



Producción de ésteres volátiles a través de tecnología de fermentaciones utilizando residuos cítricos

Volatile ester production using citrus waste through fermentation technology

SALCEDO POMARI, SANDRA ISABEL¹
CARITA CALLA, ARTURO¹

ÁLVAREZ ALIAGA, MARÍA TERESA¹
CRESPO MELGAR, CARLA FABIANA¹

CORRESPONDENCIA: SANDRITA_ISA28@HOTMAIL.COM

FECHA DE RECEPCIÓN: 23/09/2016

FECHA DE ACEPTACIÓN: 4/11/2016

Resumen

La acumulación de residuos generados por las industrias procesadoras de alimentos, entre ellos, los residuos cítricos producidos en el procesamiento de jugos, constituyen una problemática desfavorable para el medio ambiente. En diversos países incluyendo Bolivia no existen gestiones que se apliquen al manejo y aprovechamiento de estos residuos, los cuales representan aproximadamente más del 50 % del total de la fruta, por ello es necesaria una gestión integrada de estos residuos de acuerdo al concepto de "reducir, reutilizar y reciclar". En el Área de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, se estudia una alternativa de manejo y aprovechamiento de estos residuos cítricos, investigando la utilización de los mismos como materia prima para la producción de ésteres volátiles que tienen propiedades biosaborizantes. La conversión de residuos cítricos

Abstract

The accumulation of wastes from food processing industries, among them the citrus residues from the juice-processing industry becomes an issue due to its unfavorable impact for the environment. Several countries including Bolivia do not have alternatives for waste management. The citrus waste accounts 50% of the fruit. Therefore, an integrated procedure under the concept to reduce-reuse-recycling is needed. An alternative for management and reuse of citric waste is planned at the Microbial Biotechnology Area of Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. Moreover, the utilization of citrus waste as feedstock for the production of volatile esters, with flavoring properties, is being researched. The conversion of citrus waste to bioflavors can be carried out by sugars-fermenting yeast through biotechnology. Therefore,

Área de Biotecnología Industrial. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Correspondencia: Sandra Isabel Salcedo Pomari.

Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra 2224, La Paz, Bolivia.

a biosabores se lleva a cabo mediante procesos biotecnológicos de fermentación de azúcares que involucran el uso de microorganismos como levaduras. Para ello, se plantea el estudio del comportamiento cinético de *Candida maltosa* asociado a su capacidad de producir ésteres volátiles, considerando que esta levadura es capaz de formar biopelículas como forma de protección ante compuestos inhibitorios propios de la materia prima.

PALABRAS CLAVE

Residuos cítricos, Ésteres volátiles, Biosabores

studies involving the kinetic behaviour of *Candida maltosa* associated to volatile ester production are planned. This yeast is able to form biofilm as a protection skill against inhibitory compounds from the feedstock.

KEY WORDS

Citrus waste, volatile esters, Bioflavors

PRODUCCIÓN DE CÍTRICOS Y GENERACIÓN DE RESIDUOS

Los cítricos como las naranjas, mandarinas, limones, toronjas y demás son considerados frutas universales de mayor producción en más de 100 países a nivel mundial, donde su cultivo está por encima de la mayoría de las frutas haciendo que esta tenga una importancia industrial que contribuye enormemente a la economía mundial. En cuanto a la producción mundial de cítricos, la FAO reportó en su último informe una producción total de cítricos de aproximadamente 78 millones de toneladas, de las cuales 66 % son naranjas, 16 % mandarinas, 11 % limones y limas y el 7 % pomelos (ComeNaranjas, 2011; FAO, 2014).

Las plantas procesadoras de cítricos simplemente aprovechan el 50 % de la materia prima para obtención de jugos y derivados (néctar, mermeladas, aceites esenciales), el resto sea corteza, semillas y pulpas se convierten en residuos (Mantzouridou, et al, 2013), los cuales representan una problemática para el medio ambiente si no se encuentran soluciones alternativas para evitar su acumulación. Por varios años se consideró como alternativa adecuada y extendida, el de procesamiento de estos residuos como alimento para ganado; pero debido a su rápida fermentación se convierten en un agente contaminante (Fundación Vida Sostenible, 2014).

