

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química
Área de Ingeniería Química

REVALORIZACIÓN DE EXCEDENTES DE FRESA. BIOTRANSFORMACIÓN DE SU CONTENIDO EN GLUCOSA A ÁCIDO GLUCÓNICO MEDIANTE *GLUCONOBACTER JAPONICUS*

Tesis Doctoral presentada por:

Ana María Cañete Rodríguez

Córdoba, octubre de 2016

TITULO: *Revalorización de excedentes de fresa. Biotransformación de su contenido en glucosa a ácido glucónico mediante Gluconobacter Japonicus*

AUTOR: *Ana María Cañete Rodríguez*

© Edita: UCOPress. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química
Área de Ingeniería Química

REVALORIZACIÓN DE EXCEDENTES DE FRESA. BIOTRANSFORMACIÓN DE SU CONTENIDO EN GLUCOSA A ÁCIDO GLUCÓNICO MEDIANTE *GLUCONOBACTER JAPONICUS*

Memoria presentada por Doña Ana María Cañete Rodríguez, Licenciada en Químicas, para aspirar al Grado de Doctor en Química.

Córdoba, octubre de 2016

Fdo: Ana María Cañete Rodríguez

ÁLVARO CABALLERO AMORES, Director del Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña Ana María Cañete Rodríguez, Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Córdoba, titulada “**Revalorización de excedentes de fresa. Biotransformación de su contenido en glucosa a ácido glucónico mediante *Gluconobacter japonicus***” ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química, por lo que autorizo su presentación y posterior defensa pública.

Y para que conste y surta los efectos oportunos se firma el presente informe en Córdoba a 19 de septiembre de 2016.

Fdo.: Álvaro Caballero Amores

ISIDORO GARCÍA GARCÍA, Catedrático de Universidad del Área de Ingeniería Química e **INÉS M^a SANTOS DUEÑAS**, Profesora Contratada Doctora en el Área de Ingeniería Química, ambos en el Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba.

INFORMAN:

Que el trabajo presentado por Doña Ana María Cañete Rodríguez, titulado “**Revalorización de excedentes de fresa. Biotransformación de su contenido en glucosa a ácido glucónico mediante *Gluconobacter japonicus***” ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Área de Ingeniería Química, reuniendo todas las condiciones exigidas para su presentación y posterior defensa pública como Tesis Doctoral en la **modalidad de compendio de publicaciones**.

Y para que conste y surta los efectos oportunos se firma el presente informe en Córdoba a 19 de septiembre de 2016.

Fdo.: Isidoro García García

Fdo.: Inés M^a Santos Dueñas



TÍTULO DE LA TESIS: Revalorización de excedentes de fresa. Biotransformación de su contenido en glucosa a ácido glucónico mediante *Gluconobacter japonicus*.

DOCTORANDO/A: Ana María Cañete Rodríguez

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

En la presente Tesis se ha realizado un estudio de algunos aspectos fundamentales para el desarrollo de bioprocesos que permitan un aprovechamiento de excedentes de fresa. En concreto, y en el contexto del desarrollo de nuevos alimentos con propiedades beneficiosas para la salud, se ha estudiado la biotransformación de la glucosa contenida en la fresa en ácido glucónico, obteniendo, así, un producto complejo que podría ser utilizado como producto base para la elaboración de nuevas bebidas.

El trabajo se ha realizado gracias a la financiación recibida del MINECO a través de un proyecto coordinado, AGL2010-22152-CO3-03, que ha contado con la colaboración de otros dos proyectos, AGL2010-22152-CO3-01 y AGL2010-22152-CO3-02, concedidos a las universidades de Sevilla y Tarragona respectivamente.

La naturaleza multidisciplinar del trabajo, ha ofrecido una oportunidad muy enriquecedora para la formación de la doctoranda, que no sólo ha cumplido con las tareas que se le habían encomendado sino

que ha destacado, tanto en su capacidad científica como humana, para llevar a buen término el trabajo que se presenta.

La Tesis se ha desarrollado de acuerdo con la planificación prevista y ha permitido alcanzar múltiples resultados que, a efectos formales para su presentación en el formato de compendio de publicaciones, se concretan en cuatro publicaciones en revistas científicas internacionales, con alto índice de impacto:

1. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Ehrenreich, A., Liebl, W., García-García, I. (2016) Gluconic acid: Properties, production methods and applications - An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization, *Process Biochemistry*, doi: 10.1016/j.procbio.2016.08.028.
2. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., Jiménez-Hornero, J.E., García-García, I. (2015) Preparation of a pure inoculum of acetic acid bacteria for the selective conversion of glucose in strawberry purée into gluconic acid. *Food and Bioproducts Processing* 96, pp. 35-42.
3. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., García-García, I. (2016) An approach for estimating the maximum specific growth rate of some bacteria in complex media without cell concentration data. An example: *Gluconobacter japonicus* growing in strawberry purée. *Biochemical Engineering Journal* 105, pp. 314-320.
4. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., García-García, I. (2016) Revalorization of strawberry surpluses by bio-transforming its glucose content into gluconic acid. *Food and Bioproducts Processing* 99, pp. 188-196.

Además de los trabajos indicados, hay algunos más que están en fase de elaboración y/o publicación. Igualmente, la Tesis ha contribuido a otras publicaciones y/o comunicaciones a congresos internacionales:

1. Álvarez-Fernández, M.A., Cerezo, A.B., Cañete-Rodríguez, A.M., Troncoso, A., García-Parrilla, M.C. (2015) Composition of non-anthocyanin polyphenols in alcoholic-fermented strawberry products, using LC-MS (QTRAP), high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS), LC-DAD and antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, pp. 2041-2051.
2. Ordoñez, J.L., Cañete-Rodríguez, A.M., Callejón, R.M., Santos-Dueñas, I.M., Troncoso, A.M., García-García, M.C. (2016) Effect of gluconic acid submerged fermentation of strawberry purée on amino acids and biogenic amines profile. *Journal of Food Processing and Preservation*, doi:10.1111/jfpp.12787.
3. Póster: Submerged cultures of *Gluconobacter* genus in strawberry pulp for making a gluconic acid based product. An ingredient for new healthy beverages. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., García-Mauricio, J.C., Martínez-Pedrajas, C., García-García, I. *III International Conference on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products (AAB2012)*. Córdoba (España), Abril 2012.
4. Póster: Production of strawberry vinegar as a base product in the development of new healthy beverages. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Jiménez-Hornero, J.E., García-García, I. *III International Conference on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products (AAB2012)*. Córdoba (España), Abril 2012.

5. Póster: Ingeniería de procesos biológicos. Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Baena-Ruano, S., Álvarez-Cáliz, C., Cañete-Rodríguez, A.M., Jiménez-Hornero, J.E., García-García, I. *La investigación en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba*. Córdoba (España), Mayo 2012.
6. Comunicación oral: Aprovechamiento de fresa no apta para su comercialización. Cañete-Rodríguez, A.M. *II Congreso Científico de Investigadores en Formación Agroalimentaria CeIA3*. Córdoba (España), Abril 2013.
7. Comunicación oral: Fermentación glucónica en el contexto del aprovechamiento de excedentes de fresa para elaboración de una nueva bebida. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., García-Martínez, T., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., García-García, I. *VII Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CYTA2013*. Córdoba (España), Junio 2013.
8. Póster: Comparación de la capacidad fermentativa de tres especies de levaduras para la elaboración de vino de fresa. Cañete-Rodríguez, A.M., García-García, I., Santos-Dueñas, I.M., García-Martínez, T., Mauricio, J.C. *III Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación CeIA3*. Córdoba (España), Noviembre 2014.
9. Comunicación oral: Gluconic acid bioproduction by acetic acid bacteria, a difficult equilibrium to reach. García-García, I., Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E. *IV International Congress on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products (AAB2015)*. Taiyuan (P.R.China), Septiembre 2015.
10. Póster: Strawberry purée: selective bio-transformation of its glucose content into gluconic acid. Influence of the initial concentration of substrate on the stability of the products.

García-García, I., Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, Torija-Martínez, M.J., Mas, A. *IV International Congress on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products (AAB2015)*. Taiyuan (P.R.China), Septiembre 2015.

11. Comunicación oral: Aspectos clave en el desarrollo de procesos de fermentación para la producción de ácido glucónico a partir de puré de fresa. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., García-García, I. *VII Jornadas de divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología*, Córdoba (España), Junio 2016.

