nº 2 (1995): 98-102.
- Vargas-Murga, L. «Seguridad de los carotenoides: Estudios toxicológicos, Reacciones adversas e interacciones con fármacos.» Cap. 30 de *Carotenoides en agroalimentación y salud*, de A.J. Meléndez-Martínez, 710. Sevilla: Editorial Terracota, SA de CV / México, 2017.
- Veiga-Rodrigues, T., Amore, T.D., et al. "Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agro-industrial Byproducts." *Food Technology & Biotechnology* 3, no. 57 (2019): 388–398.

Capítulo 6: Desarrollo y producción de carotenoides por *Rh. mucilaginosa* LPSC 638, *Rh. glutinis* Y54 y *Rh. graminis* Y52 sobre medios derivados del Alperujo con diferentes niveles de compuestos fenólicos.

Yoo, A.Y., Alnaeeli, M., et al. "Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01." *Process Biochemistry.*, no. 51 (2016): 463-473.

Zoz, L., Carvalho, J.C., et al. "Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics a Review." *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 58, no. 2 (2015): 278-288.

## Conclusión General

## Conclusión General

A modo de Conclusión General, se presenta un esquema (Esquema 1) de las diferentes estrategias que se evaluaron en la presente tesis, donde se estudió la revalorización del alperujo como material de partida para la obtención de medios de cultivos para el desarrollo de cepas del género *Rhodotorula*.

En la gráfica se destacan en amarillo los productos que se podrían obtener a partir de los diferentes tratamientos evaluados: aceite, pigmentos carotenoides, levadura residual, biofenoles de interés comercial y biomasa residual apta para procesos biotecnológicos.

A partir del desengrasado del alperujo, se obtienen cantidades significativas de aceite, el cual, luego de un proceso de refinado puede comercializarse. A su vez, el alperujo resultante (desengrasado) puede someterse a un proceso de secado, lo que permitiría su almacenamiento. El alperujo seco y desengrasado constituyó la materia prima para la realización de extractos acuosos (EAs), que constituyeron medios de cultivo líquidos para el desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638. El sólido resultante se espera que tenga una menor carga orgánica debido a la extracción de material soluble con el agua.

Al mismo tiempo, a partir de la centrifugación del alperujo fresco, se obtuvo el agua de alperujo (AA). Su desengrasado, dió como resultado la obtención de cantidades significativas de aceite. A su vez, el AA resultante, constituyó otra opción de medio líquido para el desarrollo de la cepa estudiada.

Tanto los EAs como el AA, fueron desfenolizados empleando acetato de etilo y mediante este proceso, se recuperan biofenoles de interés, y, se generan medios líquidos más aptos para el crecimiento de microorganismos. El desarrollo de *Rh. mucilaginosa* LPSC 638 en estos medios permite la obtención de pigmentos

## Conclusión General

carotenoides de importancia (toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno), además de una mayor cantidad de biomasa microbiana, respecto a las de los medios normales.

Por otra parte, la combinación del alperujo y bagazo de cebada (BSG), constituye una opción novedosa de reconversión de dos subproductos agroindustriales abundantes en el SOB. En efecto, la combinación de ambos, arrojó resultados prometedores para ser utilizados como sustratos sólidos de bajo costo para el desarrollo y síntesis de carotenoides (toruleno, torularodina y  $\beta$ -caroteno) en *Rh. mucilaginoso* LPSC 638. Las propiedades fisicoquímicas de ambos subproductos resultaron complementarias para mejorar el desarrollo de la levadura.