Bolivia, un país con una economía dependiente de la agricultura, el gas natural y los minerales, inauguró dos plantas procesadoras de cítricos, ambas administradas por la empresa estatal LACTEOSBOL (Lácteos Bolivia), el producto de las mismas será destinado para el mercado interno del país (desayuno escolar, subsidio prenatal y lactancia, etc). La primera planta procesadora de cítricos localizada en el trópico de Cochabamba fue inaugurada en marzo de 2010, se contempla que ésta procesa aproximadamente 5 toneladas de cítricos por hora. Debido a la cantidad de residuos generados, la empresa encargada afirma que parte de estos residuos servirán como alimento balanceado para ganado vacuno y porcino (Vicepresidencia del Estado Plurinacional de Bolivia, 2014), pero

esta alternativa soluciona sólo parcialmente la problemática actual de acumulación de residuos cítricos. De igual manera, la planta procesadora de cítricos ubicada en el municipio de Caranavi del Departamento de La Paz inaugurada en octubre de 2014 procesará alrededor de 8 toneladas por turno, no contempla entre sus actividades otra alternativa del manejo de estos residuos sólidos.

ALTERNATIVAS DE UTILIZACIÓN DE LOS RESIDUOS CÍTRICOS

Actualmente en Bolivia no existen el manejo o utilización de residuos cítricos por parte de las empresas. Sin embargo, en otros países se desarrollan diversos proyectos de investigación para encontrar alternativas de uso de los mismos, reduciendo así su impacto medioambiental, a través de su conversión a productos de valor agregado. Hoy en día, varios son los usos alternativos que se dan a este tipo de residuo, entre ellos algunas involucran procesos biotecnológicos para obtener diferentes compuestos biológicos, tales como el bioetanol de segunda generación como biocombustible, pellets cítricos con destino a la alimentación animal por su alto valor nutricional, obtención de D-limoneno un aceite esencial con amplio uso en industria farmacéutica, alimentaria e insecticida, producción de agua purificada por procesos de evaporación y condensación (Fundación Vida Sostenible, 2014), fertilizantes orgánicos, biogás, etc (Sinc, 2008). Una alternativa biotecnológica innovadora desarrollada recientemente sugiere que estos residuos pueden ser utilizados como materia prima para la producción de ésteres volátiles con propiedades saborizantes, a través de la fermentación de azúcares (glucosa, fructosa) y polisacáridos insolubles (celulosa, hemicelulosa) (Rossi, et al, 2009). Los ésteres volátiles pueden ser utilizados como aditivos en alimentos pudiendo reemplazar el uso de aditivos artificiales, los cuales son comúnmente producidos por procesos químicos a base de petróleo que inclusive se ha reportado pueden causar problemas a la salud del consumidor (Vandamme, 2002).

En el Área de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas se viene desarrollando diversos proyectos de investigación que responden a problemáticas nacionales; en este sentido se desarrolla el Proyecto Biosabores con el objetivo de estudiar la factibilidad de utilizar residuos cítricos para producción de ésteres volátiles, a través de tecnología de fermentaciones con microorganismos, entre ellos bacterias y levaduras propias de nuestra región. La producción de biosabores a partir de residuos del procesamiento de cítricos, podría causar un impacto en el desarrollo productivo, económico, tecnológico y social de nuestro país; además, de constituir una alternativa de manejo de residuos cítricos.