Pues bien, como directores de este trabajo, dejamos constancia de nuestra satisfacción con los resultados obtenidos y pensamos que se han alcanzado, sobradamente, los requisitos mínimos para el acto que se solicita. Siendo importante lo anterior, deseamos destacar la gran calidad humana de la doctoranda, para nosotros ha sido un honor dirigirla en esta labor.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 19 de septiembre de 2016

Firma del/de los director/es

Fdo.: Isidoro García García

Fdo.: Inés M^a Santos Dueñas



ÍNDICE

Resumen/Summary	1
Capítulo I. Introducción	15
1. Producción y uso de alimentos. Subproductos y residuos	17
1.1. El cultivo de la fresa. Ejemplo de generación de residuos agroindustriales en Andalucía.....	20
2. Ácido glucónico.....	24
2.1. Propiedades físicas y químicas	25
2.2. Aplicaciones actuales	28
2.3. Métodos de producción.....	35
2.3.1. Métodos químicos	35
2.3.2. Métodos microbiológicos.....	37
2.3.2.1. Hongos filamentosos.....	38
2.3.2.2. Bacterias.....	41
2.3.2.2.1. Bacterias acéticas.....	42
2.3.2.2.2. <i>Pseudomonas</i>	48
2.3.2.2.1. <i>Zymomonas</i>	50
2.4. Beneficios nutricionales	51
2.5. Ácido glucónico como aditivo alimentario. Empleo de recursos agroindustriales como materia prima para su producción.....	53
Bibliografía.....	62

Capítulo II. Hipótesis y objetivos.....81

1. Contextualización del plan de investigación desarrollado en la Tesis	83
2. Hipótesis y objetivos generales	83
3. Hipótesis y objetivo específico 1.....	85
4. Hipótesis y objetivo específico 2.....	87
5. Hipótesis y objetivo específico 3.....	88

Capítulo III. Investigación desarrollada91

1. Aportación 1 – Revisión Bibliográfica	93
1.1. Breve descripción del trabajo	93
Bibliografía	94
1.2. Copia de la aportación.....	95
2. Aportación 2 – Preparación del Inóculo.....	109
2.1. Breve descripción del trabajo	109
2.2. Copia de la aportación.....	115
3. Aportación 3 – Método indirecto para la estimación de parámetros cinéticos	123
3.1. Breve descripción del trabajo	123
3.2. Copia de la aportación.....	128
4. Aportación 4 – Efecto de la concentración de sustrato sobre la estabilidad del producto	135
4.1. Breve descripción del trabajo	135
4.2. Copia de la aportación.....	138

IV. Conclusiones generales147

Anexo I. Materiales y métodos generales157

1. Materia prima	159
2. Microorganismos.....	160
2.1. Mantenimiento del cultivo.....	161
2.2. Reactivación del cultivo	162
2.3. Preparación del inóculo.....	163
3. Sistema experimental	164
3.1. Reactor biológico	165
3.2. Sistema de aireación.....	166
3.3. Sistema de agitación.....	167
3.4. Sistema de termostatación e intercambio de calor	168
3.5. Dispositivos de adición, extracción y control.....	169
3.5.1. Dispositivos de adición y extracción del medio ...	170
3.5.2. Dispositivos de control.....	170
3.5.2.1. Sonda de pH	170
3.5.2.2. Sensor de temperatura	171
3.5.2.3. Sensor de oxígeno disuelto	171
3.6. Software.....	172
3.6.1. Interfaz de usuario.....	173
3.6.2. Menú principal “Main”	174
3.6.3. Menú tendencias “Trends”	175
3.6.4. Menú calibración “Calibration”	176
3.6.4.1. Calibración de la sonda de pH	177

3.6.4.2. Calibración de la sonda de pO ₂	179
3.6.5. Menú controlador “Controller”	180
3.6.6. Menú mantenimiento “Maintenance”	182
4. Métodos de análisis experimental	183
4.1. Preparación de la muestra.....	183
4.2. Determinación de la concentración de azúcares	184
4.2.1. Determinación de la concentración de glucosa....	184
4.2.2. Determinación de la concentración de glucosa y fructosa.....	186
4.2.3. Determinación de la concentración de ácido glucónico.....	189
4.3. Determinación de la acidez total	191
4.4. Determinación de la concentración de células totales	192
4.4.1. Determinación de la concentración de bacterias totales.....	193
4.4.2. Determinación de la concentración de levaduras totales.....	194
4.5. Preparación de muestras de fermentado para el aislamiento e identificación de microorganismos.....	196
Bibliografía	197

Anexo II. Informe con el factor de impacto y cuartil del JCR de las publicaciones científicas presentadas en la Tesis Doctoral.....	199
--	------------

Anexo III. Otras aportaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral	203
---	------------

Tabla I.1. Aditivos alimentarios derivados del ácido D-glucónico e incluidos en el Codex Alimentarius (versión revisada en 2014), de acuerdo a las especificaciones del Comité mixto FAO/WHO de expertos en aditivos alimentarios (Join FAO/WHO Expert Committe on Food Additives, JECFA) (Cañete-Rodríguez et al., 2016).....	29
Tabla I.2. Principales residuos agroindustriales empleados como sustrato para el desarrollo de procesos biotecnológicos de producción de ácido D-glucónico por <i>A. niger</i> (Cañete-Rodríguez et al., 2016).	56
Tabla AI.1. Variables operacionales establecidas y/o controladas en este trabajo de investigación.....	164
Tabla AI.2. Principales controladores del sistema micro-DCU empleados en la investigación. (*) Función de control utilizada en los experimentos realizados.....	181
Tabla AI.3. Procedimiento kit K-GLUC07/11 (Megazyme®)	185
Tabla AI.4. Procedimiento kit K-FRUGL12/12 (Megazyme®).....	187
Tabla AI.5. Procedimiento kit K-GATE12/12 (Megazyme®).....	190

Figura I.1. Principales regiones productoras de fresa a nivel mundial, según FAOSTAT (Faostat, 2016) 20

Figura I.2. Ácido D-glucónico y sus derivados (Cañete-Rodríguez et al., 2016). **a)** Equilibrio químico del ácido D-glucónico y sus lactonas en disolución acuosa. **b)** Oxidación química del ácido D-glucónico en presencia de un agente oxidante fuerte..... 26

Figura I.3. Metabolismo oxidativo de *Aspergillus niger* (Cañete-Rodríguez et al., 2016). Parcialmente excretada o mantenida asociada a la membrana citoplasmática, la enzima glucosa oxidasa es la principal responsable de la formación de D-gluconato, mientras las enzimas solubles del citosol juegan un papel fundamental en la asimilación de D-glucosa y D-gluconato mediante la vía de las pentosas fosfato. La hidrólisis de la D-glucono- δ -lactona ocurre mayoritariamente de forma espontánea, aunque también puede tener lugar bajo la acción de una gluconolactonasa. GOD, glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4); GNL, gluconolactonasa (EC 3.1.1.17); CAT, catalasa (EC 1.11.1.6); GK, hexoquinasa (EC 2.7.1.1)/glucoquinasa (EC 2.7.1.2); GNK, gluconoquinasa (EC 2.7.1.12); G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49); 6PGNL, 6-fosfogluconolactonasa (EC 3.1.1.31); 6PGNDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44); R5PI, ribosa-5-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.6)..... 39

Figura I.4. Metabolismo oxidativo de *Gluconobacter* (Cañete-Rodríguez et al., 2016) (versión adaptada según Rogers et al. (2006) y Matsushita et al. (1994)). Diferentes deshidrogenasas, tanto asociadas a la membrana como solubles en el citoplasma, son las principales responsables de la producción y asimilación de D-gluconato. La conversión de D-glucono- δ -lactona a D-gluconato puede tener lugar de forma espontánea o mediante la acción de una glucono- δ -lactonasa (no mostrado en la

figura). Las quinoproteínas D-glucosa y 5-ceto-D-gluconato deshidrogenasas, y las flavoproteínas D-gluconato y 2-ceto-D-gluconato deshidrogenasas están ubicadas en la membrana citoplasmática, con sus centros activos orientados hacia el periplasma. Los electrones originados en la oxidación del sustrato son transferidos a la coenzima Q₁₀ (Q₁₀). En *G. oxydans*, su forma reducida, ubiquinol (Q₁₀H₂), puede ser oxidada por las enzimas citocromo *bo*₃ quinol oxidasa (*Cyt bo*₃) o citocromo *bd* oxidasa (*Cyt bd*), de baja afinidad por el oxígeno, para generar un gradiente de protones (Richard et al., 2013). Las enzimas NADP-dependientes, D-glucosa deshidrogenasa y ceto-D-gluconato reductasa, están localizadas en el citoplasma. GDH, D-glucosa deshidrogenasa (en la membrana citoplasmática, EC 1.1.5.2; en el citoplasma, EC 1.1.1.47); GADH, D-gluconato 2-deshidrogenasa (EC 1.1.99.3); 2KGADH, 2-ceto-D-gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.4); GA5DH, D-gluconato 5-deshidrogenasa (en el citoplasma, EC 1.1.1.69); GK, glucoquinasa (EC 2.7.1.2); GNK, gluconoquinasa; G6PD, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49); 6PGDD, 6-fosfogluconato deshidratasa (EC 4.2.112); 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) 44