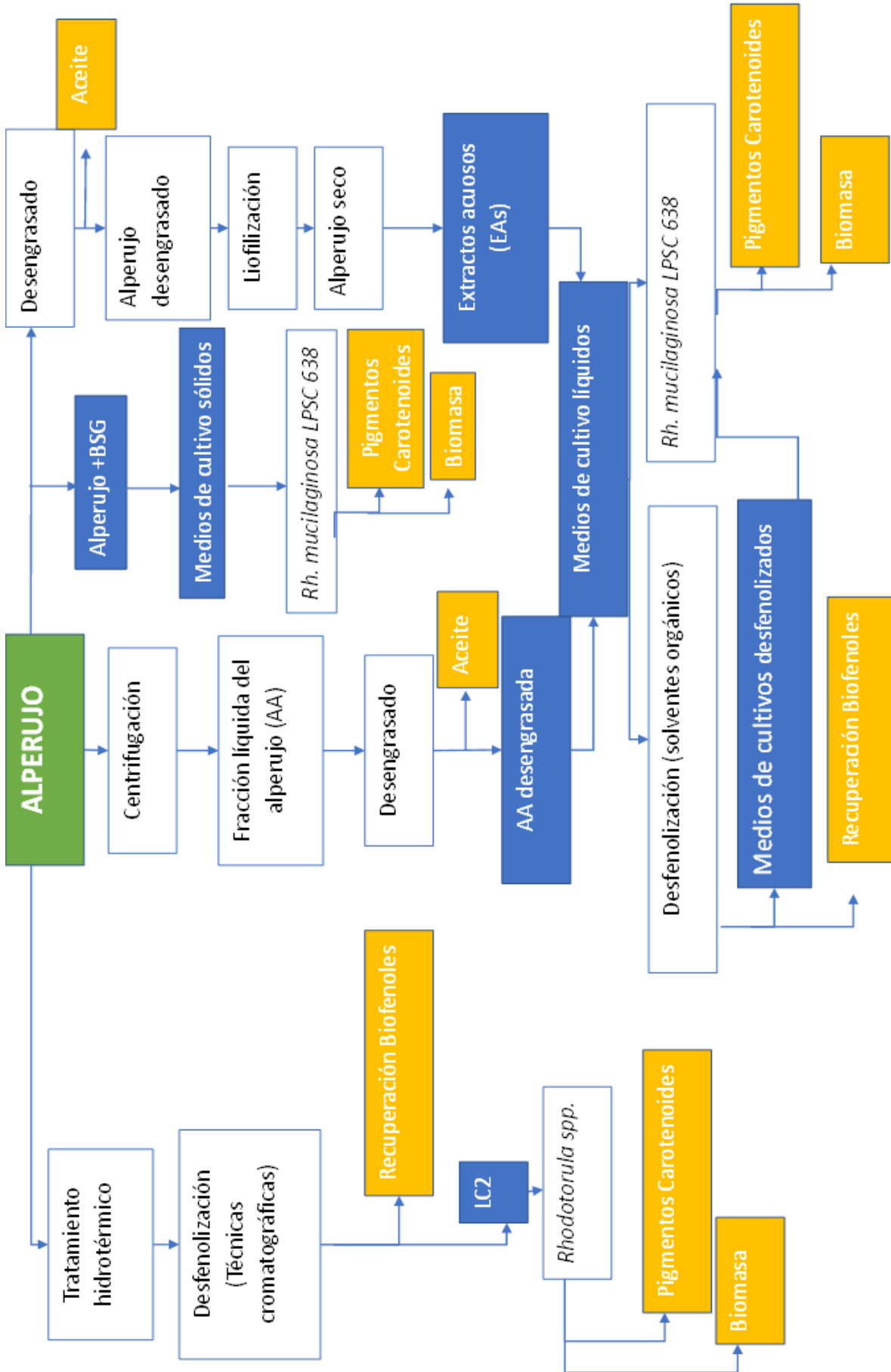
Finalmente, aplicando un tratamiento hidrotérmico se separan una fase líquida (L), un aceite enriquecido en compuestos fenólicos y un sólido más digerible. A partir de L, mediante técnicas cromatográficas, se recuperan compuestos fenólicos de interés económico como hidroxitirosol, tirosol y DHPG. A su vez, el líquido resultante desfenolizado (LC2), se reutilizó como medio de cultivo líquido para levaduras del género *Rhodotorula*. Obteniéndose, por un lado, carotenoides de interés económico (toruleno,  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno), y biomasa microbiana, además de un LC2 con menor carga orgánica.

Para concluir, esta Tesis demuestra el gran potencial de reconversión del alperujo, a través de los diferentes productos obtenidos. A la vez, las variantes de reutilización expuestas, permitirían reducir el impacto ambiental que generan este tipo de residuos cuando son depositados en grandes volúmenes, sin un tratamiento previo y por un largo período de tiempo. En consecuencia, se brinda una nueva propuesta de reutilización que

**Conclusión General**

se encuadra dentro del concepto de economía circular. El cual, en la actualidad, está cobrando relevancia e interés a escala global y nacional.

Conclusión General



**Esquema 1.** Se muestran las estrategias estudiadas en esta tesis, para revalorizar el alperujo, indicando los medios de cultivo derivados (recuadros azules) y los productos obtenidos (recuadros amarillos).