CONVERSIÓN DE RESIDUOS CÍTRICOS A BIOSABORES

En general los cítricos se componen por agua, proteínas, lípidos carbohidratos, cenizas, minerales, vitaminas y otros compuestos como terpenos. Morfológicamente están constituidos por epicarpio que es la porción externa

de la cáscara llamada también flavedo; mesocarpio conocido también como albedo que es la capa blanca esponjosa del fruto y finalmente el endocarpio que es la parte comestible de estas frutas (Escobar, 2010). Los residuos cítricos están constituidos por el flavedo y albedo, partes restantes de la pulpa y semillas después del procesamiento de estos cítricos. El flavedo está constituido por compuestos carotenoides y aceites esenciales como el limoneno en mayor proporción respecto a otros. Por otra parte, el albedo en conjunto es rico en carbohidratos como la celulosa, hemicelulosa, y otros componentes como la lignina, sustancias pécticas y compuestos fenólicos (Escobar, 2010). Estos carbohidratos presentes en los residuos cítricos son sustratos potenciales para fermentación por distintos microorganismos, un ejemplo es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* ésta levadura puede utilizar azúcares fermentables y convertirlos a productos como los ésteres volátiles, los cuales tienen propiedades saborizantes (Mantzouridou, et al, 2015).

Existe un gran número de microorganismos capaces de producir ésteres volátiles utilizando sustratos (Park, et al, 2009) como bagazo de yuca, bagazo de caña, pulpa de manzana, salvado de soja, cascarilla de café, entre otros, debido a su composición de azúcares fermentables (Mantzouridou, et al, 2015). Microorganismos capaces de producir distintos ésteres volátiles por procesos metabólicos de síntesis de novo o biotransformaciones se detallan en la tabla 1. Los ésteres volátiles normalmente son producidos por biotransformación a través de fermentaciones en estado sumergido y sólido (Akacha, et al, 2015), logrando elevados rendimientos de producción de ésteres dependiendo de la maquinaria metabólica de los microorganismos utilizados (Park, et al, 2009; Mantzouridou, et al, 2015; Akacha, et al, 2015).

TABLA 1. Microorganismos productores de ésteres volátiles

Microorganismo	Ésteres	Bioproceso	Sustrato	Ref.
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Acetaldehído, 3-metil butanol, 3-metilbutil acetato, acetato de etilo, propionato de etilo, isobutirato de etilo, acetato de isoamilo, citranelol.	Fermentación en estado sólido	Bagazo de yuca, salvado de trigo, bagazo de caña de azúcar.	Mantzouridou, et al, 2015
<i>Rhizopus oryzae</i>	Acetaldehído, 3-metil butanol, 1-propanol, acetato de etilo, propionato de etilo, butirato de etilo.	Fermentación en estado sólido	Bagazo de yuca, harina de soja, pulpa de manzana.	Mantzouridou, et al, 2015

<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo, propionato de etilo, isobutirato de etilo, acetato de isoamilo.	Fermentación en estado sólido	Bagazo de yuca, salvado gigante de palma.	Mantzouridou, et al, 2015
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Acetato de etilo, acetato de isoamilo. 2-fenil etanol	Fermentación en estado sólido Síntesis de novo	Melaza, bagazo de cerveza, pulpa de naranja, bagazo de caña de azúcar	Mantzouridou, et al, 2015 Akacha, et al, 2015
<i>Geotricum sp.</i>	Isovalerato de etilo, hexanoato de etilo, butirato de etilo.	No especifica	No especifica	Park, et al, 2009
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Acetato de etilo.	No especifica	No especifica	Park, et al, 2009
<i>Neurospora sp.</i>	Hexanoato de etilo, caproato de etilo, 3-metil-1-butanolacetato de etilo.	Fermentación en estado sólido	Arroz pregelatinizado	Akacha, et al, 2015
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Acetato de butilo, butirato de butilo, acetato de etilo, butirato e etilo, acetato de isoamilo.	Biotransformación	ND	Park, et al, 2009
<i>Williopsis saturnus</i>	Acetato de etilo, acetato de isoamilo.	No especifica	ND	Park, et al, 2009
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	Citronelol, geraniol	Síntesis de novo	ND	Akacha, et al, 2015
<i>Fusarium solani</i>	Butirato de etilo, valerato de etilo	Biotransformación	ND	Akacha, et al, 2015
<i>Cándida cylindracea</i>	Butirato de butilo	Biotransformación	ND	Akacha, et al, 2015
<i>Cándida antarctica</i>	Acetato de isoamilo, acetato de 3-hexenil	Biotransformación	ND	Akacha, et al, 2015
<i>Cándida rugosa</i>	Valerato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de butilo, butirato de etilo	Biotransformación	ND	Akacha, et al, 2015
<i>Staphylococcus simulans</i>	Acetato de hexilo	Biotransformación	ND	Akacha, et al, 2015

