



LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA



BYOSYSTEMS  
CENTRO DE INGENIERÍA BIOLÓGICA

## REVALORIZACIÓN DE RESIDUOS VITIVINÍCOLAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ADITIVOS ALIMENTARIOS Y ENZIMAS



Dr. José Manuel Salgado Seara

Santiago, Julio 2014



## **I. INTRODUCCIÓN**

### **a) Residuos vitivinícolas**

- **Producción de residuos en el area geográfica.**
- **Descripción**
- **Aplicaciones**

### **b) Residuos de las almazaras**

## **II. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**

## **III. RESULTADOS**

### **a) Extracción de compuestos:**

- **Ácido tartárico, azúcares y compuestos fenólicos**

### **b) Producción de compuestos de un valor añadido mediante procesos**

#### **biotecnológicos**

- **Aditivos alimentarios, compuestos aromáticos, biosurfactantes, bacteriocinas, enzimas.**

## **IV. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**



**PRODUCCIÓN DE VINO**

- España (Rank 3 en UE): 37 millones hectolitros/año
- Portugal (Rank 5 in UE): 7 millones hectolitros/año

EUROSTAT



**GALICIA DO**



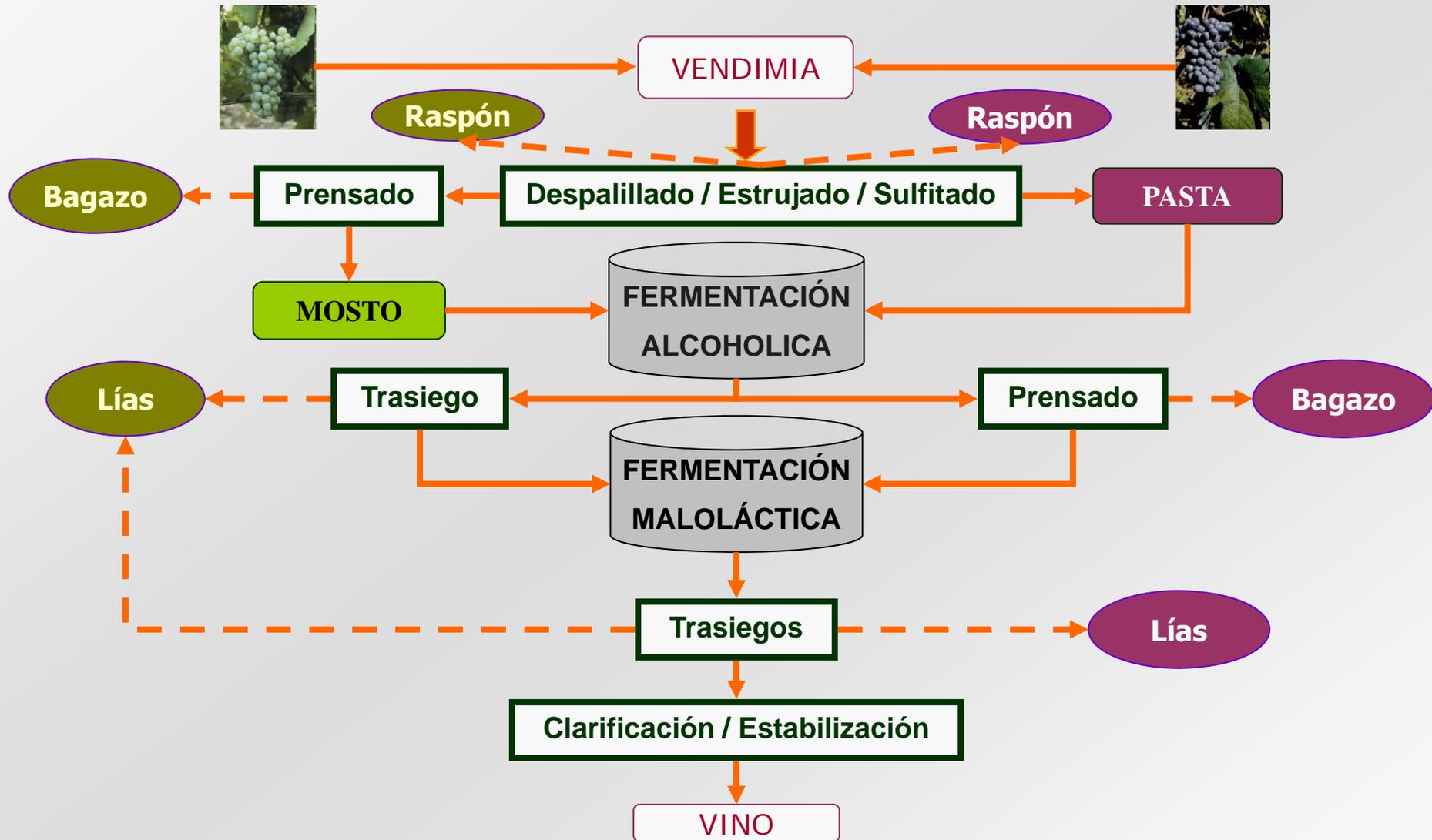
**AÑO 2012**

- 469.229 HL de vino

PROCESO DE VINIFICACIÓN

Vinificación en blanco

Vinificación en tinto



## OLIVE OIL EXTRACTION



PORTUGAL



31% usa el sistema continuo en 2 fases

ESPAÑA

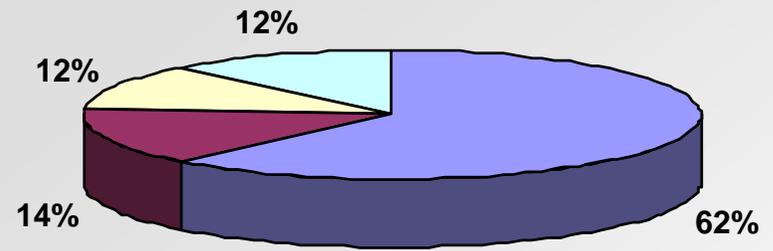


99% usa el sistema continuo en 2 fases



65.000 T/año en Galicia

- Eliminación del sarmiento**
- Quema de restos de podas
  - Uso como abono



■ Bagazo de uva ■ Lías ■ Raspón ■ Aguas residuales

## LÍAS DE VINIFICACIÓN

### Composición

**MICROORGANISMOS**



- Levaduras
- Bacterias lácticas
- Bacterias acéticas

**SUSTANCIAS PRESENTES EN EL VINO**



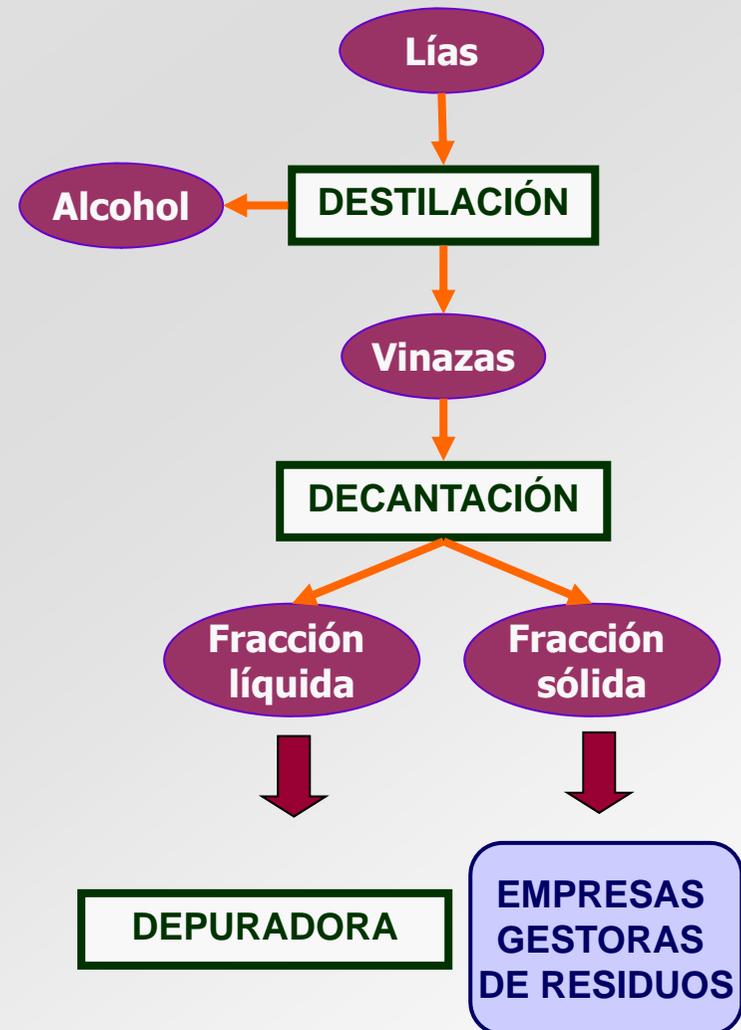
- Compuestos fenólicos
- Sales tartáricas
- Minerales

### Aplicaciones

**Aprovechamiento integral**

- Alimentación animal
- Empleo como compost
- Obtención de alcohol etílico
- Recuperación de levaduras
- Extracción de proteínas
- Contribuye al aroma de los destilados de bagazo

### Procesado



## BAGAZO

### Composición



### Vendimia

### Aplicaciones

#### Fertilizante

- Corrector físico de suelos
- Cenizas ricas en potasio
- La elevada acidez dificulta el comp.
- Inmovilización del nitrógeno

#### Alimentación animal

- Escaso valor nutritivo

### Procesado



#### Procesos de extracción

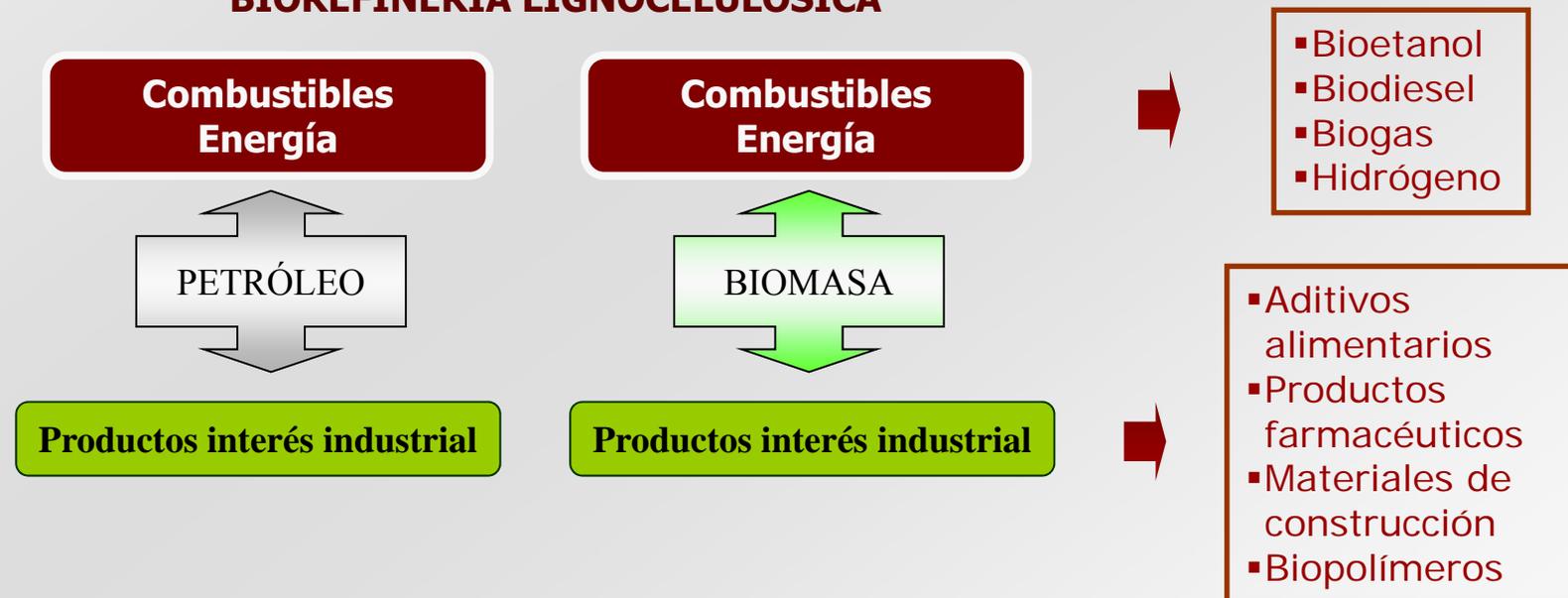
- Extracción de compuestos fenólicos
- Aceite a partir de las semillas