Figura AI.1. Materia prima empleada en los diferentes experimentos. **a)** Bidón de 200 kg de fresa procedente de Hudisa, Desarrollo Industrial S.A., **b)** Puré de fresa sin concentrar, **c)** Mosto de uva concentrado y rectificado procedente de Concentrados Pallejá S.L..... 160

Figura AI.2. Criotubos de *G. japonicus* CECT 8443 almacenados a -80 °C en el laboratorio 161

Figura AI.3. Dispositivos empleados en el mantenimiento y reactivación del cultivo de *G. japonicus* CECT 8443, y la preparación del inóculo. **a)** Autoclave RAYPA, modelo Stericlav-S 110L, empleada en la

esterilización de material y medios, **b)** Campana de flujo laminar TELSTAR, modelo AV-100, empleada en la siembra de cultivos, **c)** Agitador orbital LAN TECHNICS con control de temperatura, empleado para la incubación de cultivos en medio líquido, **d)** Estufa bacteriológica SELECTA, modelo Desec 50x40x40, empleado en la incubación de cultivos en medio sólido..... 162

Figura AI.4. Dispositivo experimental empleado en el laboratorio..... 165

Figura AI.5. Reactor de tanque agitado. **a)** Diseño y equipamiento: (1) Motor, (2) Condensador, (3) Carga/descarga de medio, (4) Dedo frío, (5) Toma de muestra, (6) Sonda de pH, (7) Entrada de aire, (8) Sonda de O₂, (9) Sonda de temperatura, (10) Tornillos de fijación, (11) Vaso del fermentador. **b)** Vista del montaje real..... 166

Figura AI.6. Elementos del sistema de aireación. **a)** Tubo anular borboteador, **b)** Filtro de membrana Millex-FG₅₀, **c)** Válvula para regular el caudal de entrada de aire ubicado en la unidad de control 167

Figura AI.7. Elementos del sistema de agitación. **a)** Fijación del motor de agitación a la tapa del fermentador, **b)** Eje de agitación e impulsor de disco de seis palas 168

Figura AI.8. Elementos del sistema de termostatación e intercambio de calor. **a)** Vista general del sistema, **b)** Dedo frío, **c)** Condensador de gases de escape, **d)** Baño termostático SELECTA, modelo FRIGITERM-10..... 169

Figura AI.9. Dispositivos de adición y extracción. **a)** Bombas peristálticas empleadas en la carga y descarga de medio fermentativo, **b)** Jeringa de émbolo conectada al sistema para la extracción de muestra 170

- Figura AI.10.** Dispositivos de control. **a)** Sonda de pH, **b)** Sensor de temperatura, **c)** Sonda de oxígeno disuelto..... 171
- Figura AI.11.** Vista del menú principal “Main” del software micro-DCU. **a)** Encabezado, **b)** Área de trabajo, **c)** Pie de página..... 174
- Figura AI.12.** Acceso directo al menú “Controller” de la agitación “STIRR”. Desde este menú se puede introducir el valor de consigna “Setpoint” y el modo de funcionamiento: manual “man”, sin control “off” o con control durante el proceso “auto” 175
- Figura AI.13.** Vista del menú tendencia “Trends” del software micro-DCU 176
- Figura AI.14.** Vista del menú calibración “Calibration” del software micro-DCU..... 177
- Figura AI.15.** Vista del menú calibración “Calibration” de la sonda de pH del software micro-DCU. Selección del modo de calibración 178
- Figura AI.16.** Vista del menú calibración “Calibration” de la sonda de pO₂ del software micro-DCU. Selección del modo de calibración del punto cero (“zero”) 179
- Figura AI.17.** Vista del menú controlador “Controller” del software micro-DCU. Selección del controlador que se desea configurar..... 180
- Figura AI.18.** Vista general del menú mantenimiento “Maintenance” del software micro-DCU 182
- Figura AI.19.** Instrumentos empleados en la determinación de concentraciones de azúcares y ácido glucónico. **a)** Baño termostático LAUDA, modelo RM 20, empleado en la incubación de muestras, **b)**

Espectrofotómetro UV-Visible BECKMAN, modelo DU 640, empleado en la determinación de la concentración de azúcares y ácido glucónico 186

Figura AI.20. Montaje empleado en para la determinación de la acidez total..... 192

Figura AI.21. Dispositivos empleados en la determinación de la concentración de células totales (bacterias y levaduras). **a)** Microscopio óptico OLYMPUS, modelo BX51/BX52, **b)** Cámara de Neubauer BLAUBRAND® de 0,02 mm de profundidad y una superficie de conteo de 0,0025 mm², **c)** Ampliación de una zona de conteo (izquierda) y del cuadrando grande central (derecha) de la cámara de Neubauer..... 193

Figura AI.22. Vista de levaduras presentes en el fermentado glucónico de fresa. **a)** Vista de uno de los cuadrados de la diagonal de recuento (Cuadrado grande central de la cámara de Neubauer), **b)** Vista de la gemación de levaduras (Mini-cuadrado de la cámara de Neubauer) 195

Figura AI.23. Siembra en placa de muestras de fermentado glucónico para su caracterización microbiológica por el Grupo de investigación de Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España) .. 196



RESUMEN

La generación de excedentes y residuos agroindustriales es un problema muy habitual, con un gran impacto medioambiental y económico, en países desarrollados. La problemática se agrava si nos referimos, por ejemplo, al caso de excedentes de productos perecederos. Entre los principales aspectos negativos que se podrían citar, cabe destacar la utilización no sostenible que se hace de recursos naturales, afectando de modo muy negativo a nuestra capacidad de garantizar las producciones futuras.

Dependiendo de la zona geográfica, se pueden encontrar múltiples ejemplos; en España, son especialmente importantes los excedentes de frutas y verduras, y una fruta que destaca en este contexto, por su carácter perecedero y niveles de producción, es la fresa.

La producción española se concentra en Andalucía, donde el cultivo de la fresa se ha consolidado como sector estratégico y motor de desarrollo económico en la zona de Huelva. No obstante, el deterioro acelerado de este producto, el carácter estacional de las cosechas y otros aspectos, entre los que se podría citar los estrictos estándares estéticos impuestos para su comercialización, dan lugar a un excedente que, aunque de buena calidad desde el punto de vista nutricional y sanitario, difícilmente encuentra salida en el mercado. En la actualidad, una parte importante de estos excedentes se destinan a plantas procesadoras, como HUDISA, Desarrollo Industrial S.A. (Lepe, Huelva), donde son transformados en purés, de diferentes concentraciones, que se usan en otras industrias alimentarias (producción de lácteos, repostería, bebidas, etc.). Los purés, una vez pasteurizados, se mantienen refrigerados; de este modo, además de prolongar la vida útil del producto, se conservan, en gran medida, las propiedades sensoriales y nutricionales de la fresa original.

Aunque los excedentes de fresa están siendo aprovechados en la forma comentada, su composición hace de estos concentrados, sustratos naturales con un alto potencial para el desarrollo de productos de mayor valor añadido, especialmente cuando se emplean etapas de biotransformación.

De entre las muchas posibilidades que podrían haber sido consideradas para aprovechar y revalorizar este tipo de recursos, la presente memoria de Tesis Doctoral se centra en el estudio de algunos aspectos fundamentales para el desarrollo de procesos fermentativos orientados a la producción de un fermentado glucónico, resultado de la oxidación selectiva, mediante *Gluconobacter japonicus* CECT 8443, de la glucosa a ácido glucónico. El producto final, con la acidez del ácido glucónico y el dulzor proveniente del contenido residual en fructosa, se podría emplear, como componente base, en la producción de una nueva generación de bebidas fermentadas no alcohólicas, aromáticas, refrescantes y endulzadas, de forma natural, por la fructosa que prevalece en el medio. Aunque este fermentado glucónico de fresa es un medio complejo, el principal compuesto que se pretende obtener en la biotransformación es el ácido glucónico, un aditivo de interés y creciente demanda en farmacología, industria textil, construcción, y especialmente, en alimentación, debido a los potenciales efectos beneficiosos que parece poseer para la salud humana.

Para valorar y justificar debidamente esta propuesta, la presente memoria ofrece, en primer lugar, una revisión de las principales propiedades, aplicaciones, métodos de producción del ácido y sus derivados, especialmente los biotecnológicos, así como un análisis crítico y actualizado de los últimos avances que han podido y/o podrían contribuir a la mejora de la producción de este compuesto: viabilidad en el uso de diferentes excedentes agroindustriales como materia prima, desarrollo de procesos biotecnológicos que consideren, tanto el uso de

células (hongos y bacterias) como de enzimas aisladas de los anteriores, y el interés que tendría el empleo de microorganismos genéticamente modificados en la optimización de los procesos existentes y en el desarrollo de otros nuevos.

Teniendo en cuenta que el trabajo se desarrolla en el contexto de la elaboración de un bioproducto que pueda ser empleado para el desarrollo de nuevos productos alimenticios, se ha elegido, por diversas razones que se detallan en la memoria, una bacteria acética, *G. japonicus* CECT 8443, para llevar a cabo la biotransformación deseada.