ND: No definido

Adaptado de Mantzouridou, et al, 2015; Park, et al, 2009 y Akacha, et al, 2015.

En el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas se estudia una alternativa biotecnológica de biorremediación de residuos cítricos para la producción de biosabores estudiando el potencial metabólico de *Cándida maltosa*. Se ha reportado que esta levadura tiene la capacidad de formar biopelículas (Romero, 2014) con una alta eficacia ante factores estresantes (Eche-nique, 2013). La producción de biofilms por *Cándida maltosa* puede constituir una ventaja durante la conversión de sustratos recalcitrantes propios de los residuos cítricos.

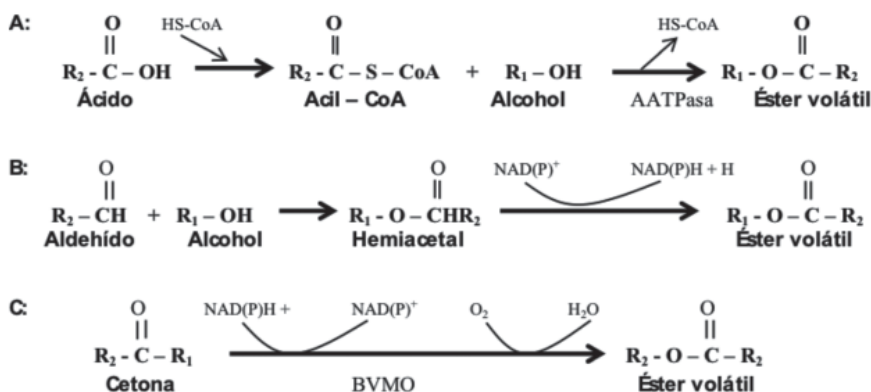
PRODUCCIÓN DE BIOSABORES

En general los sabores desempeñan un papel muy importante en la calidad y aceptación del consumidor teniendo una amplia aplicación en muchos sectores como la industria alimenticia, farmacéutica, etc. Un gran número de compuestos químicos están involucrados en el desarrollo de estos sabores como por ejemplo alcoholes, ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos, etc (Mantzouridou, et al, 2013). La mayoría son sintetizados por procesos químicos o por extracción de compuestos de origen vegetal o animal. Sin embargo, estos procesos tienen grandes desventajas, entre ellas, se obtienen mezclas racémicas reduciendo el rendimiento e incrementando las etapas del purificación para la obtención del producto final elevando así los costos de producción (Bicas, et al, 2010). Otra desventaja del uso de sabores artificiales repercute en la salud del consumidor y su aversión “fobia” hacia lo químico o sintético, referido a la alimentación y productos utilizados en casa (Vandamme, 2002). Debido a lo anteriormente mencionado, se impulsa el interés por compuestos saborizantes de origen biológico llamados sabores naturales o “biosabores” (Mantzouridou, et al, 2013; Bicas, et al, 2010) a través de bioprocesos basados en síntesis microbiana “de novo” o bioconversión/biotransformación de precursores naturales con el uso de células microbianas o sus enzimas (Vandamme, 2002). Los biosabores más comunes son los ésteres volátiles de acetato como el acetato de isoamilo (sabor a banana), acetato de isobutilo, acetato de etilo, acetato de propilo, isobutirato de etilo (sabor afrutado), y el acetato de feniletilo (sabor afrutado) (Mantzouridou, et al, 2013), y otros ésteres de acetato de ácidos grasos de cadena media como el hexanoato de etilo (sabor fresa), octanoato de etilo (sabor manzana agria, piña) y el decanoato de etilo (sabor uva) (Lalou, et al, 2013).