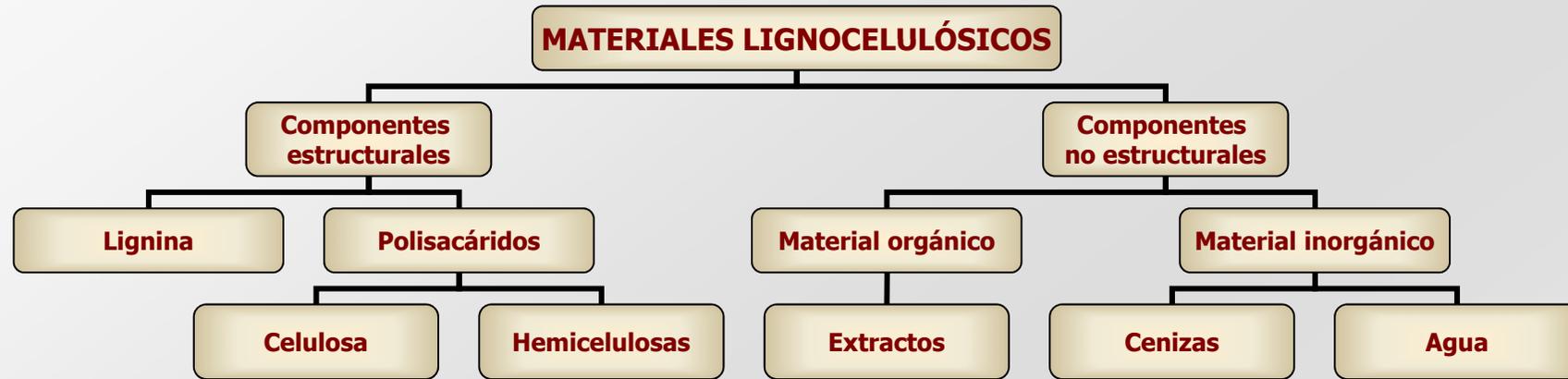
#### Fuente de azúcares

- Hidrolizado de bagazo para la producción de ácido láctico y biosurfactantes.



**BIOREFINERÍA LIGNOCELULÓSICA**

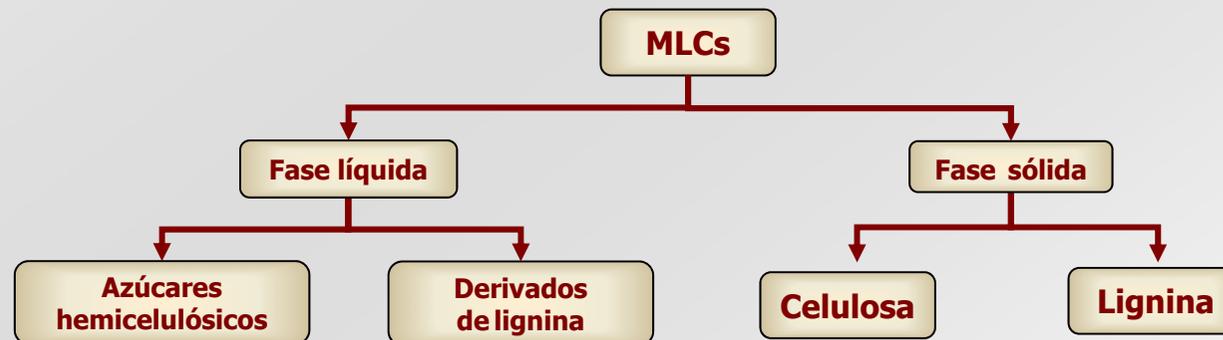




### APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO



Generación de disoluciones de azúcares



## Laboratorio de Biotecnología Agroalimentaria

**REVALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRAILES**



**INDUSTRIA VITIVINÍCOLA**

1. **Identificación y caracterización de los residuos generados.**
2. **Extracción de compuestos de interés industrial.**
3. **Biotransformación de estos compuestos en productos de un valor añadido.**
4. **Formulación de medios de cultivo de bajo coste.**

### OTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

1. **Análisis sensorial y caracterización aromática de vinos, destilados y licores tradicionales de Galicia.**
2. **Elaboración de licores y nuevos productos.**

## **BIOSYSTEMS**

### **REVALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRAILES**



### **INDUSTRIA VITIVINÍCOLA Y DEL ACEITE DE OLIVA**

- 1. Caracterización de los residuos de almazara**
- 2. Biorremediación de las aguas residuales de la industria del aceite y el vino mediante hongos filamentosos**
- 3. Evaluación de diferentes residuos de ambas industrias para producir enzimas mediante fermentación en estado sólido.**

### **OTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**

- 1. Bioproducción de compuestos aromáticos (lactonas)**
- 2. Caracterización de microorganismos sometidos estrés oxidativo por altas presiones**
- 3. Producción de ácido cítrico a partir del glicerol**

✓ **Caracterización de los residuos vitivinícolas**

**Vinazas**

	Valdeorras DO 1	Ribeiro DO 2	Rías Baixas DO 3	Ribeira Sacra DO 4	Monterrei DO 5
pH	3,6	4,1	3,6	3,8	3,6
CE (mS/cm)	3,02	6,60	6,79	5,39	4,87
Sólidos (%)	10,9	27,0	12,2	3,1	16,1
Cenizas (%)	1,7	8,9	6,2	2,1	4,5
Fenólicos (mg AG/mL)	1,9	0,84	0,59	2,5	2,1

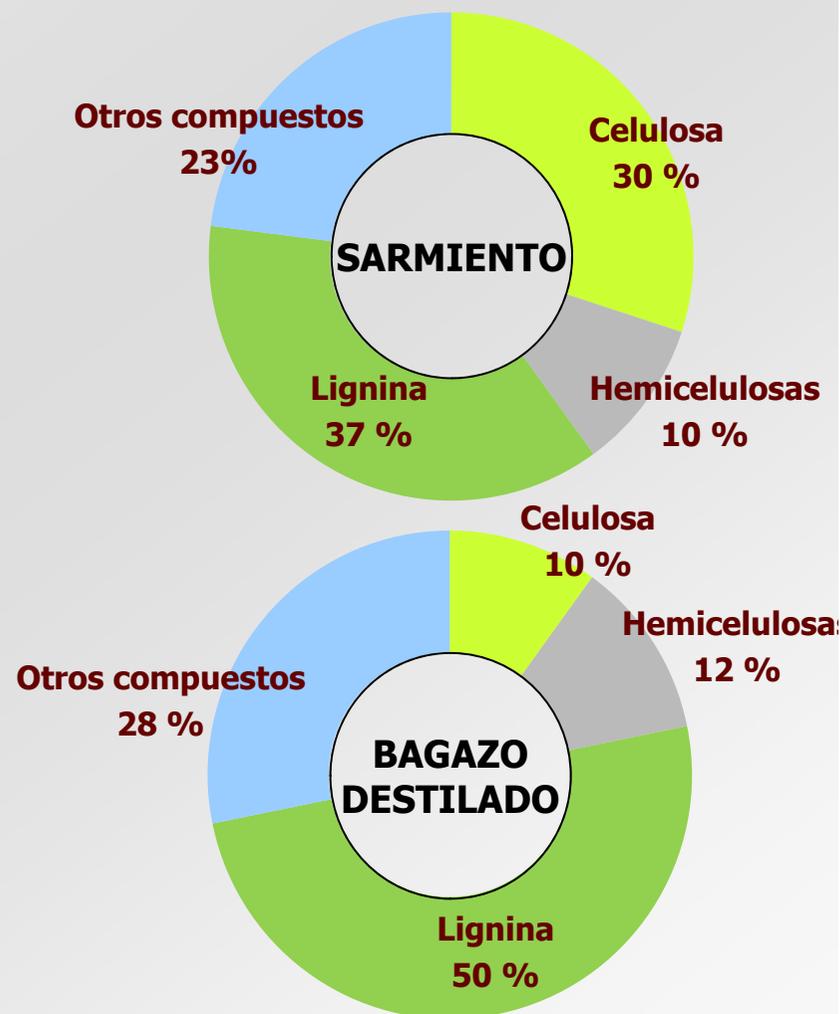
## ✓ Caracterización de los residuos vitivinícolas

	VINAZAS (FRACCIÓN COMPLETA)					VINASSES (FASE LÍQUIDA)				
	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5
C (mg/g)	60.1	94.7	87.3	67.7	102.8	24.1	13.4	53.3	54.9	54.3
N (mg/g)	3.2	6.3	3.6	3.1	22.1	0.70	0.70	1.1	1.3	1.3
C/N	18.8	15.0	24.3	21.8	4.7	34.4	19.1	48.5	43.9	41.8
Fe (mg/Kg)	61.1	9.4	90.2	3.4	16.3	12.7	<1.0	<2.0	<2.0	1.7
Mn (mg/Kg)	8.1	4.5	9.5	3.7	11.6	6.7	2.1	2.7	2.7	5.1
Zn (mg/Kg)	3.5	3.1	3.5	1.3	2.7	1.9	2.1	2.3	1.2	1.5
Ca (mg/Kg)	945.8	124.8	267.9	58.8	890.4	71.6	89.1	115.6	46.7	26.7
Mg (mg/Kg)	122.8	136.1	162.9	131.4	151.4	106.0	124.0	101.9	118.1	120.5
Al (mg/Kg)	128.0	<75	300.6	<70	<70	<25.0	<25.0	<20.0	<20.0	<10.0
Cu (mg/Kg)	12.7	219.2	128.7	1.6	10.4	<1.0	1.70	8.3	<1.0	0.73