Sin embargo, diversos aspectos complican el problema. Por un lado, se ha de hacer referencia a la complejidad del metabolismo de este tipo de bacterias y a la dificultad que presentan para su cultivo en medios sólidos con el objetivo de su conservación, aislamiento y preparación de inóculos. Por otro lado, no sólo se ha de trabajar con un medio complejo, como es el puré de fresa, sino que, además, con la finalidad de conservar, en la medida de lo posible, las propiedades organolépticas y nutricionales de la fresa original, es conveniente trabajar con purés pasteurizados en lugar de esterilizados; sin embargo, esto implica la presencia de otros microorganismos (fundamentalmente, levaduras) que, tras un periodo necesario para su reactivación, pueden competir por los azúcares disponibles en el medio de cultivo.

Por todo ello, la preparación del inóculo de *G. japonicus* CECT 8443 se convierte en una etapa clave para garantizar la actividad e imposición de la cepa inoculada en el puré. De este modo, se ha estudiado el efecto de diferentes procedimientos de preparación del inóculo sobre el comportamiento de la fermentación. Los resultados obtenidos han mostrado cómo, en condiciones de crecimiento óptimas, sin necesidad de controlar el pH del medio, la cepa inoculada posee una capacidad altamente selectiva para convertir glucosa en ácido glucónico, conservando el contenido original en fructosa del puré. Sin embargo, y a

pesar de que los inóculos cultivados exclusivamente en medios sintéticos resultan ser eficientes para lograr la conversión deseada, es recomendable la incorporación de una etapa previa de pre-cultivo en puré de fresa estéril para garantizar su plena adaptación al medio a fermentar. De esta forma, se consigue acelerar la actividad de las bacterias, una vez se inoculan en el fermentador, y la producción de ácido glucónico, generando un entorno ácido y, en definitiva, hostil para el crecimiento de otros microorganismos indeseados.

Por otro lado, la estimación de algunos parámetros fundamentales para el diseño de los biorreactores necesarios, como son, por ejemplo, la velocidad específica máxima de crecimiento y el rendimiento de células en base a sustrato, se revelan como problemas difíciles de resolver si se tiene en cuenta las características del medio de cultivo, con alto contenido de sólidos en suspensión y las dificultades, ya mencionadas, para el cultivo en placa de estas bacterias. En efecto, estos aspectos dificultan la obtención de datos fiables de la evolución de la concentración celular a lo largo del ciclo fermentativo, datos que son necesarios para la estimación de dichos parámetros. Por lo tanto, en este trabajo, se ha propuesto un método alternativo que permite estimar la velocidad específica máxima de crecimiento del cultivo, e incluso, el rendimiento aparente de células en base a glucosa, a partir de sólo valores experimentales de concentración de glucosa. El método ha sido validado con datos experimentales obtenidos por otros investigadores para otros microorganismos con similares metabolismos.

Por último, la capacidad de la bacteria para seguir transformando el ácido glucónico formado, dependiendo de las condiciones ambientales, ha hecho necesario evaluar la influencia de la concentración de sustrato, variable clave, sobre la estabilidad del producto obtenido. En este sentido, la posibilidad de disponer de sustratos de fresa con distinto grado de concentración y/o la posibilidad de enriquecimiento en

azúcares empleando otros suplementos de origen natural, han facilitado el estudio de la influencia de la concentración inicial de glucosa sobre la estabilidad del ácido glucónico contenido en el producto final.

Los resultados obtenidos muestran que, desde un punto de vista práctico, para obtener fermentados con la máxima concentración posible de ácido glucónico y diferentes niveles de fructosa, es necesario controlar el tiempo de fermentación. Así, en purés de fresa sin azúcares añadidos, en los que la concentración de glucosa es baja, el proceso ha de detenerse tan pronto como ésta se haya consumido, de otro modo, la bacteria comenzaría a transformar en cetoácidos el ácido glucónico formado. Por otro lado, en purés de fresa con azúcares añadidos, en los que la concentración de glucosa fue de hasta cuatro veces mayor que en el caso anterior, el ácido glucónico formado se conservaba sin problema. Sin embargo, si además se desea conservar la fructosa residual, es necesario considerar la actividad de las levaduras presentes en el medio, que tras un periodo de 25-30 h de fermentación abandonan el estado de latencia en el que quedaron tras el tratamiento industrial de pasteurización.

Agro-industrial surpluses and wastes pose a widespread problem with considerable economic and environmental consequences in developed countries. The problem becomes worse for perishable items. Among the most negative aspects, the un-sustainable use of natural resources must be highlighted because is affecting to future food production.

Depending on the geographic areas, numerous examples could be cited. In Spain, surpluses from both fruits and vegetables are especially significant; in this context, strawberry stands out because of its perishable nature and high production levels.

The Spanish production is mainly located in Andalusia, particularly in Huelva, where strawberry is considered as one of the most important sector from a social and economic point of view. However, the short life of this product, the seasonality of the harvests and other aspects, such as the strict and aesthetic standards for its commercialization, result in hygienically and nutritionally acceptable surpluses for which there is no market. Currently, most of these surpluses are transformed into strawberry purées (for instance by Hudisa S.A., Lepe, Huelva) to be used in several food industries (dairy production, bakery, beverages, etc.). In order to extend the purée lifespan as well as to retain the sensorial and nutritional properties as much as possible, only pasteurization and refrigeration treatments are used.

Although the strawberry surpluses are already being utilized as commented, their composition makes them potentially excellent raw material for the biotechnological production of added values products.

Among different possibilities for the exploitation and revalorization of these kinds of resources, the present Doctoral Thesis is focused on the study of some fundamental aspects for the development of bioprocesses to produce a gluconic acid-based product, resulting from

the selective oxidation, by *Gluconobacter japonicus* CECT 8443, of glucose into gluconic acid. The final product (with the acidity of the gluconic acid and the sweetness of the fructose), could be used as a base-product for a new generation of fermentative, non-alcoholic, aromatic, refreshing beverages with a natural sweetness produced by the residual fructose content. Although this gluconic ferment from strawberry is a complex media, the gluconic acid is the main component which we tried to obtain in the bio-transformation. Gluconic acid is an additive of interest with a high an increasing demand in pharmaceutical, textile, building and, especially, food industries, due to its health benefits for humans.

To value and justify this proposal, this work offers a review of the main properties, uses and production methods of gluconic acid and its derivatives, especially biotechnological methods. The review reflects deeply on what are the potentially most useful aspects of this topic with the hope of improving the exploitation of gluconic acid through the use of different types of surpluses and production wastes as raw materials, the development of new biotechnological production processes involving cellular microorganisms (fungi or bacteria) or their enzymes and the interest that would have the use of genetically modified organisms in the optimization of existing processes and the development of new ones.

Considering that this work has been developed in the framework of obtaining a bio-product which should be suitable in the production of new beverages, an acetic acid bacteria (*G. japonicus* CECT 8443) has been chosen in order to carry out the desired bio-transformation.

However, several aspects must be taken into account. On one side, both the complex metabolism of this kind of bacteria and the difficulty of culturing many of them in solid media for their conservation, isolation and inoculum preparation, should be considered; on the other side,

preserving the organoleptic and nutritional properties of the raw material requires using pasteurized rather than sterilized strawberry purée, which implies the inevitable presence of unwanted microorganism (yeasts, mainly) which, after a relatively long lag phase of growth, could ferment the remained sugar in the medium.

Therefore, the preparation of the inoculum of *G. japonicus* CECT 8443 is a key stage to guarantee the activity and prevalence of the inoculated strain over unwanted microorganism. Then, different preparation stages were evaluated by batch experiments. The obtained results suggest that, under optimal growth conditions (without pH control), the strain used is effective in selectively converting glucose in strawberry purée into gluconic acid while preserving the fructose content of the substrate. Although an inoculum just prepared in synthetic liquid medium could be equally useful, it is advisable to incorporate a pre-cultivation stage in sterilized strawberry purée to encourage bacterial adaptation to the fermentation media. Thus, the adapted microorganisms provide better results in kinetic terms and apparent yields than using an inoculum cultured in only synthetic medium, resulting in a faster drop of the pH of the medium, turning it into a more adverse environment for the growth of other undesirable microbial populations.

Additionally, the further study and design of the process require information about its kinetics aspects, being the maximum specific growth rate and some of the apparent yields particularly interesting parameters in this regard. Nevertheless, for non-readily culturable bacteria as well as bioprocesses in which natural media, containing solids in suspension, are used as substrate, the resulting complex bioprocess matrix complicates very much obtaining this information because of the difficulties in measuring cell concentrations. Therefore, an easy method for estimating the maximum specific growth rate of *G. japonicus* in strawberry purée without using cell concentration measurements has

been developed. The method just uses the common strategy of combining the cell and substrate balances; a direct substrate uptake and bacterial growth association is required. Then, just using the glucose concentrations data during the exponential phase allow us to obtain an estimation of μ_{max} . Also, a rough estimation of the apparent yield of cell on glucose is also possible. The method has been validated using experimental data obtained in previous works which used similar microorganisms, growing in synthetic media.