METABOLISMO MICROBIANO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOSABORES

En la actualidad se estudian un número limitado de microorganismos con capacidad de producir biosabores por diferentes mecanismos. La producción de ésteres con propiedades saborizantes ocurre utilizando sustratos como azúcares, alcoholes, etc. Las levaduras son un tipo de microorganismos con capacidad metabólica de convertir estos sustratos a ésteres volátiles, debido a que poseen 3 rutas metabólicas que direccionan a esta formación, las cuales se muestran en la figura 1 (Park, et al, 2009).

Figura 1. Mecanismos de producción de ésteres de carboxilato por tres rutas metabólicas, a. Alcohol Acetiltransferasa (AATasa), b. Alcohol deshidrogenasa (ADH), y c. Baeyer – Villiger Monooxigenasa (Park, et al, 2009).



En las rutas b y c que se muestran en la Fig. 1, se detalla para ambos casos la utilización de cofactores, NADPH₂/NADP⁺, necesarios para que se lleve a cabo la síntesis de ésteres, los cuales deberán ser regenerados por rutas metabólicas alternas pudiendo generar desequilibrio en el potencial reductor intracelular y conduciendo a un bloqueo metabólico en el que la célula permanece viable pero inactiva, esto conlleva a la dificultad del manejo de bioprocesos basados en la explotación de estas rutas metabólicas dando como consecuencia un rendimiento limitado de producción de ésteres (Park, et al, 2009). La ruta metabólica a, posee claramente una ventaja ante las demás rutas mencionadas debido a que en esta, se requiere la acción de enzimas como la Alcohol Acetiltransferasa (AATasa) que conlleva a la producción de ésteres a partir de ácidos grasos provenientes del glicerol como sustrato y alcoholes proveniente de la fermentación, para así por transferencia de grupos funcionales llevar a cabo la síntesis de ésteres aromáticos por procesos de fermentación (Amaretti, et al, 2012), además es necesaria la adición de ácido pantoténico como micronutriente para la generación de coenzima A, necesaria para la reacción de transferencia durante la formación de ésteres aromáticos.

APLICACIONES DE LOS BIOSABORES

Actualmente, se ha considerado que los aditivos alimentarios deben tener no sólo propiedades nutricionales en el producto final, sino que estos deben ser deseables considerando muchos aspectos como, si el producto es de origen natural, otorga funcionalidad a los alimentos, contribuye favorablemente a la promoción de la salud y bienestar de los consumidores (Bicas, et al, 2010) debido a consecuencias del consumo de saborizantes artificiales, que como se mencionó anteriormente repercuten en la salud del consumidor (Vandamme, 2002).

Además de ser un aditivo alimenticio como saborizante, se ha demostrado también que los biosabores tienen otras ventajas favorables. Por ejemplo,

tienen actividad biológica *in vitro* e *in vivo* contra ciertos tipos de tumor. Algunos de ellos también se pueden utilizar como agentes antioxidantes ya que estos inducen a la expresión de la enzima glutatión transferasa (Bicas, et al, 2011), asimismo útil como agentes antimicrobianos, repelentes de insectos, entre otros usos (Bicas, et al, 2010).