✓ **Caracterización de los residuos vitivinícolas**

**Caracterización de los residuos sólidos**

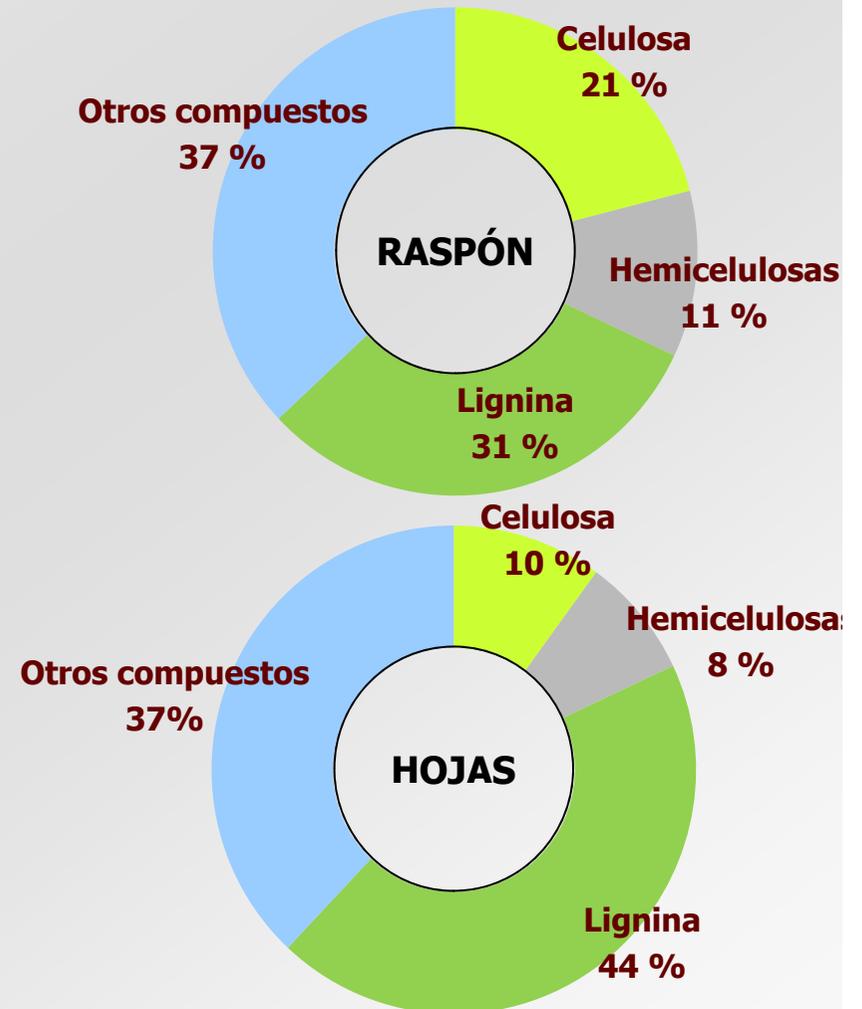
Residuo sólido	Sarmiento	Bagazo de uva
Nitrógeno (g/kg)	5.62 ± 0.72	16.97 ± 6.26
TOC (g/kg)	453.56 ± 2.06	482.37 ± 16.04
C/N	80.76	28.42
Azúcares reductores(mg/g)	55.35 ± 0.05	3.00 ± 0.01
Proteína (mg/g)	1.27 ± 0.03	1.30 ± 0.00
Fenoles totales (mg/g)	1.25 ± 0.04	0.19 ± 0.01
Lípidos (mg/g)	29.6 ± 0.00	21.3 ± 0.00



✓ **Caracterización de los residuos vitivinícolas**

**Caracterización de los residuos sólidos**

Residuo sólido	Sarmiento	Bagazo destilado
Nitrógeno (g/kg)	5.62 ± 0.72	16.97 ± 6.26
TOC (g/kg)	453.56 ± 2.06	482.37 ± 16.04
C/N	80.76	28.42
Azúcares reductores(mg/g)	55.35 ± 0.05	3.00 ± 0.01
Proteína (mg/g)	1.27 ± 0.03	1.30 ± 0.00
Fenoles totales (mg/g)	1.25 ± 0.04	0.19 ± 0.01
Lípidos (mg/g)	29.6 ± 0.00	21.3 ± 0.00



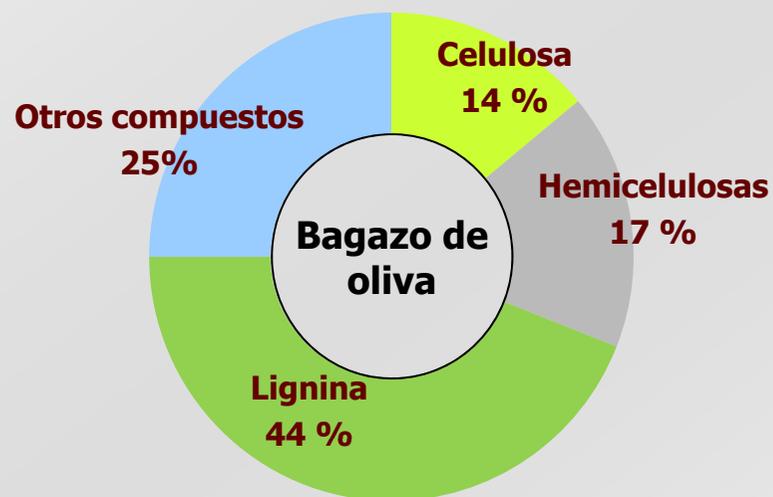
✓ **Caracterización de los residuos de almazaras**

**Caracterización de residuos sólidos**

Residuo sólido	Bagazo de oliva
Nitrógeno (g/kg)	8.59 ± 1.92
TOC (g/kg)	516.61 ± 15.00
C/N	60.16
Azúcares reductores (mg/g)	24.30 ± 1.42
Proteína (mg/g)	0.30 ± 0.03
Fenoles totales(mg/g)	2.57 ± 0.04
Lipidos (mg/g)	102.46 ± 0.04

**Caracterización de residuos líquidos**

Residuo líquido	Alpechín
Nitrógeno (mg/L)	198 ± 10
TOC (g/L)	45.6 ± 0.0
DCO (g/L)	261 ± 25
Azúcares reductores (g/L)	68.5 ± 1.2
Proteína (mg/L)	-
Fenoles totales (g/L)	7.9 ± 1.9
Sólidos totales (g/L)	155 ± 1



✓ **Extracción de compuestos de interés industrial**

**Extracción ácido tartárico**

**APLICACIONES**

**S. QUÍMICO**

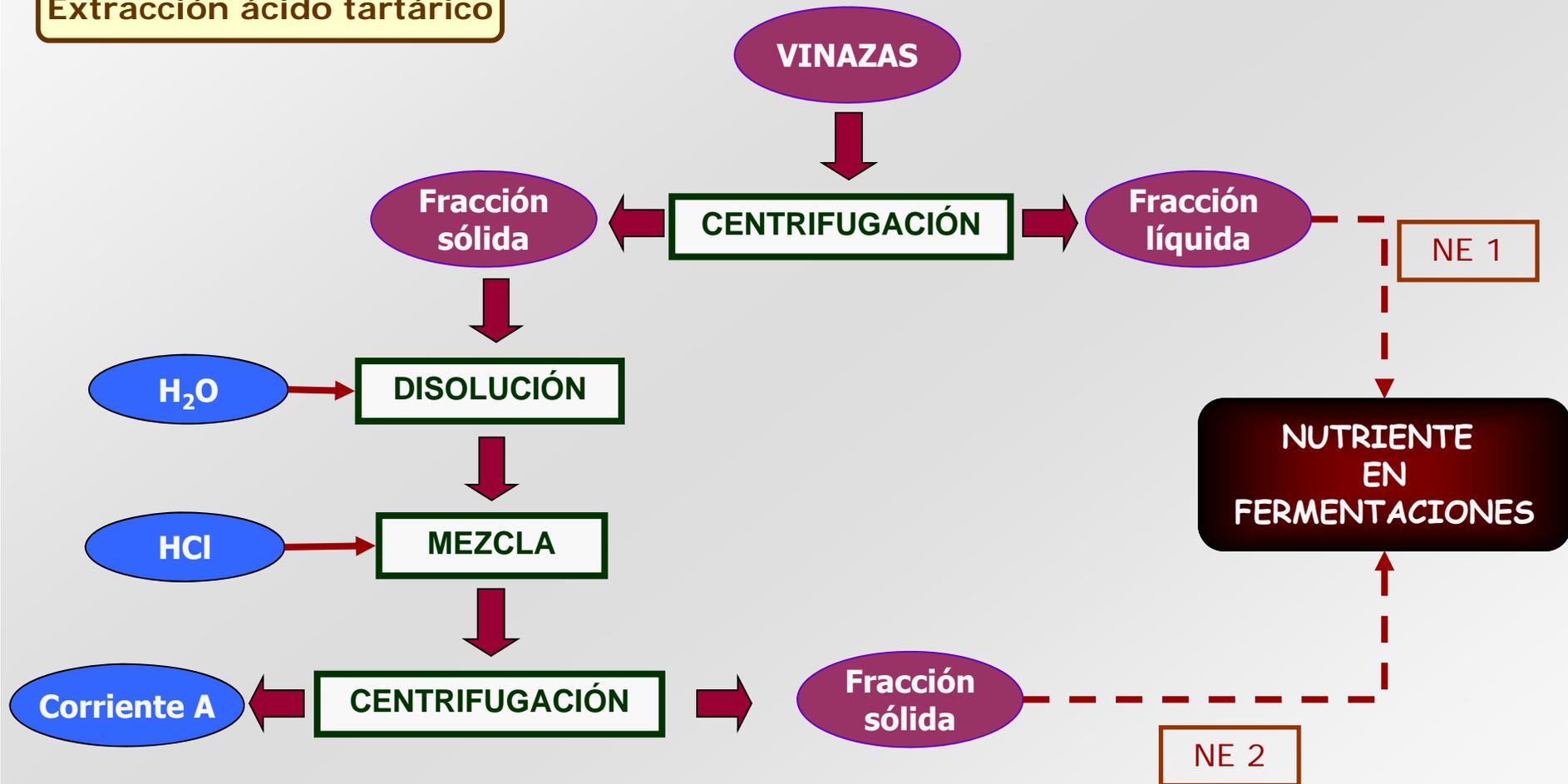
- **Industria farmacéutica:** antibióticos, píldoras, pastillas efervescentes, medicina para las cardiopatías, compuestos terapéuticos que combaten el SIDA
- **Construcción:** retrasan el fraguado del yeso
- **Industria química:** preparación de tartratos, acomplejante de iones metálicos

**S. ALIMENTARIO**

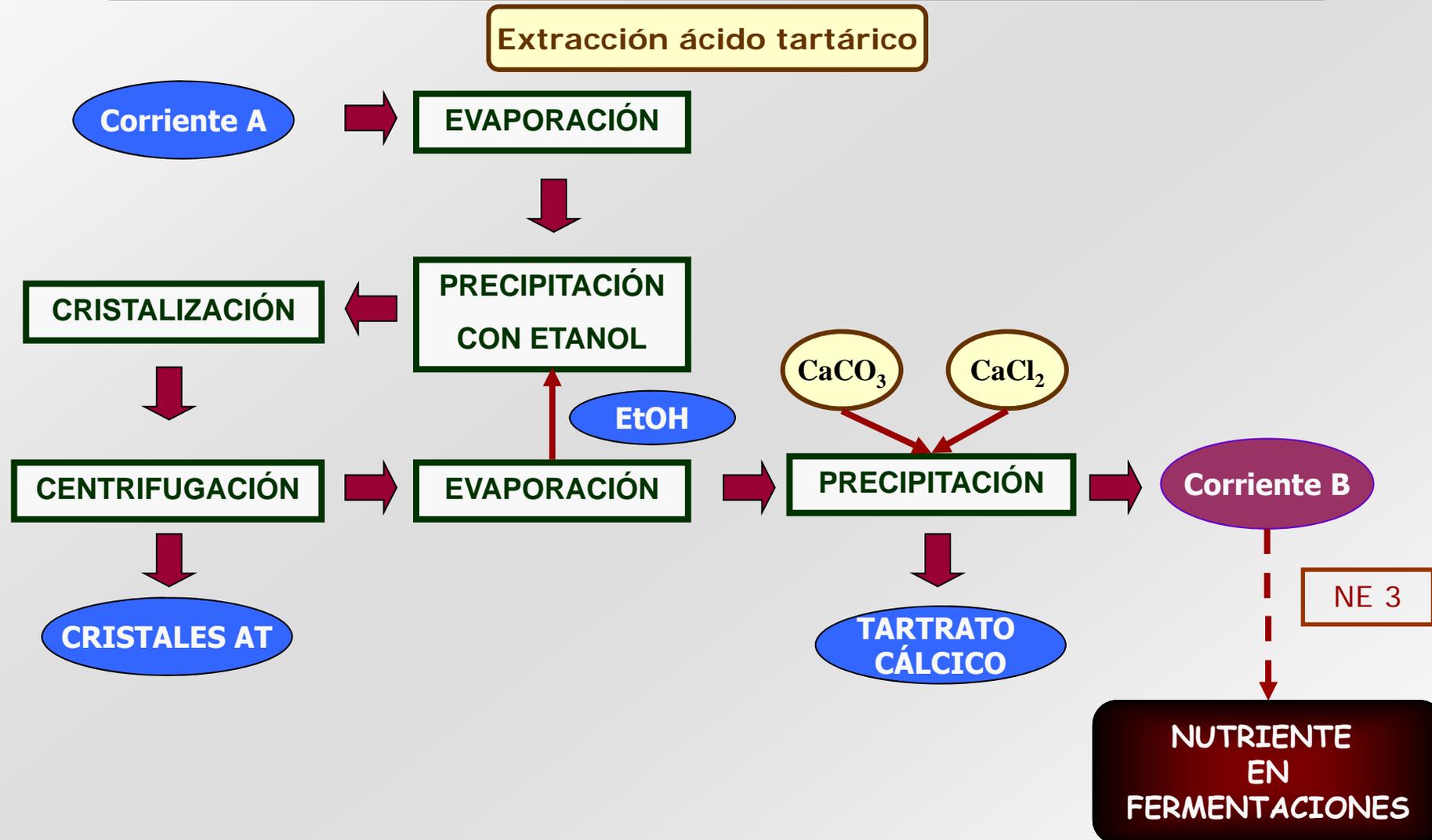
- **Industria enológica:** acidificación del mosto o del vino
- **I. alimentaria:** conservante, acidificante y emulsionante (E-334)