Finally, the ability of *G. japonicus* to convert the resulting gluconic acid into keto-gluconates, and its dependence on the environmental conditions, let us to examine the effect of substrate concentration on the preservation of the formed gluconic acid in the fermented end-product. In this respect, the availability of strawberry purée with different concentration grades as well as the possibility of enriching its sugar content by adding other natural fruit concentrates, make easier to study the influence of the initial glucose concentration on the stability of the final product.

The obtained results show that, from a practical point of view, to obtain a gluconic acid-based fermentation product, with different fructose content, useful to formulate other products will require optimizing the fermentation time and depends on the initial concentration of glucose. Using strawberry purée (SP), with a low glucose concentration, the process should be stopped as soon as the glucose has been depleted; otherwise, the bacteria start to further oxidize the recently produced gluconic acid. On the other side, using enriched strawberry purée (ESP), with approximately a four times higher glucose concentration, the process can be allowed to develop longer since the resulting gluconic acid will remain unaltered. However, if the end-product must retain the sweetness of fructose in the initial substrate, then one should bear in mind that this sugar starts to be consumed after

about 20–30 h – mainly by yeasts which have survived to industrial pasteurization.



Capítulo I
INTRODUCCIÓN

1. Producción y uso de alimentos. Subproductos y residuos

La sociedad del siglo XXI dispone de conocimientos y tecnología que han permitido mejoras notables en la producción y uso de alimentos y que mira constantemente hacia la seguridad alimentaria como uno de los principales objetivos a conseguir. Sin embargo, todavía no se ha conseguido una optimización de los procesos que implique un uso racional de los recursos y productos obtenidos; de esta forma, se genera un gran volumen de sub-productos y residuos que suponen, entre otros problemas, importantes pérdidas económicas. Esta realidad, no sólo conduce a la reducción de la disponibilidad local y mundial de alimentos y la subida de los precios, sino también a la utilización insostenible de los recursos naturales de los que dependerán producciones futuras.

La gravedad del problema y la falta de estimaciones precisas justifican sobradamente la necesidad de investigaciones rigurosas sobre las pérdidas de alimentos a lo largo de la cadena alimentaria. Sin embargo, antes es necesario llegar a un consenso entre dos enfoques diferentes para la cuantificación de estas pérdidas. Por un lado, existe un enfoque globalizador que tiene en cuenta los residuos provenientes tanto de partes comestibles como no comestibles; mientras que otro enfoque, más restrictivo, considera únicamente los restos de partes comestibles que, por diversas razones, terminan perdiéndose o descartándose a lo largo de la cadena de suministro y uso. Los dos enfoques no sólo plantean un debate terminológico en torno a conceptos básicos como *pérdida* o *desperdicio*, a los que tradicionalmente se les han atribuido significados confusos y alcances variables, sino que también han promovido el desarrollo de diversos sistemas de cuantificación, que dificultan seriamente la comparación de los estudios locales realizados y la evaluación del fenómeno en los distintos países (HPLE, 2014).

A pesar de no existir un consenso definitivo en el marco actual de las instituciones internacionales y europeas, el informe *Global food losses and food waste. Extent, causes and prevention* (Gustavsson et al., 2011) de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), parece haberse convertido en un referente mundial en materia de evaluación y gestión de pérdidas en la producción y uso de alimentos. Hasta la fecha, este estudio es la principal fuente de datos al respecto en todos los niveles de la cadena, desde la producción hasta el consumo, evaluando su trascendencia, identificando sus principales causas, así como las posibles maneras de prevenirlas. Los resultados obtenidos sugieren que, a nivel mundial, alrededor de una tercera parte de la masa de los alimentos producidos para el consumo humano (aproximadamente 1.300 millones de toneladas anuales) se pierde o desperdicia a lo largo de la cadena alimentaria (Gustavsson et al., 2011), generando un impacto ambiental y económico significativos en las zonas de producción. Sin embargo, las causas que motivan esto parecen variar significativamente según el nivel de desarrollo de la región productora. Mientras los países subdesarrollados, sin dotación de medios e instalaciones adecuadas para la producción, registran mayores pérdidas en las etapas de cosechado, almacenado y procesado, los industrializados, con una producción que, por lo general, excede a la demanda, acumulan pérdidas mayores en la etapa de consumo. En términos nutricionales, esto supone el desaprovechamiento de una aporte calórico diario de entre 400 y 500 kcal por persona en las poblaciones más desfavorecidas, y hasta 1300 kcal por persona, en las más desarrolladas (Kummu et al., 2012). Unas cifras que, aunque aproximadas, dibujan un mapa mundial lleno de contrastes, en el que, por un lado, la erradicación del hambre, y, por otro, la regularización del exceso de producción, suponen un paso fundamental hacia la reducción de las actuales desigualdades sociales y económicas, y hacia un uso más sostenible de los recursos disponibles.

Por otro lado, no cabe duda de que la producción de alimentos debe aumentar considerablemente para satisfacer, en un futuro, la demanda de una población mundial cada vez mayor y con más poder adquisitivo. Habrá un crecimiento demográfico que la FAO prevé superior al 30 % (2.300 millones de habitantes adicionales) entre 2009 y 2050, y que afectará, en su mayoría, a países actualmente en vías de desarrollo (HPLE, 2009). Estas proyecciones muestran que, para alimentar a una población mundial de 9.100 millones de personas en 2050, sería necesario aumentar la producción de alimentos en un 70 % hasta el 2050, lo que supondría casi duplicar la producción en los países en desarrollo (HPLE, 2009). Además de incrementar la producción de productos básicos, esto implica el desarrollo de soluciones económicamente viables que permitan el aprovechamiento de los recursos disponibles. Esta labor requerirá de una estrecha colaboración entre gobiernos, productores, distribuidores, minoristas y consumidores, así como del desarrollo de propuestas imaginativas.

Sólo en Europa, se estiman unas pérdidas anuales de, aproximadamente, 89 millones de toneladas de comida en buen estado, de los cuales, casi un 10 % se producen en España (European Commission-Intelligence Service, 2010). La importancia de estos datos, con todo lo que implican (oportunidad desaprovechada de alimentación, uso innecesario de recursos, generación de residuos, etc.), lejos de ser ignorados, obligan a la búsqueda de las soluciones necesarias para su reducción y/o aprovechamiento (Galanakis, 2012).

En definitiva, es necesaria una urgente optimización de toda la cadena alimentaria para aprovechar mejor los recursos y productos existentes y minimizar los residuos. En este contexto, la innovación científica y tecnológica para la transformación de subproductos y residuos en nuevos productos con mayor valor añadido, ha de jugar un papel fundamental.

1.1. El cultivo de la fresa. Ejemplo de generación de residuos agroindustriales en Andalucía

Como era de esperar, la cuestión de las pérdidas no afecta a todos los alimentos por igual, siendo los productos fácilmente degradables los más perjudicados. Éste es el caso de la mayoría de las frutas y verduras. El deterioro acelerado de estos productos en los climas cálidos y húmedos en los que normalmente se cultivan, unido al carácter estacional de las cosechas, conlleva un excedente que, aunque de calidad desde el punto de vista nutricional y sanitario, difícilmente encuentra salida en el mercado para un consumo directo. A todo esto, se suman, además, los estrictos requerimientos de calidad que impone la normativa que regula su comercialización, que no hacen sino agravar la situación, dando lugar a un aumento de residuos en base a meros estándares estéticos (calibre, color, peso, defectos, maduración, etc.).

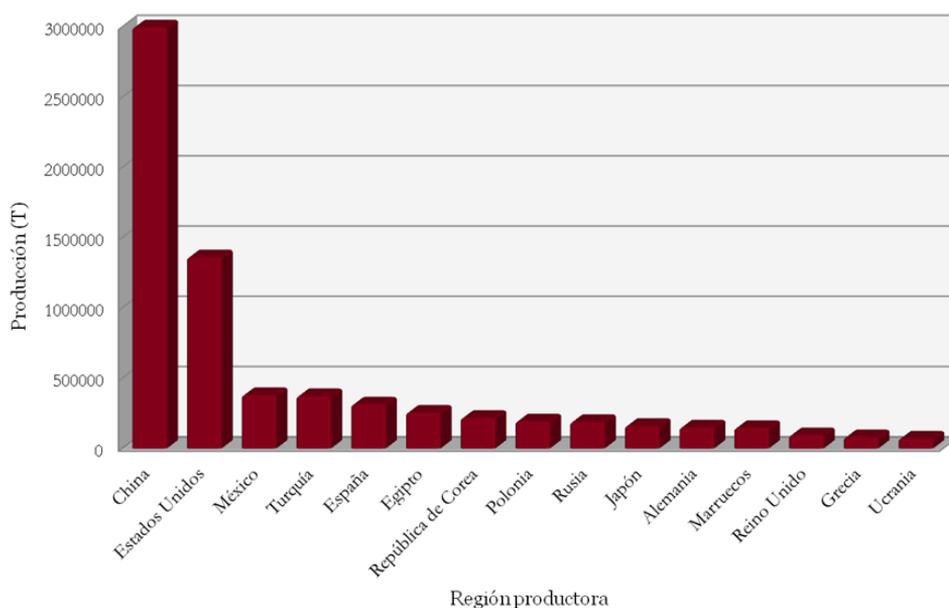


Figura I.1. Principales regiones productoras de fresa a nivel mundial, según FAOSTAT (Faostat, 2016).