CONCLUSIONES

Los residuos cítricos generados por industrias procesadoras, constituyen un factor que causa impacto medioambiental desfavorable. De acuerdo al concepto de reducir, reutilizar y reciclar, otros países desarrollan distintas alternativas de uso de estos residuos, siendo las mismas amigables con el medio ambiente. En el IIFB se pretende utilizar estos residuos como materia prima en la producción de biosabores como aditivos alimentarios naturales. Estos procesos se pretenden realizar mediante tecnología de fermentaciones utilizando la levadura *Cándida maltosa*, que tiene capacidad de formar biopelículas, lo cual puede ser utilizado para evitar la inhibición por sustratos tóxicos propios de los residuos cítricos y conduciendo así a la producción de ésteres volátiles.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por abrirme las puertas para realizar este trabajo investigativo. A la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS) por el apoyo financiero para el inicio de este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akacha, N.B. & Gargouri, M. (2015). Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioprocess Processing*, 94, 675-706.
- Amaretti, A., Raimondi, S., Leonardi, A., Rossi, M. (2012). *Cándida freyschussii*: an Oleaginous Yeast Producing Lipids from Glycerol. *Chemical Engineering Transactions*, 27, 139-144.
- Bicas, J. L., Silva, J. C., Dionisio, A. P., Pastore, G. M. (2010). Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. *Ciencia e Tecnología de Alimentos*, 30 (1), 7-18.
- Bicas, J. L., Neri-Numa, I.A., Ruiz, A.L.T.G., De Carvalho, J.E., Pastore, G.M. (2011). Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1610-1615.
- Echenique, P.A. (2013). Screening y selección de microorganismos que posean fuerte capacidad de formación de un biofilm estable en condiciones optimizadas de cultivo. La Paz, Bolivia, 1-37.
- Escobar, M. (2010). Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. [Tesis magistral en ciencias de alimentos]. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México.
- Sinc. La ciencia es noticia (2008). La primera planta del mundo que aprovecha residuos cítricos utiliza tecnología valenciana. Disponible en <http://www.agenciasinc.es/Noticias/La-primer-planta-del-mundo-que-aprovecha-residuos-citricos-utiliza-tecnologia-valenciana>. Fecha de consulta: 5 de noviembre 2014.
- Come Naranjas (2011). Cítricos: Producción mundial de naranjas y mandarinas. Disponible en <http://www.comenaranjas.com/es/blog/282-citricos-produccion-mundial-de-naranjas-y-mandarinas.html>, 2011. Fecha de consulta: 5 de noviembre 2014.
- FAO (2014). Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas: Frutas tropicales. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s13.htm#TopOfPage>. Fecha de consulta: 4 de noviembre 2014.

- Vicepresidencia del Estado Plurinacional de Bolivia (2014). Gobierno suscribe contrato de \$us 9.1 millones para planta procesadora de cítricos en el trópico. Disponible en <http://www.vicepresidencia.gob.bo/Gobierno-suscribe-contrato-de-us-9>. Fecha de consulta: 6 de octubre 2014.
- Fundación Vida Sostenible (2014). Valorización de residuos cítricos. Disponible en https://www.vidasostenible.org/observatorio/f2_final.asp?idinforme=2256. Fecha de consulta: 4 de noviembre 2014.
- Lalou, S., Mantzouridou, F., Paraskevopoulou, A., Bugarski, B., Levic, S., Nedovic, V. (2013). Bioflavour production from orange peel hydrolysate using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 9397–9407.
- Mantzouridou, F., & Paraskevopoulou, A. (2013). Volatile Bio-ester Production from Orange Pulp-Containing Medium Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Bioprocess Technol*, 6, 3326–3334.
- Mantzouridou, F., Paraskevopoulou, A., Lalou, S. (2015). Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 1–8.
- Park, Y.C., Horton, C.E., Bennett, G. N. (2009). Microbial formation of esters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 13–25.
- Romero, D. X., (2014). Identificación molecular de la expresión de genes relacionados a la formación de biopelículas en condiciones de cultivo estresantes en las cepas *Propionibacterium* spp. y *Candida maltosa*. [Tesis Magister Scientiarum]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
- Rossi, S.C., Vandenberghe, L.P.S., Pereira, B.M.P., Gago, F.D., et al. (2009). Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Research International*, 42, 484–486.
- Vandamme, E. J. & Soetaert, W. (2002). Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77, 1323–1332.