✓ Extracción de compuestos de interés industrial

Extracción ácido tartárico



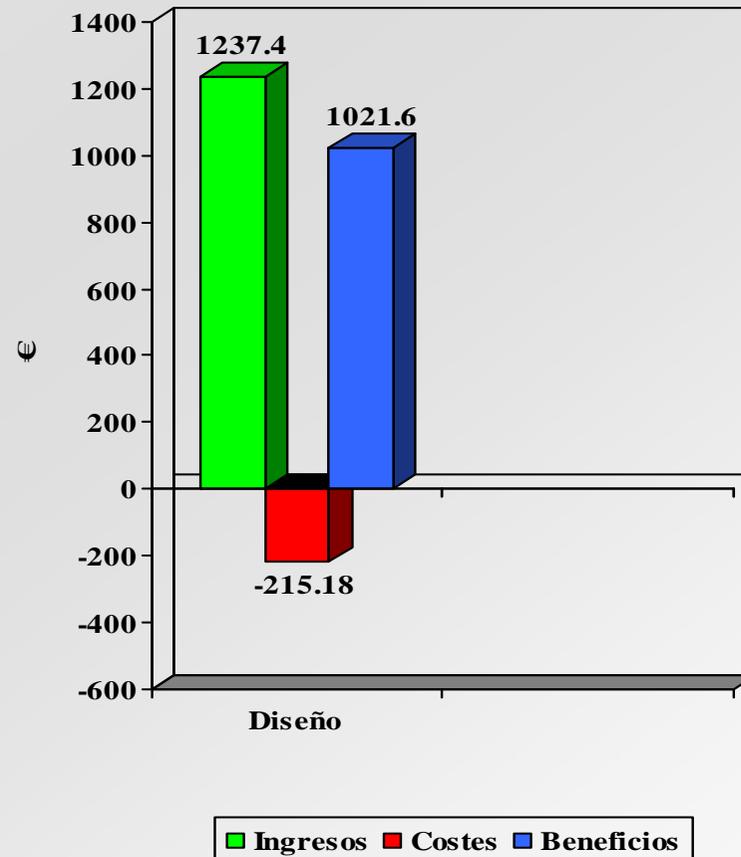
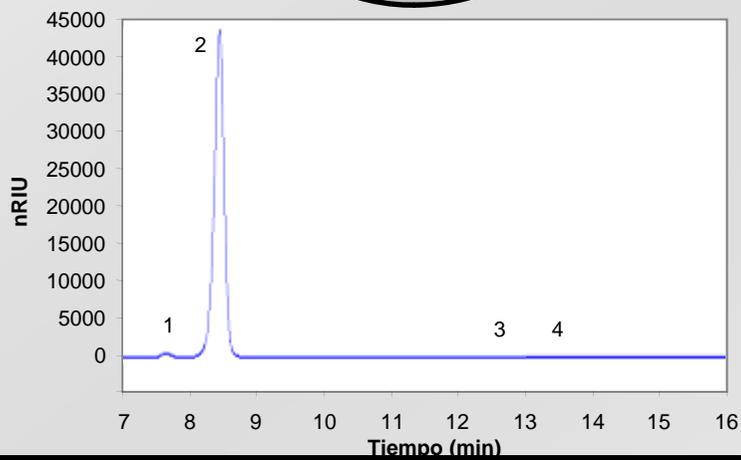
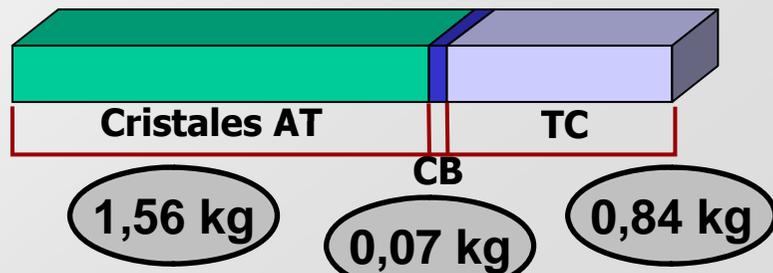
✓ Extracción de compuestos de interés industrial



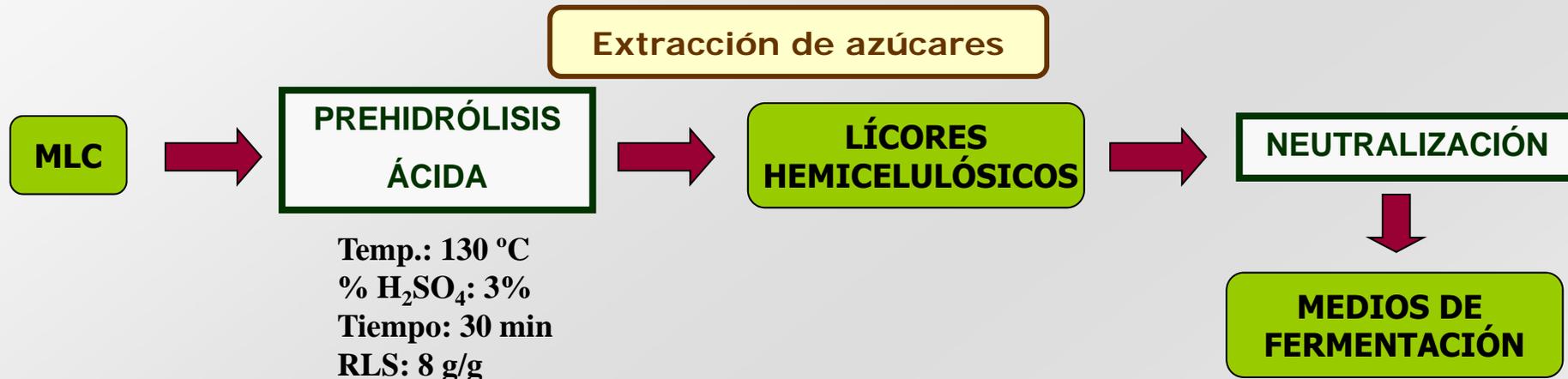
✓ Extracción de compuestos de interés industrial

Extracción ácido tartárico

2.47 kg AT/100 kg vinazas



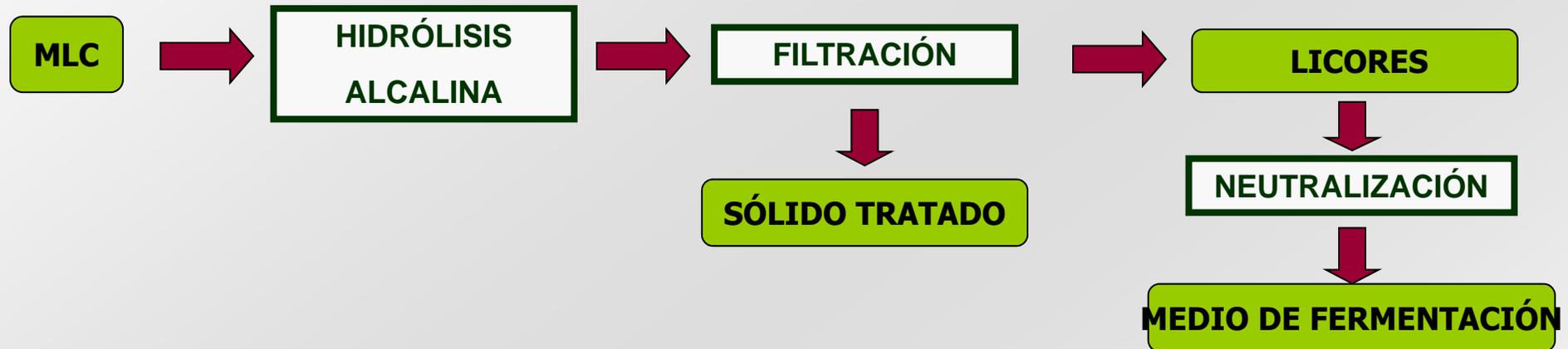
✓ Extracción de compuestos de interés industrial



Residuos	Glucosa	Xilosa	Xil/Gluc	Arabinosa	Ácido acético	HMF	Furfural
Raspón	5.31	12.62	2.37	2.11	2.65	0.00	0.00
Bagazo destilado	2.24	9.31	4.15	1.11	1.62	0.00	0.00
Hojas	4.38	6.83	1.56	3.69	1.59	0.00	0.00
Sarmiento	8.92	12.91	1.44	1.33	7.61	0.00	0.00

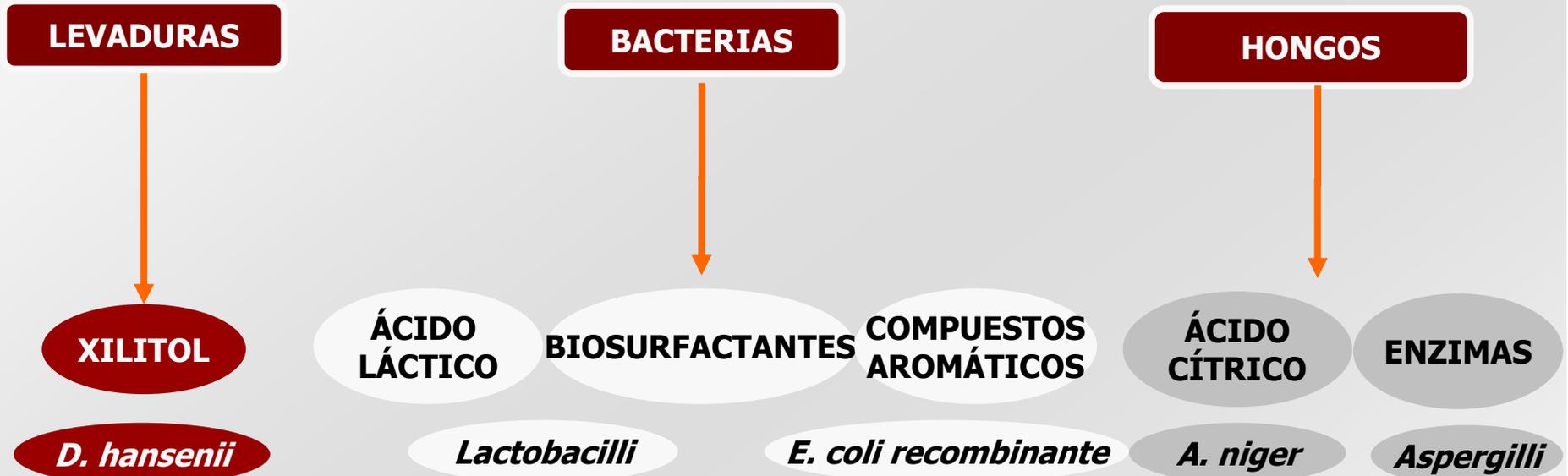
✓ Extracción de compuestos de interés industrial