Una fruta que, por su carácter perecedero y niveles de producción, se podría encuadrar en el contexto de la problemática que se acaba de comentar, es la fresa. Según los últimos datos disponibles de la FAO (Figura I.1), correspondientes a 2013, España continua siendo una de las principales potencias productoras de fresa a nivel mundial (4,06 %), sólo superada por China (38,97 %), Estados Unidos (17,69 %), México (4,93 %) y Turquía (4,84 %) (Faostat, 2016). La producción española se concentra en Andalucía, donde este cultivo se ha consolidado como sector estratégico y motor de desarrollo de la economía onubense; en 2008, Huelva ya concentraba el 94 % de la producción nacional, convirtiéndose en la principal región productora europea (Márquez-Domínguez, 2008).

Esta fresa se destina, en primer lugar, al abastecimiento local y nacional, y en segundo lugar, a la exportación, siendo Alemania, Francia, Reino Unido y Canadá sus principales importadores (Márquez-Domínguez, 2008). No obstante, y a pesar de que el volumen de fresa exportada ha seguido una tendencia creciente en los últimos años, no logra ser suficiente para evitar una sobreproducción, cada vez mayor, dadas las bondades climáticas de la zona, la mejora de la capacidad productiva, y otros aspectos, como la variabilidad y los riesgos inherentes de este tipo de cultivos. Todo ello conduce a la recolección selectiva de las cosechas, para reducir los gastos posteriores de destríos, dejando en el campo aquel producto que, bajo la percepción del agricultor, no vaya a pasar los estándares mínimos de calidad en cuanto a forma, tamaño, color y maduración (OECD, 2005), o que incluso reuniéndolos, no logren rentabilizar los costes asociados a su producción y transporte. De esta forma, se genera un excedente altamente perecedero, que obliga a la búsqueda de soluciones adecuadas que puedan ser llevadas a cabo de forma casi inmediata, antes de que se produzca el deterioro de la fruta.

El consumo de fresa, ya sea fresca o procesada, representa una excelente opción alimentaria dentro de una dieta equilibrada. Diversos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la asociación que existe entre la adquisición de hábitos alimentarios ricos en este tipo de frutas y el menor riesgo de sufrir enfermedades crónicas (cáncer) y cardiovasculares (infarto de miocardio e ictus), así como el mejor control de enfermedades interrelacionadas como la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico (Giampieri et al., 2012; Tomás-Barberán, 2008). Unos beneficios potenciales para la salud del consumidor que se derivan de su alto contenido en compuestos bioactivos, fibra dietética y sustancias fitoquímicas (Afrin et al., 2016; Giampieri et al., 2014). En efecto, la fresa es una de las mayores fuentes naturales de vitamina C (ácido ascórbico y dehidroascórbico, en menor proporción), agente antioxidante y reductor poderoso (Giampieri et al., 2014), y folato (forma aniónica del ácido fólico), que interviene en el metabolismo de los aminoácidos; ambos, micronutrientes esenciales que, junto a otros minoritarios, suponen entre 20 y 25 $\mu\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ de fresa fresca, dependiendo de las condiciones de pre- y post-cosecha adoptadas (Giampieri et al., 2012). Igualmente relevante resulta el aporte de fibra dietética de alta calidad, que, además de favorecer la regulación de la ingesta calórica gracias a su efecto saciante, contribuye, junto a la fructosa contenida en la fresa, a la regulación de los niveles de azúcares en sangre (Giampieri et al., 2012). Su contenido en sustancias fitoquímicas se encuadra mayoritariamente dentro del grupo de los polifenoles, incluyendo tanto derivados flavonoides (pigmentos antocianicos, flavonoles y proantocianidinas) como no flavonoides (derivados de ácidos hidroxicinámicos, pero sobre todo, derivados del ácido elágico y de elagitaninos), con una excelente actividad captadora de radicales libres. En menor grado, la fresa es rica en ácidos grasos esenciales, básicamente ácidos grasos insaturados (de estos,

aproximadamente, el 72 % son ácidos poliinsaturados) que se concentran mayoritariamente en los aquenios (Giampieri et al., 2012).

Por todos estos motivos, una parte importante de los excedentes de fresa generados en Huelva se destinan a plantas procesadoras, donde son transformados en productos semielaborados no perecederos que encuentran salida en otras industrias alimentarias (producción de lácteos, repostería, bebidas, etc.). Fundamentalmente, se trata de purés, con distinto grado de concentración, estabilizados mediante tratamientos térmicos suaves, y conservados en condiciones asépticas, que, además de prolongar la vida útil del producto, permiten preservar las propiedades sensoriales y antioxidantes de la fresa original. Todo ello, unido a la presencia de azúcares en su composición, convierten a estos concentrados en sustratos naturales con un alto potencial para la bioelaboración de ingredientes y productos con un mayor valor añadido. Ésta, sería una forma de aprovechamiento alternativo que, no sólo contribuiría a la mejora de la economía regional, sino también a la gestión sostenible de una gran parte de los recursos naturales disponibles (Galanakis & Schieber, 2014; Naziri et al., 2014; Pérez-Jiménez & Viuda-Martos, 2015).

2. Ácido glucónico

De entre las muchas posibilidades que podrían haber sido consideradas para aprovechar y revalorizar estos concentrados industriales de fresa, la presente memoria de Tesis Doctoral se centra en el estudio de algunos aspectos fundamentales para el desarrollo de procesos fermentativos que transformen el puré de fresa en un fermentado glucónico. En concreto, se pretende la biotransformación de la glucosa del puré de fresa en ácido D-glucónico (AG), al tiempo que se intenta conservar el contenido en fructosa de la materia prima. El producto obtenido podría tener diversas aplicaciones, entre las que cabría destacar su uso potencial como ingrediente saludable y aromático en la producción de nuevos alimentos, ya que además de aportar la acidez propia del AG y mantener muchas de las propiedades sensoriales y nutricionales de la fruta, conservaría el dulzor proveniente de su contenido en fructosa.

Aunque el fermentado final es un medio complejo, el principal producto de la biotransformación es el AG, un compuesto de gran interés y creciente demanda en la actualidad, gracias a los múltiples usos que posee en farmacología, industria textil y de la construcción, pero sobretudo, en alimentación, debido a los potenciales efectos beneficiosos que se le atribuyen para la salud. Obtenido, principalmente, mediante procesos biológicos, que implican la oxidación parcial de glucosa, este ácido puede ser un ejemplo bastante representativo de cómo diversos residuos y excedentes de producción podrían llegar a ser mejor aprovechados.

Para poder justificar y valorar debidamente esta propuesta es recomendable una rápida revisión de las propiedades del ácido y sus derivados, sus principales aplicaciones y métodos de producción, especialmente los biotecnológicos, así como el análisis crítico y

actualizado de aquellos avances más significativos en el desarrollo de procesos que hayan empleado otros recursos naturales como sustratos fermentables para su obtención.

2.1. Propiedades físicas y químicas

El AG, con fórmula molecular $C_6H_{12}O_7$, pertenece a la familia de los azúcares ácidos, comúnmente denominados ácidos aldónicos. Desde el punto de vista químico, es uno de los dieciséis estereoisómeros del ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxihexanóico, que resulta de la oxidación específica de β -D-glucosa, en la que el grupo aldehído del C-1 es transformado a un grupo carboxilo. Esta transformación se puede conseguir mediante una simple reacción de oxidación química, electroquímica o catalítica, o bien mediante una biotransformación por parte de microorganismos (hongos o bacterias) o enzimas específicas aisladas de los anteriores.