Extracción de compuestos fenólicos



Residuo sólido	Ácido vainillico	Vainillina	Ácido ferúlico	Ácido gálico	3,4-dihydroxybenzaldehyde	Ácido p-hydroxybenzoic	Ácido siríngico	Ácido p-cumárico
Raspón	74.1	-	92.2	107.9	20.5	31.5	49.2	102.6
Hojas	192.7	-	35.8	91.3	23.2	44.0	38.9	134.0
Sarmiento	33.4	-	138.8	130.0	-	8.1	57.2	31.5

✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido



✓ **Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido**

**XILITOL**

**S. QUÍMICO**

- **Industria cosmética: productos de higiene bucal, cremas hidratantes y antiarrugas**
- **Recubrimiento de formulaciones vitamínicas**
- **Componente en preparados medicinales**

**S. ALIMENTARIO**

- **Edulcorante (E-967) para chicles, caramelos, productos lácteos, etc**
- **En alimentos preparados a base de cereales evita cambios de color**
- **En alimentos a base de pescado aumenta su vida útil**
- **Edulcorante en dietas hipocalóricas y para diabéticos**
- **Empleo en dietas para pacientes con osteoporosis**

✓ **Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido**

**ÁCIDO  
LÁCTICO**

**S. QUÍMICO**

- Obtención de biopolímeros biodegradables
- Aplicaciones en la industria textil
- Aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética

**S. ALIMENTARIO**

- Producción y procesado de derivados lácteos
- En el campo de los cereales
- En pastelería
- Tecnología de la carne
- En la fabricación de bebidas alcohólicas
- En la alimentación animal

✓ **Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido**

**ÁCIDO  
CÍTRICO**

**S. QUÍMICO**

- **Industria farmacéutica: efervescente, anticoagulante**
- **Industria cosmética y de limpieza: agente tampón, antioxidante**

**S. ALIMENTARIO**

- **Bebidas: previene el pardeamiento y la turbidez, regulador del pH, acidulante**
- **Alimentos: acidulante, aumenta la eficacia de los conservantes, emulsionante, antioxidante**
- **Agricultura: micronutriente en fertilizantes, mejora la disponibilidad de P en plantas**

✓ **Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido**

**COMPUESTOS  
AROMÁTICOS**

**4-vinilphenol**

- Aroma en sustancias de perfumería, alimentos y bebidas.
- Síntesis de biocompuestos.
- Producción de resinas, adhesivos, y materiales electrónicos.

**4-vinilguaiacol**

- Producto de valor en la industria alimentaria (aroma ahumado y picante)
- Presente en cervezas, vinos, salsa de soja

## ✓ Evaluación de las vinazas como nutriente económico en procesos biotecnológicos

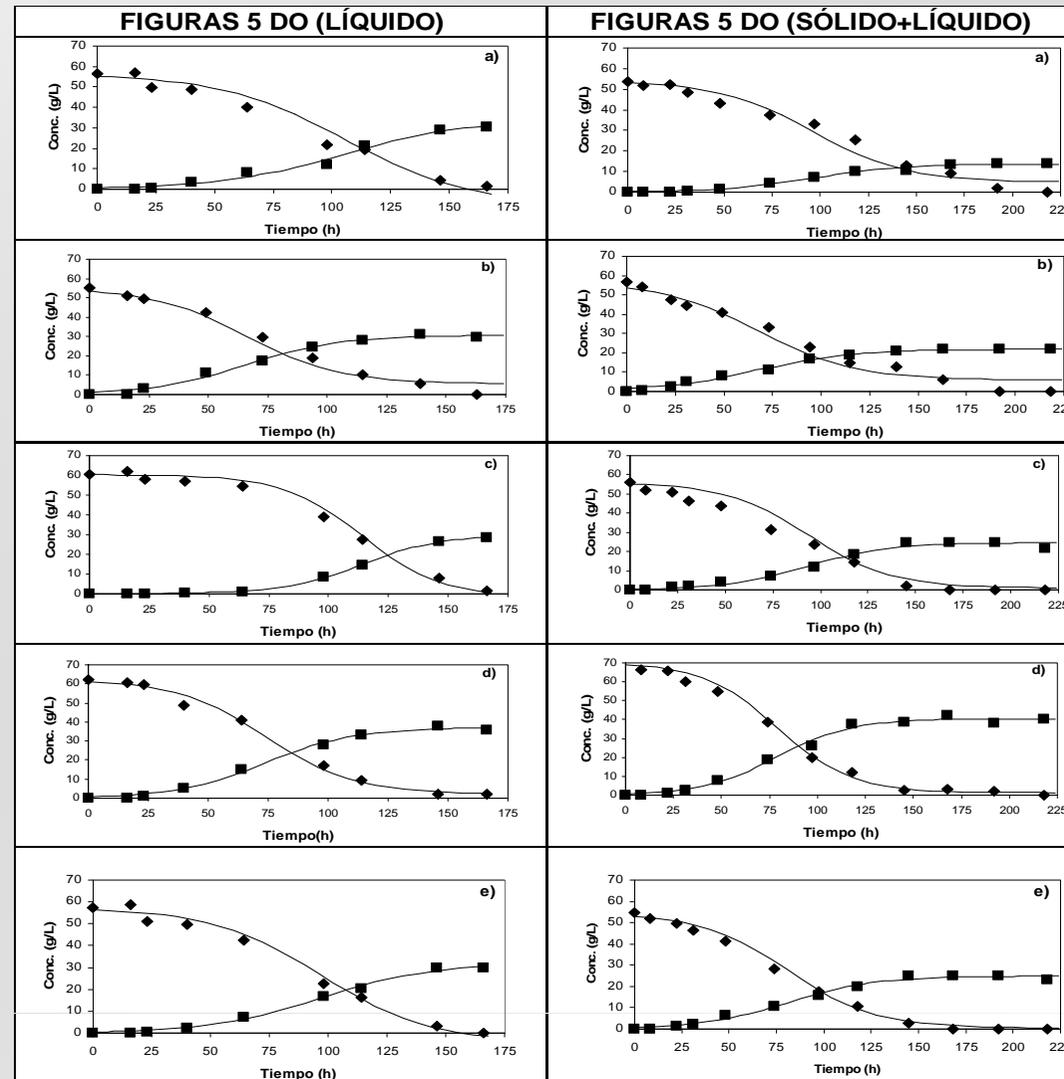
**VALDEORRAS**

**RIBEIRO**

**RÍAS BAIXAS**

**RIBEIRA SACRA**

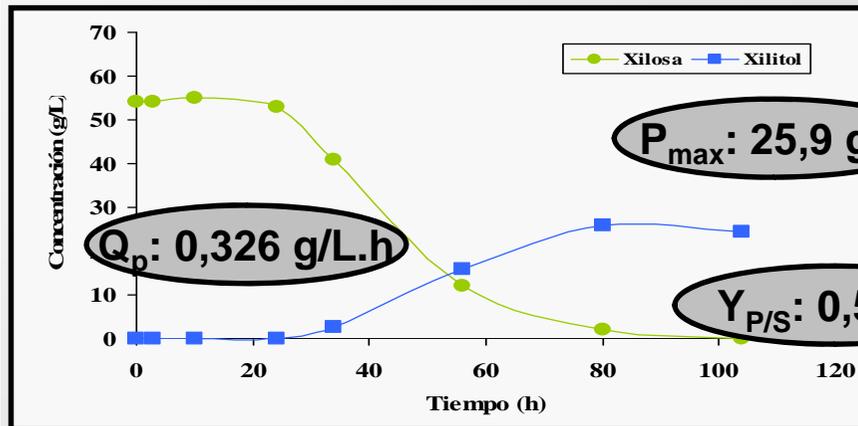
**MONTERREI**



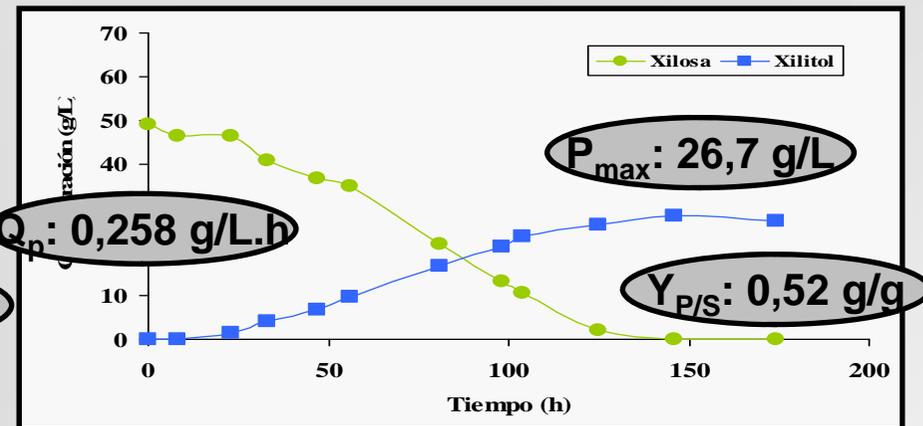
✓ Evaluación de las vinazas como nutriente económico en procesos biotecnológicos

*D. hansenii*

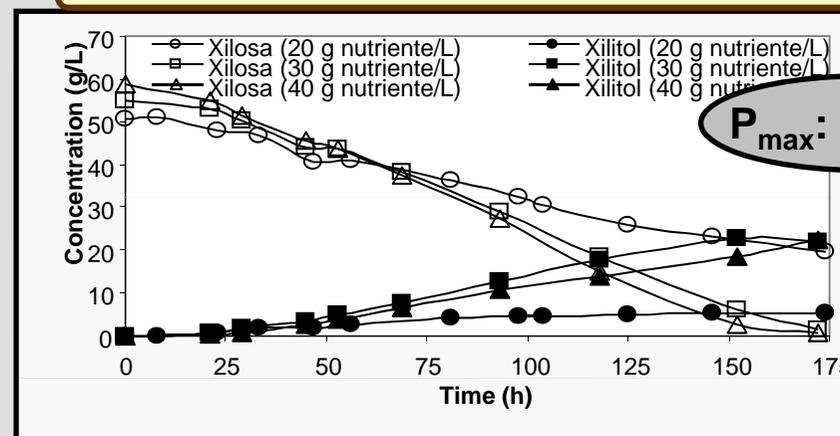
CSL (30 g/L)



EL (3 g/L) + EM (3 g/L) + Peptona (5 g/L)



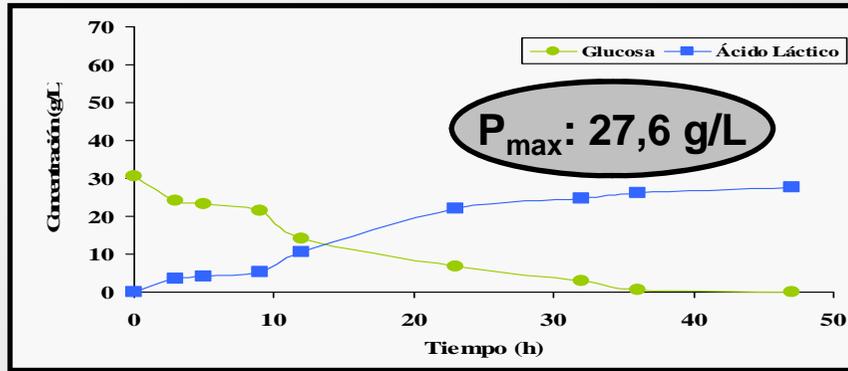
VINAZAS CON EXTRACCIÓN AT + CB



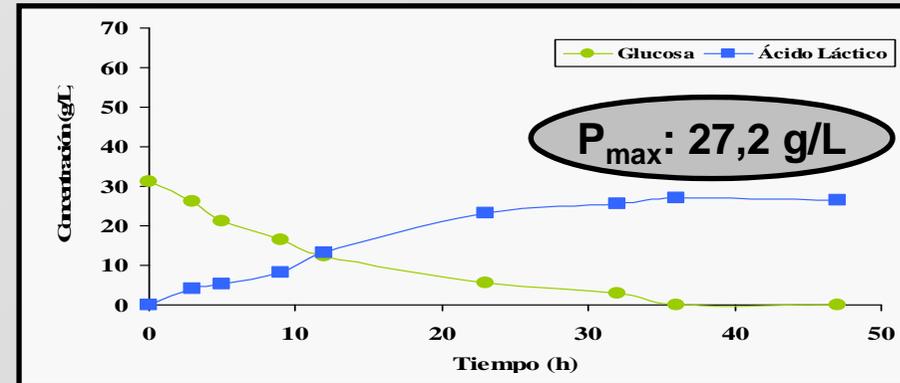
✓ Evaluación de las vinazas como nutriente económico en procesos biotecnológicos

*L. rhamnosus*

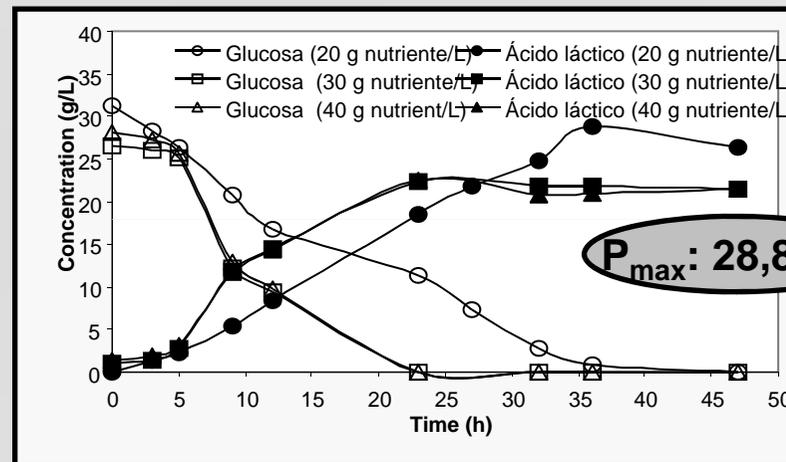
CSL (30 g/L)



Medio Mercier

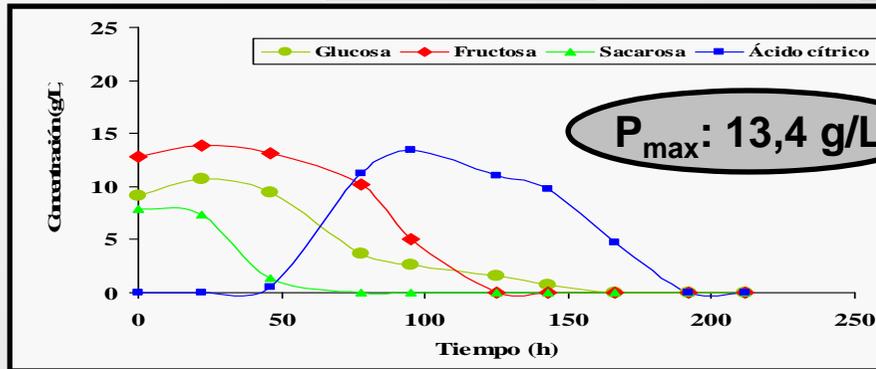


VINAZAS CON EXTRACCIÓN AT + CB

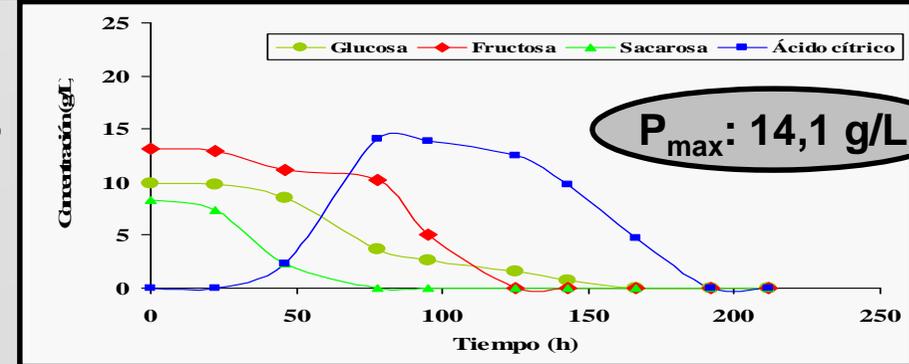


✓ Evaluación de las vinazas como nutriente económico en procesos biotecnológicos

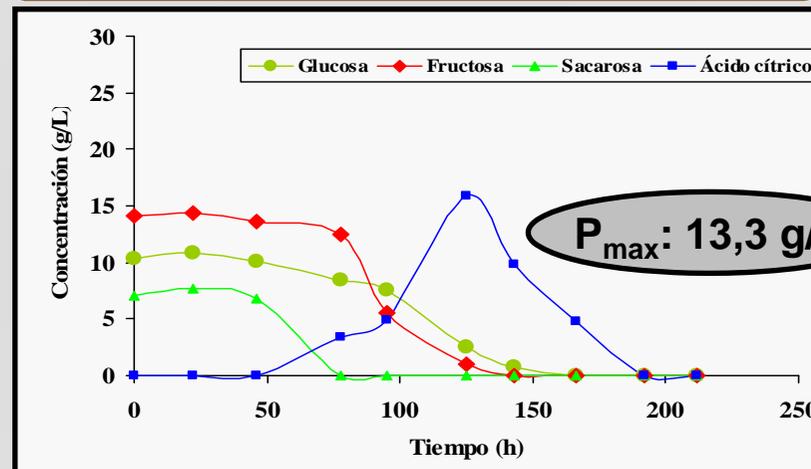
CSL (30 g/L)



$\text{NH}_4\text{NO}_3$  (25 g/L) +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2.5 g/L) +  $\text{CuSO}_4$  (0.04 g/L)



VINAZAS CON EXTRACCIÓN AT + CB

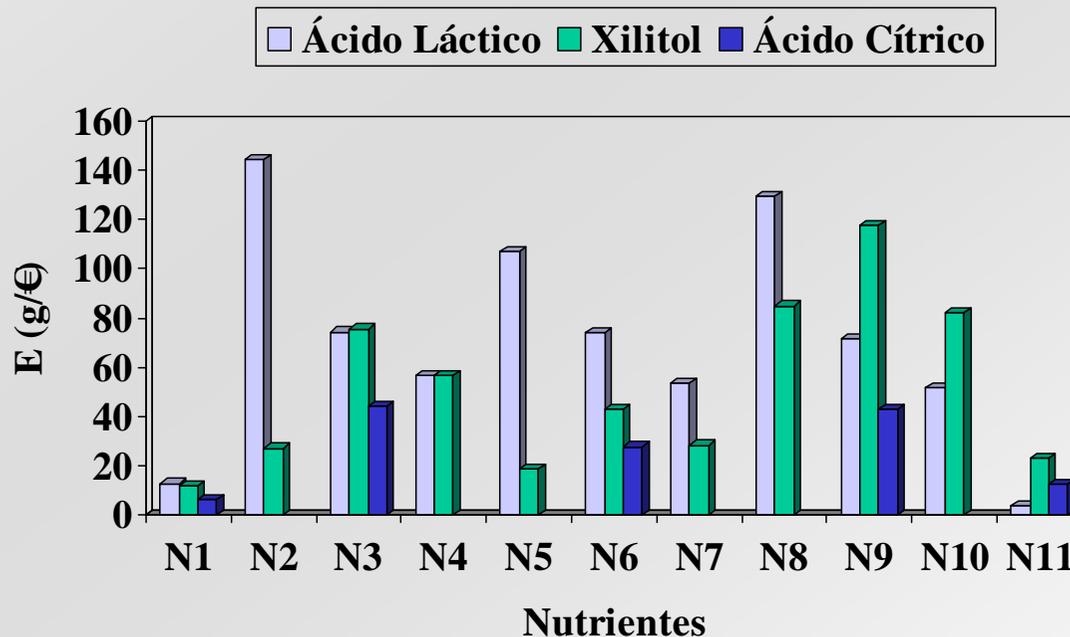


✓ Evaluación de las vinazas como nutriente económico en procesos biotecnológicos

EFICIENCIA ECONÓMICA

Caracterización de residuos sólidos

Medios	Nutrientes
N1	CSL
N2	Vinazas con extracción AT (20 g/L) + CB
N3	Vinazas con extracción AT (30 g/L) + CB
N4	Vinazas con extracción AT (40 g/L) + CB
N5	Vinazas con extracción AT (20 g/L)
N5	Vinazas con extracción AT (30 g/L)
N7	Vinazas con extracción AT (40 g/L)
N8	Vinazas sin extracción AT (20 g/L)
N9	Vinazas sin extracción AT (30 g/L)
N10	Vinazas sin extracción AT (40 g/L)
N11	Comerciales



✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido



✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido

**CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO DE BAGAZO CONCENTRADO**

Hidrolizado de bagazo	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Ácido acético	Ácido fórmico
Neutralizado	2.2	9.3	1.1	1.6	N.D.
Detoxificado	1.8	7.8	0.93	1.6	N.D.
Detoxificado y concentrado	12.9	50.1	6.7	9.7	1.3
Concentrado sin detoxificar	14.0	51.2	8.5	10.7	1.5

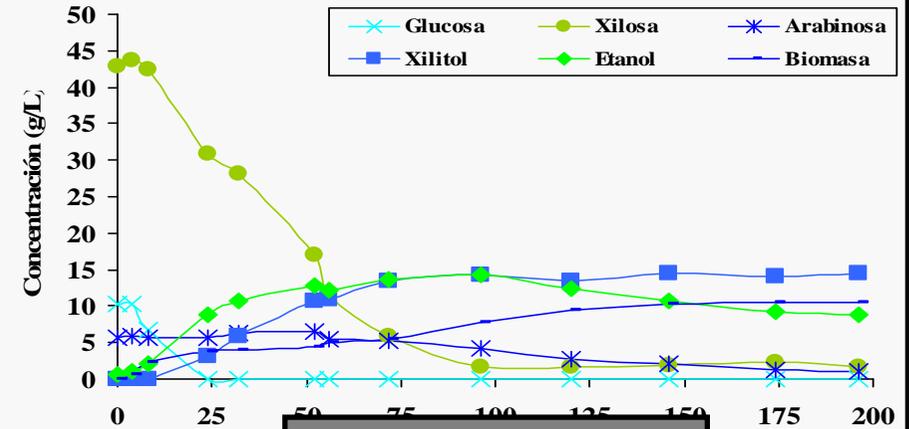
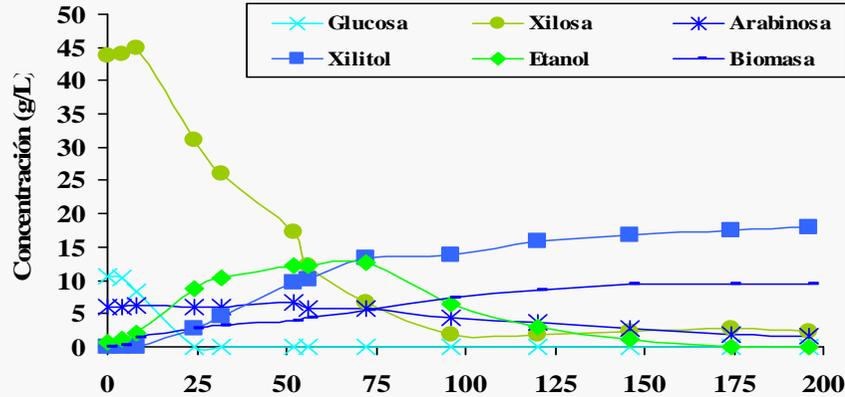
Hidrolizado de bagazo	Fe	Mn	Cu	Zn	Mg	Ca	Na	K	Al
Neutralizado	108.2	4.6	0.52	<0.25	0.20	297.8	31.5	1.7	<10.0
Detoxificado	<1.0	1.7	<0.5	<0.25	0.43	100.1	25.2	1.1	<10.0
Detoxificado y concentrado	7.6	21.7	<0.5	<0.25	1.4	521.2	681.8	8.7	<10.0
Concentrado sin detoxificar	13.2	13.5	1.2	<0.25	1.1	739.0	171.7	9.4	<10.0

✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido

Vinazas líquidas +CB

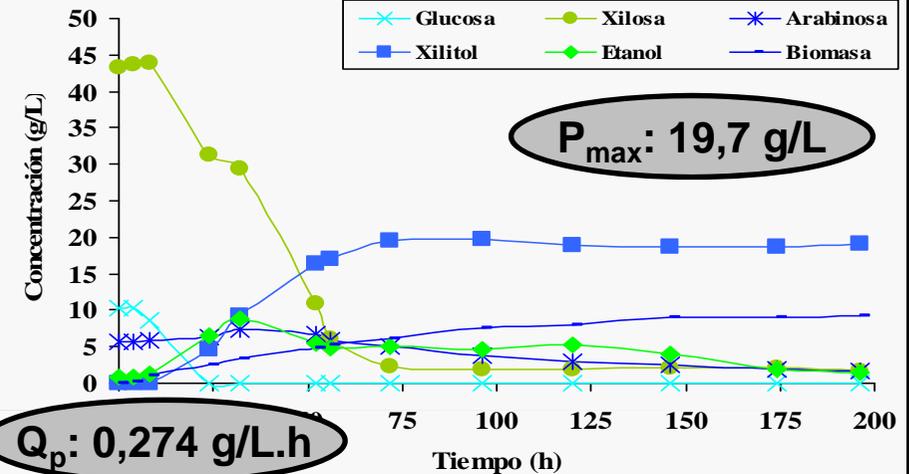
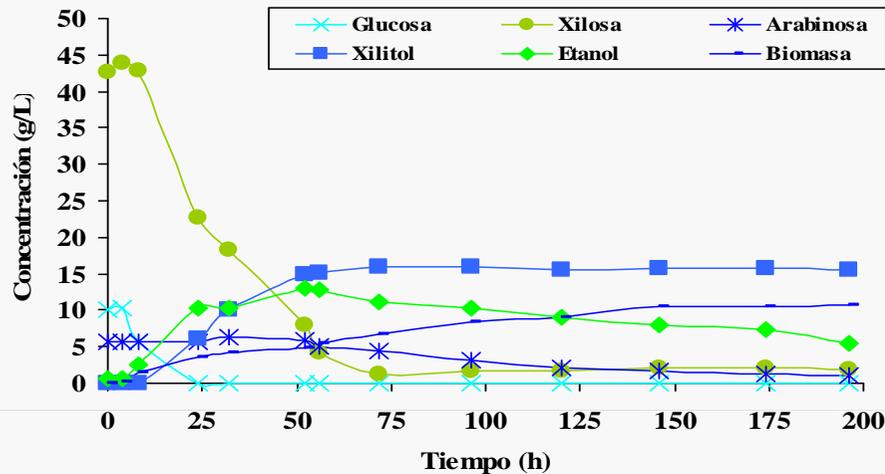
HID. DETOXIFICADO

CSL



EL+EM+P

SIN NUTRIENTES



$P_{max}: 19,7 \text{ g/L}$

$Q_p: 0,274 \text{ g/L.h}$

✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido

Producción de ácido láctico y xilitol en continuo

Producción ácido láctico (R1)

Producción xilitol (R2)

Microorganismo

• *L. rhamnosus*

• *D. hansenii*

Medio de cultivo

• Sustrato: medio sintético  
• Fuente de nitrógeno y minerales: medio Mercier.

• Sustrato: medio sintético  
• Fuente de nitrógeno y minerales: EL+EM+P.

Reactor

• Reactor 2L

• Reactor 10L

Temperatura

• 31.5 y 37 °C

• 30 °C

Agitación

• 120 a 170 rpm

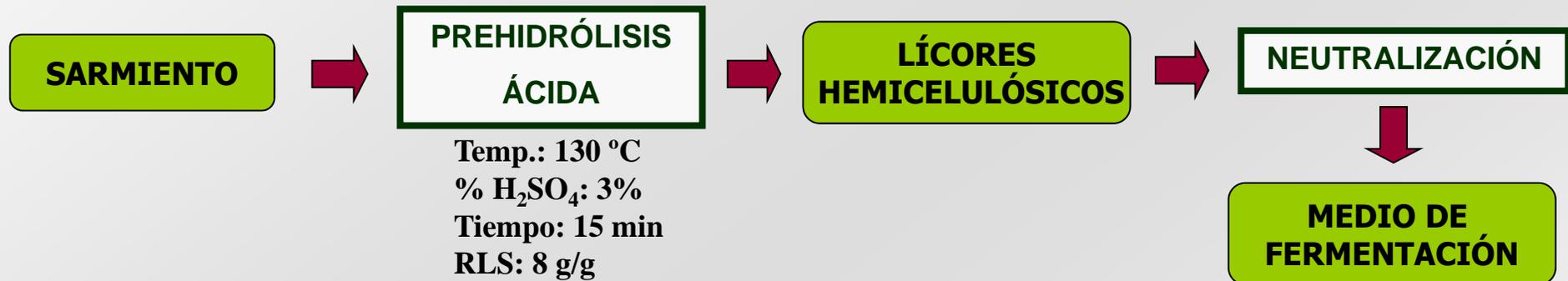
• 120 a 700 rpm

Flujo de aire

• 1 a 5 L/min

✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido

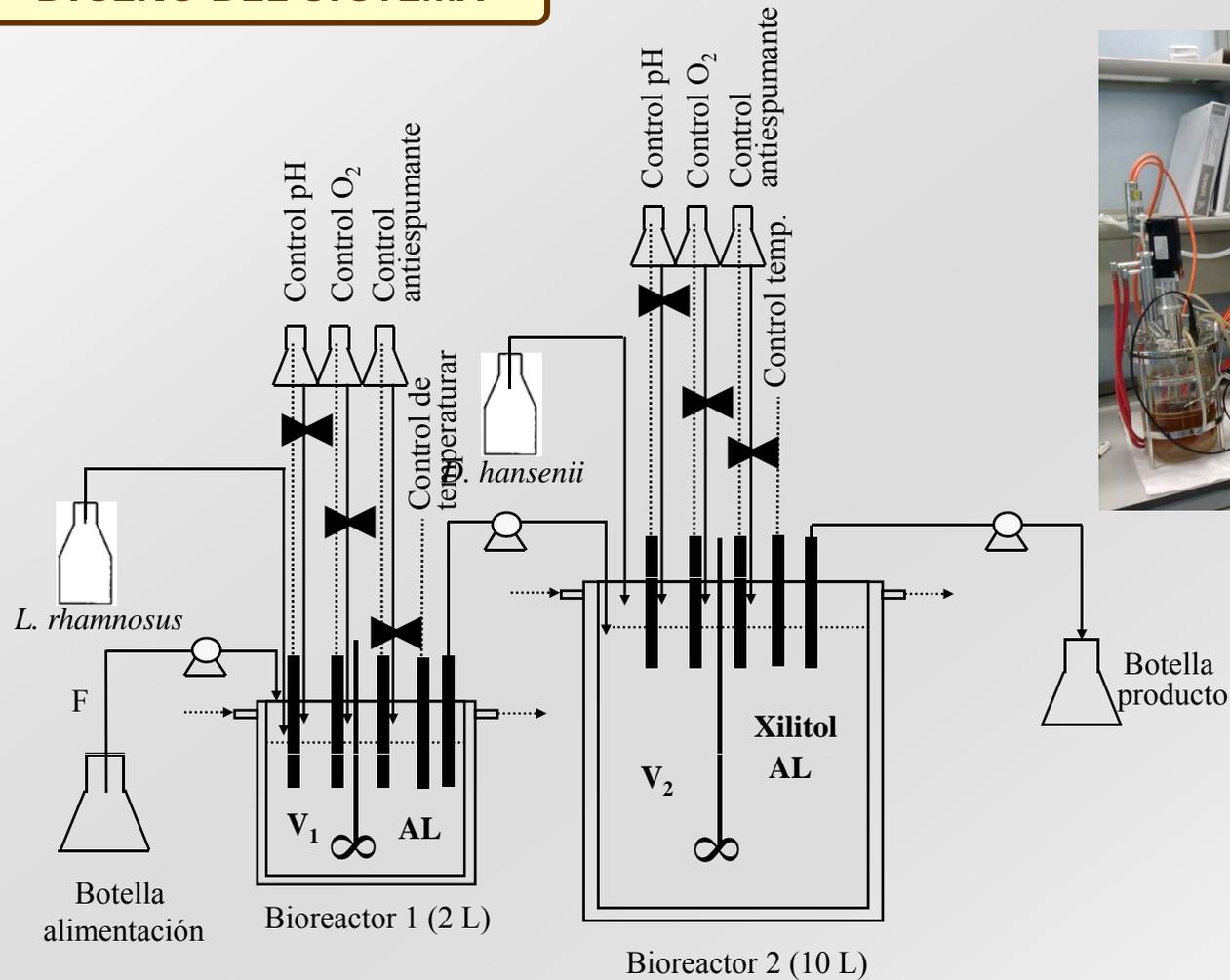
OBTENCIÓN MEDIO FERMENTACIÓN



	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Ácido acético (g/L)
Hidrolizado de sarmiento	8,9	12,9	1,3	7,6

✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido

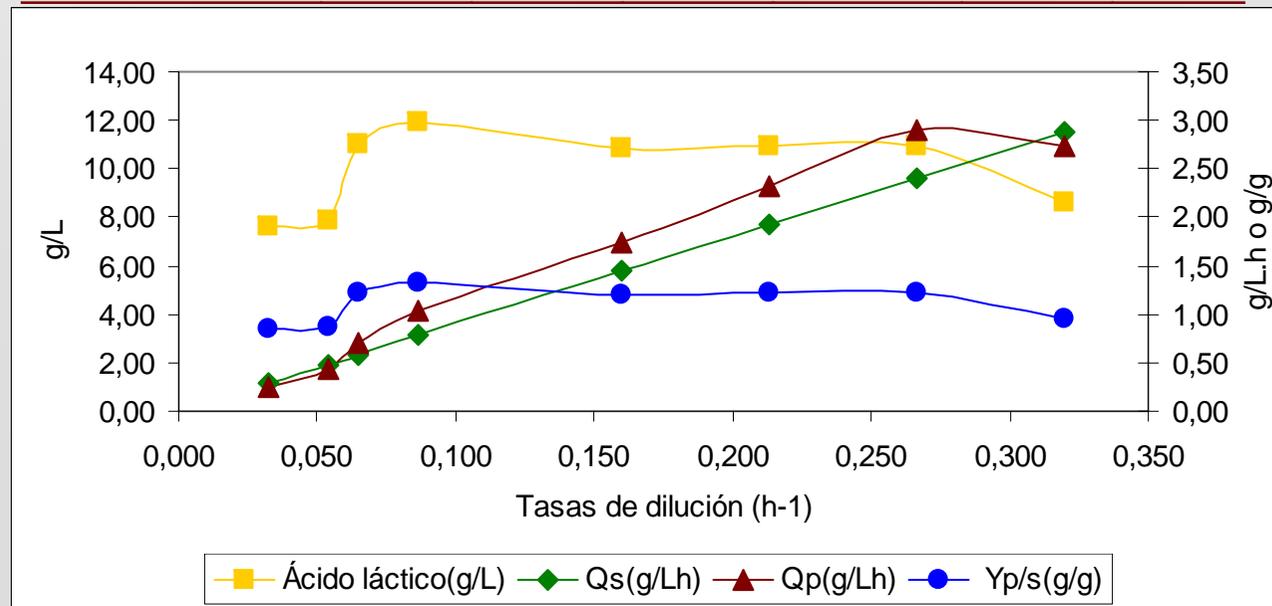
DISEÑO DEL SISTEMA



✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO (R1)