Debido a su estructura, a la vez ácido y alcohol, es susceptible de sufrir fenómenos de esterificación 1,5-intramolecular. Este proceso, que se favorece en medio ácido, consiste en la pérdida espontánea de una molécula de agua para generar un anhídrido intramolecular (Morrison & Boyd, 1998): D-glucono- δ -lactona, un éster cíclico. En disolución acuosa, se establece un equilibrio entre el ácido y sus lactonas (Figura I.2a), en el que, debido a su carácter de ácido débil ($K_a=1.99 \cdot 10^{-4}$, a 25 °C), éste supone entre un 55-66 % del total. La formación de la γ -lactona es un proceso unas cien veces más lento que la formación de δ -lactona a partir del ácido, lo que hace que el equilibrio global se vaya alcanzando lentamente. Por otro lado, el tratamiento del éster con una base, abre rápidamente el anillo aldónico para dar una sal de cadena abierta (Morrison & Boyd, 1998), denominada D-gluconato (Figura

I.2b). Su asociación a cationes metálicos di- y trivalentes da lugar a compuestos químicos muy estables, sólo capaces de reaccionar con agentes oxidantes fuertes (por ejemplo, ácido nítrico o peróxido de hidrógeno). En condiciones normales, esta oxidación da lugar a una mezcla, en proporciones variables, de cetoácidos (Hustede et al., 1989): 2-ceto-D-gluconato, 5-ceto-D-gluconato y, en casos extremos, 2,5-diceto-D-gluconato.

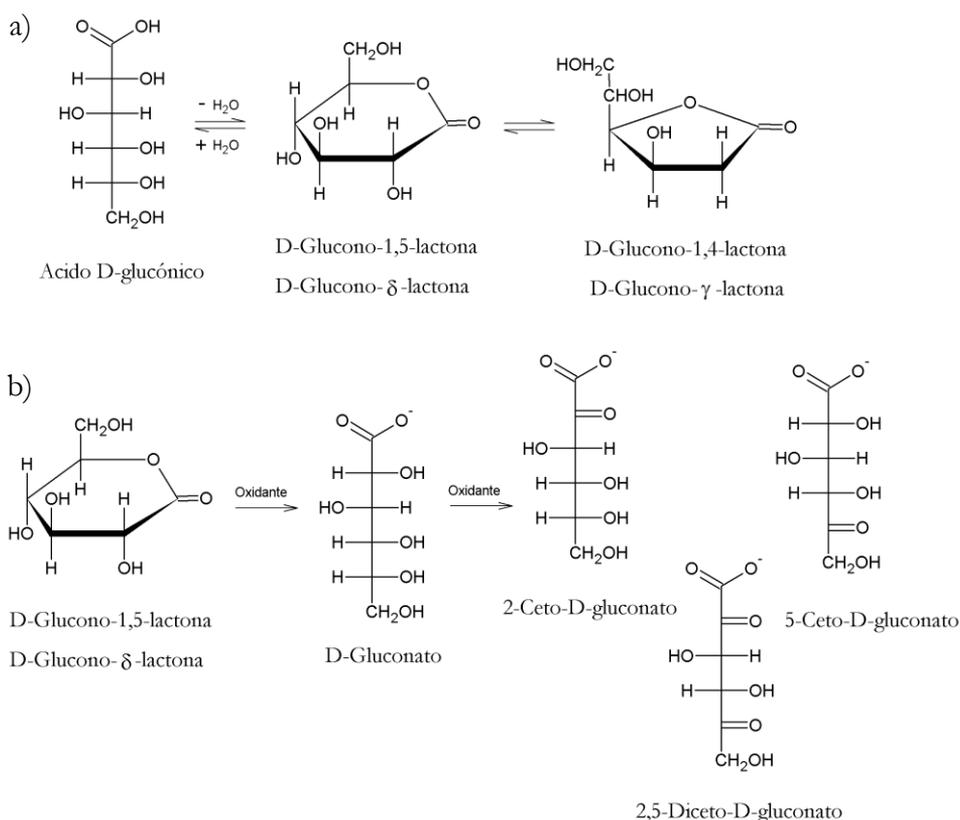


Figura I.2. Ácido D-glucónico y sus derivados (Cañete-Rodríguez et al., 2016). **a)** Equilibrio químico del ácido D-glucónico y sus lactonas en disolución acuosa. **b)** Oxidación química del ácido D-glucónico en presencia de un agente oxidante fuerte.

El AG es un ácido débil, no volátil, inocuo (inodoro, no corrosivo, no tóxico) y fácilmente biodegradable, soluble en agua e insoluble en disolventes apolares (Ramachandran et al., 2006). Su preparación en forma cristalina encuentra ciertas dificultades, a pesar de que el ácido anhidro cristaliza en forma de polvo blanco por debajo de 30 °C, su forma monohidratada lo hace entre 0-3 °C (Milsom & Meers, 1985) debido, fundamentalmente, al “curvamiento” que sufre la cadena hidrocarbonada durante la cristalización, para dar lugar a una conformación específica en la que los átomos C-2,3,4,5,6 y O-2,6 quedan en el mismo plano en ausencia de puentes de H intramoleculares (Lis, 1983). Su almacenamiento con sustancias desecantes a temperatura ambiente o el calentamiento a temperaturas superiores a 50 °C, pueden inducir la formación de lactonas. Su punto de fusión se estima en torno a 120-131 °C, en función de los anhídridos intramoleculares formados (Hustedde et al., 1989). Las lactonas del AG pueden existir en estado sólido y en disolución, siendo poco solubles en disolventes orgánicos. Mientras la δ -lactona cristaliza en forma de cristales blancos, la γ -lactona lo hace en forma de finas agujas.

De forma natural, este ácido y sus derivados se encuentran en plantas, frutas y otros alimentos como el arroz, miel, uva, manzana, carne, vino y vinagre (Ramachandran et al., 2006), y, al igual que muchos otros ácidos orgánicos, participan en el metabolismo de diversos organismos vivos.

En los últimos cincuenta años, este compuesto, y sus derivados, han despertado un alto interés por las múltiples aplicaciones que han encontrado en la industria alimentaria, farmacológica, textil y de la construcción. Según los últimos datos disponibles, el mercado del AG produce en torno a 100.000 toneladas anuales, casi exclusivamente mediante procesos biotecnológicos (Climent et al., 2011), con unos costes de producción que oscilan entre los 1,20 US\$·kg⁻¹ para el AG y

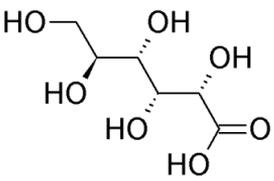
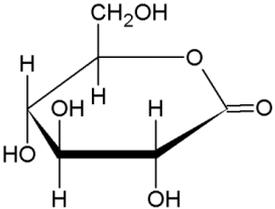
los 8,50 US\$·kg⁻¹ para el D-gluconato de calcio y la D-glucono- δ -lactona (Singh & Kumar, 2007). De todos sus derivados, el D-gluconato de sodio es el producto mayoritariamente comercializado, suponiendo más del 80 % de la producción mundial (Roehr et al, 2001). Por su parte, el AG se comercializa en disolución acuosa al 50 %, con un pH de 1,82 y una densidad de 1,23 g·cm⁻³.

2.2. Aplicaciones actuales

Los ácidos orgánicos constituyen un conjunto muy heterogéneo de compuestos que, dependiendo de su estructura, pueden encontrar múltiples aplicaciones. En el caso del AG y sus derivados, a excepción de su γ -lactona, se emplean, fundamentalmente, como aditivos en diferentes procesos industriales de producción de alimentos, fármacos y otros productos de higiene y construcción. Así por ejemplo, se añaden a productos lácteos y refrescos para potenciar y/o conservar sus propiedades sensoriales.

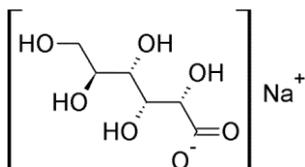
Desde 1986, la Food and Drug Administration concede el estatus *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) a dos derivados de este ácido, glucono- δ -lactona y gluconato de sodio, permitiendo su uso ilimitado como ingrediente en la elaboración de alimentos (Food chemicals codex, 2010). De forma paralela, el *General Standard for Food Additives* (*GSFA*), establecida por la FAO y la World Health Organization (WHO), regula el empleo de D-glucono- δ -lactona y D-gluconatos como aditivos alimentarios, conforme a las condiciones de buenas prácticas de fabricación.

Tabla I.1. Aditivos alimentarios derivados del ácido D-glucónico e incluidos en el Codex Alimentarius (versión revisada en 2014), de acuerdo a las especificaciones del Comité mixto FAO/WHO de expertos en aditivos alimentarios (Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) (Cañete-Rodríguez et al., 2016).

<p>Acido D-glucónico</p> 	<p>Código INS: E-574</p> <p>Descripción: Polvo cristalino de color blanco (ácido D-glucónico anhidro)/ Líquido que va de incoloro a amarillo claro (ácido D-glucónico comercial).</p> <p>Función tecnológica: Regulador de acidez Gasificante Agente secuestrante</p> <p>Alimentos: Frutas y verduras (origen natural), y productos lácteos.</p>
<p>D-Glucono-δ-lactona</p> 	<p>Código INS: E-575 (Revisado en 51 JECFA, 1998)</p> <p>Descripción: Polvo cristalino blanco e inodoro</p> <p>Función tecnológica: Regulador de acidez Gasificante</p> <p>Alimentos: Leches fermentadas (origen natural), pasta y fideos frescos y análogos, suero de leche, y alimentos complementarios para lactantes y niños.</p>

Código INS: **E-576** (Revisado en 51 JECFA, 1998)

D-Gluconato de sodio



Descripción: Gránulo/polvo cristalino de color blanco a tostado

Función tecnológica: **Estabilizador**

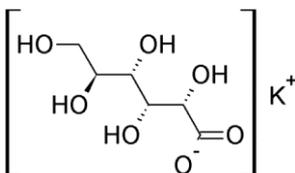
Agente secuestrante

Espesante

Alimentos: Productos a base de hortalizas y algas marinas fermentadas, pasta y fideos deshidratados y análogos, sustitutivos de la sal, café, infusiones de hierbas y otras bebidas a base de cereales.