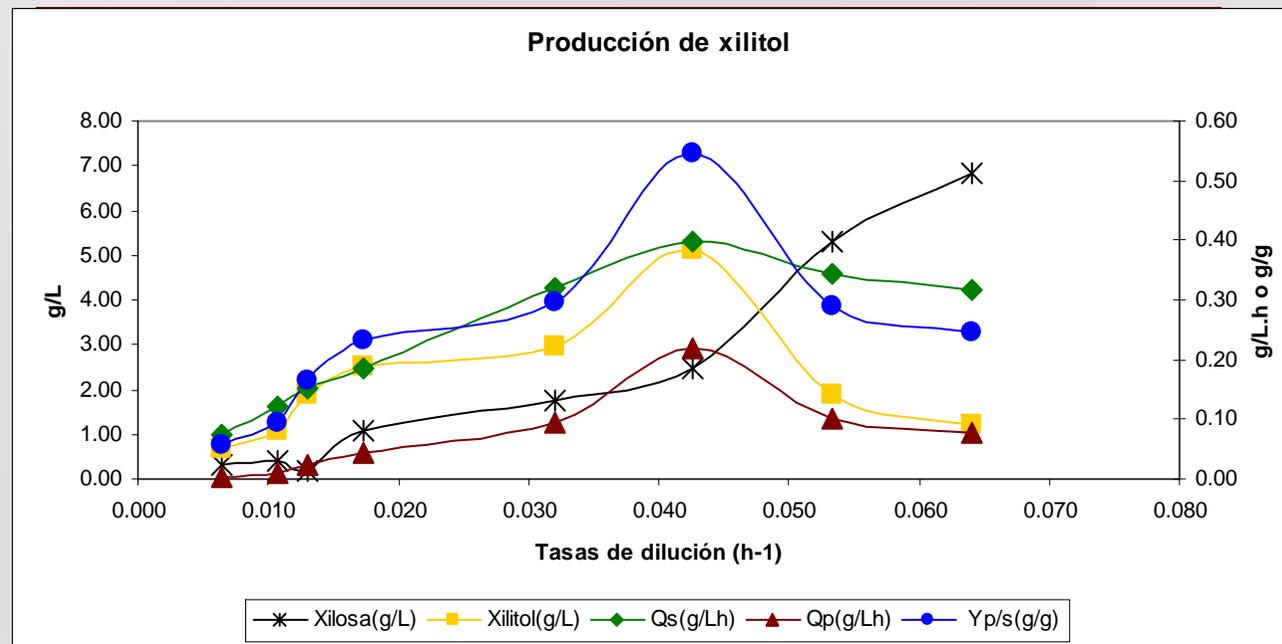
F (ml/min)	D (h <sup>-1</sup> )	XC (g/L)	AL (g/L)	Q <sub>S</sub> (g/L.h)	Q <sub>P</sub> (g/L.h)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)
1,08	0,065	2,2	11,0	0,575	0,713	1,24
1,44	0,086	2,4	11,9	0,766	1,029	1,34
2,67	0,160	2,2	10,8	1,421	1,734	1,22
3,55	0,213	2,2	10,9	1,890	2,328	1,23
4,44	0,266	2,7	10,9	2,363	2,908	1,23



✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido

PRODUCCIÓN DE XILITOL (R2)

F (ml/min)	D (h <sup>-1</sup> )	XR (g/L)	X (g/L)	Q <sub>S</sub> (g/L.h)	Q <sub>P</sub> (g/L.h)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)
1,08	0,013	0,17	1,9	0,151	0,025	0,16
1,44	0,017	1,07	2,5	0,185	0,043	0,23
2,67	0,032	1,77	3,0	0,321	0,096	0,30
3,55	0,043	2,46	5,1	0,398	0,218	0,55
4,44	0,053	5,33	1,9	0,345	0,100	0,29



## ✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido



**Microorganismos**

*Lactobacillus pentosus* CECT-4023

*Lactobacillus plantarum*  
CECT-221

**Enzimas**

Cellulase EC 3.2.1.4

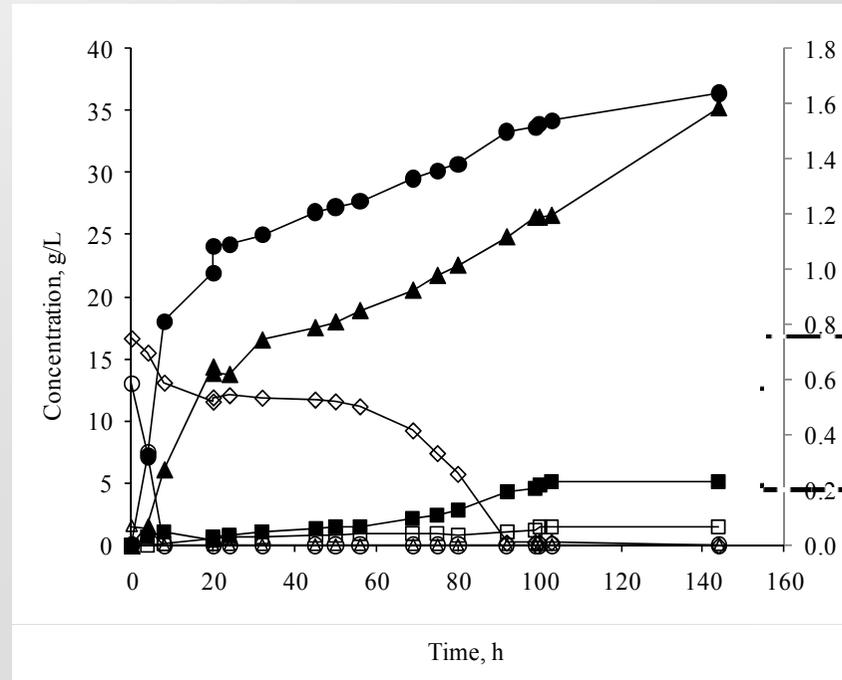
$\beta$ -glucosidase EC 3.2.1.21

**Medio de cultivo**

Hidrolizado hemicelulósico y  
celulosa de sarmiento

Fenilalanina + MRS

✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido



Lactic acid (g/L)	Qp LA (g/Lh)	PLA (mM)	Qp PLA (g/Lh)	Surface Tension (mN/m)	FCMC (g/L)	Biosurfactants (mg/L)
36.41	0.253	1.58	0.011	55.06	1.30	2.04

✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido

PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA



PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR  
FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

## ENZIMAS LIGNOCELULÓSICAS

### Celulasas

Endoglucanasas  
Celobiohidrolases  
 $\beta$ -glucosidasas

### Hemicelulasas

Xilanasas  
 $\beta$ -xilosidasas  
 $\beta$ -manasas, arabinofuranosidasas,  
 $\alpha$ -L-arabinasas  
Feruloyl esterasas

### Ligninasas

Lacasas  
Lignina peroxidasa  
Manganeso peroxidase

## LIPASAS

## ✓ Producción biotecnológica de compuestos de un valor añadido

### Microorganismos

• *Aspergillus niger*, *Aspergillus ibericus*, *Aspergillus japonicus*

### Medios de cultura

• Agro-industrial wastes: bagazo de oliva, bagazo de uva, vinazas, alpechín, sarmiento

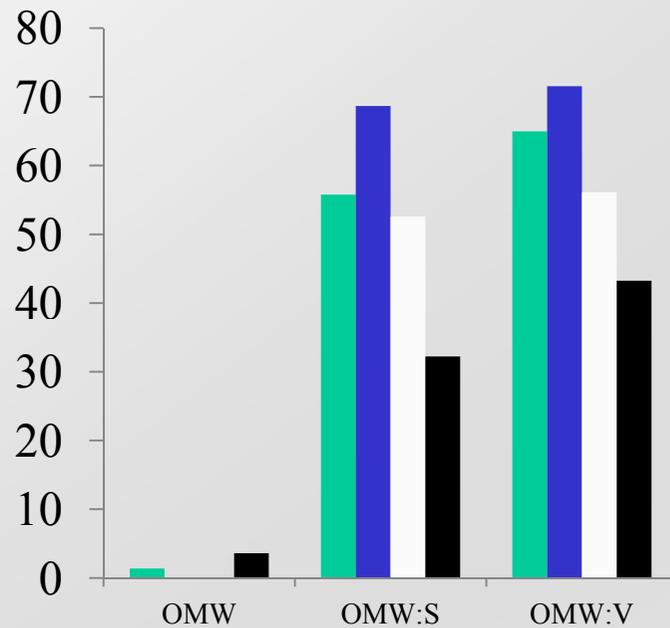


### Producción

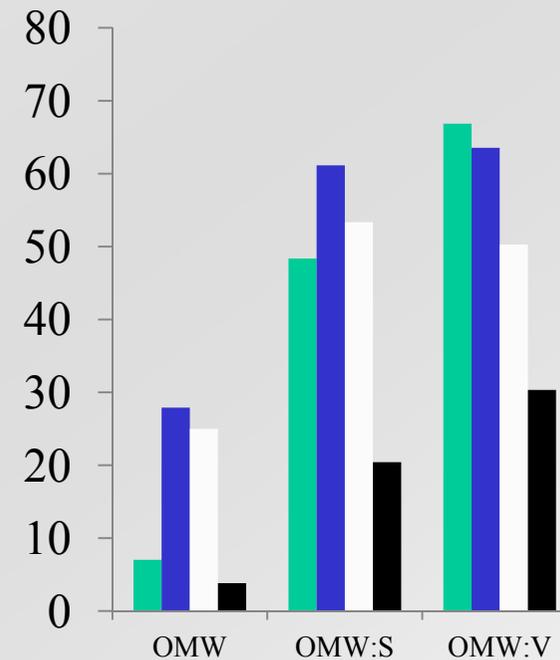
• Lipasas, celulasas, xilanasas

✓ **Bioremediación de vinazas y alpechín**

***A. uvarum***



***A. niger***



■ % red. COD      ■ % red. Abs. At 525 nm  
 ■ % red. Abs. At 395 nm    ■ % red. Total phenols

✓ **Bioremediación de vinazas y alpechín**

***A. uvarum***

***A. niger***

<i>A. niger</i> MUM 03.58	OMW	OMW:S (1.1)	OMW:V (1:1)
<b>Biomasa (g/L)</b>	28.95	20.34	28.97
<b>Proteasas (U/L)</b>	-	250	875
<b>Lipasas (U/L)</b>	1130.91	821.16	940.97
<b>Tanasas (U/L)</b>	284.26	38.77	137.01

<i>A. uvarum</i> MUM 08.01	OMW	OMW: SALTS (1.1)	OMW:Vina sses (1:1)
<b>Biomasa (g/L)</b>	29.82	18.93	27.43
<b>Proteasas (U/L)</b>	2500	1600	6200
<b>Lipasas (U/L)</b>	841.61	99.35	251.31
<b>Tanasas (U/L)</b>	-	-	54.29

## FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

**REVALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRAILES**



**INDUSTRIA VITIVINÍCOLA Y  
DEL ACEITE DE OLIVA**

1. Escalado de la producción de enzimas mediante fermentación en estado sólido de residuos vitivinícolas.
2. Escalado de la producción biotecnológica de aditivos alimentarios a partir de residuos de la industria vitivinícola.
3. Otros tratamientos para a la co.bioremediación de aguas residuales de la industria vitivinícola y la industria del aceite.