Código INS: **E-577** (Revisado en 51 JECFA, 1998)

D-Gluconato de potasio



Descripción: Gránulo/polvo cristalino blanco amarillento e inodoro

Función tecnológica: **Regulador de la acidez**

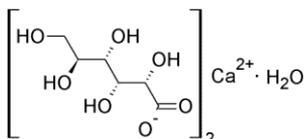
Agente secuestrante

Suplemento nutritivo

Alimentos: Queso mozzarella, embutidos, galletas y bizcochos

Código INS: **E-578** (Revisado en 51 JECFA, 1998)

D-gluconato de calcio



Descripción: Cristal/Polvo cristalino blanco e inodoro

Función tecnológica: **Regulador de acidez**

Endurecedor

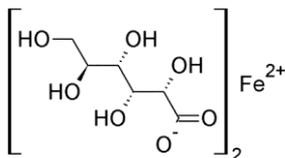
Suplemento nutritivo

Agente secuestrante

Alimentos: Queso mozzarella, embutidos, galletas y bizcochos

Código INS: **E-579** (Revisado en 53 JECFA, 1999)

D-Gluconato ferroso



Descripción: Gránulos/Polvo cristalino amarillo-verdoso o gris pálido con ligero olor a azúcar quemado.

Función tecnológica: **Retención del color**

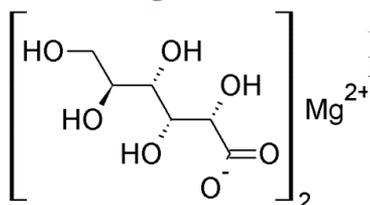
Estabilizante

Suplemento nutritivo

Alimentos: Hortalizas y algas marinas en vinagre, aceite, salmuera y salsa de soja

Código INS: **E-580** (Revisado en 53 JECFA, 1999)

D-Gluconato de magnesio



Descripción: Polvo cristalino blanco e inodoro.

Función tecnológica: **Regulador de acidez**

Endurecedor

Agente leudante

Suplemento nutritivo

Alimentos: Agua, productos de panificación

Clasificados como aditivos reguladores de la acidez (INS N°. 574-580), también se les atribuyen otras propiedades como la de agentes gasificantes, secuestrantes, endurecedores o acentuadores del sabor. Además de mejorar las propiedades sensoriales, impartiendo un sabor amargo pero refrescante, la adición de AG previene el enturbiamiento en bebidas al formar complejos con los metales pesados que puedan existir a nivel de trazas. Entre sus usos como conservante, destacan el empleo de este ácido en la fabricación de alimentos en escabeche o el de la D-glucono- δ -lactona en el curado de carnes para la fabricación de embutidos. Asimismo, diversas plantas procesadoras de alimentos emplean estos compuestos como agentes de limpieza para el mantenimiento de sus instalaciones ([Hustede et al., 1989](#); [Ramachandran et al., 2006](#)): el D-gluconato de sodio, en disolución alcalina, es empleado como detergente en la limpieza de material de vidrio, mientras el AG es más adecuado para el lavado de materiales compuestos de matriz metálica, como acero u otras aleaciones; por ejemplo, en la industria láctea, se usa para prevenir la precipitación de sales de calcio, tanto en la

maquinaria como en los recipientes de vidrio empleados en el almacenamiento de la leche. La D-glucono- δ -lactona también es empleada en bollería industrial para reducir la absorción de compuestos grasos, como acidificante y levadura química para hornear (Ramachandran et al., 2006).

No obstante, la presencia en exceso de estos compuestos en frutas, puede ser también indicativo de pérdida de calidad asociada a infecciones provocadas por agentes patógenos biológicos, como demuestran los estudios realizados en mango (Davidzon et al., 2010), melocotón (De Cal et al., 2013), uva (Jackson, 2008; König et al., 2009), manzana (Hadas et al., 2007; Prusky et al., 2004) y naranja (Vilanova et al., 2014). Particularmente, la presencia de AG y/o ceto-ácidos en uva o mosto es sinónimo de “podredumbre noble” o contaminación por *Botrytis cinerea*, cuya actividad influye en la estabilidad física y química del vino, así como en sus propiedades sensoriales (Del Torno-de Roman et al., 2013; Fugelsang & Edwards, 2007). Por ello, la determinación de este ácido se ha convertido en una práctica habitual en la industria vitivinícola, sirviendo de indicador del estado de la cosecha de uva y la calidad del vino durante el proceso de elaboración; según recomendaciones de la Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, el contenido de este ácido no ha de ser superior a 300 mg·L⁻¹.

En cualquier caso, como se ha indicado previamente, estos compuestos encuentran aplicaciones más allá del ámbito puramente agroalimentario. La industria farmacéutica emplea D-gluconatos de metales divalentes, como Ca²⁺, Mg²⁺ y Fe²⁺, fundamentalmente, como suplemento mineral en el tratamiento de hipocalcemia, hipomagnesemia y anemia, respectivamente. El D-gluconato de sodio también encuentra aplicación como aditivo para la modificación de las propiedades de fraguado del cemento, permitiendo incrementar su dureza y resistencia

ante condiciones ambientales extremas (Hustede et al., 1989, Sawyer, 1964).

En la actualidad, el ámbito de aplicación de este ácido continúa creciendo. Así, su excelente capacidad como agente quelante con Fe^{2+} y Fe^{3+} ha sido empleada para eliminar, a pH neutro, sustancias cloradas peligrosas, como 2,4,6-triclorofenol (TCF) y tricloroetileno, en aguas subterráneas mediante la reacción de Fenton (Ahuja et al., 2007). Por otro lado, también se le ha encontrado uso en procesos de reciclado de catalizadores agotados de Mo, Ni y Al, lográndose porcentajes de recuperación del 99, 46 y 14 %, respectivamente, bajo condiciones óptimas de biolixiviación (Amiri et al., 2012).

Asimismo, el AG encuentra aplicaciones como sustrato para la obtención de sus derivados 2-ceto-D-gluconato y 5-ceto-D-gluconato, mediante procesos de oxidación regioselectiva catalizada por enzimas deshidrogenasas procedentes de bacterias acéticas, como *Gluconobacter oxydans*. Mientras el 2-ceto-D-gluconato es utilizado como componente base en la síntesis química de ácido eritórbico (aditivo E-315, antes conocido como ácido D-isoascórbico) y otros compuestos heterocíclicos (Stottmeister et al., 2005); el 5-ceto-D-gluconato se emplea en la producción de ácido tartárico (agente antioxidante en la industria alimentaria, agente reductor en la industria textil y compuesto quiral utilizado en síntesis química) (Herrmann et al., 2004), ácido xilárico, el compuesto de sabor salado 4-hidroxi-5-metil-2,3-dihidrofuranona-3, así como para la síntesis de vitamina C mediante el método de Grey (Bremus et al., 2006; Saichana et al., 2015; Salusjärvi et al., 2004).

2.3. Métodos de producción

El AG puede obtenerse mediante procedimientos químicos y biotecnológicos, sin embargo, estos últimos se han impuesto para su elaboración a escala industrial. En concreto, las primitivas fermentaciones superficiales con hongos *Penicillium* (Herrick & May, 1928) han dado paso a los actuales procesos fermentativos con cultivo sumergido de hongos filamentosos, *Aspergillus niger*, y bacterias acéticas, fundamentalmente *Gluconobacter*, altamente selectivas y técnicamente eficientes. También, durante los últimos años, se han aislado y caracterizado otras cepas bacterianas capaces de metabolizar glucosa a AG, como *Acetobacter diazotrophicus* (Stephan et al., 1991) y *Zymomonas mobilis* (Rehr et al., 1991). Igualmente, se han evaluado nuevos procesos fermentativos basados en la inmovilización de células (Sankpal & Kulkarni, 2002; Sankpal et al., 1999; Singh, 2008; Singh et al., 2003, 2001) y enzimas (Blandino et al., 2001; Zhao et al., 2014), que bien podrían competir en un futuro para la elaboración de este ácido.

2.3.1. Métodos químicos

Desde que se publicase, a principios del siglo XX, el método general de Isbell para la síntesis electroquímica de sales de calcio de ácidos aldónicos mediante el tratamiento de azúcares con bromuro y carbonato de calcio (Isbell & Frush, 1931; Isbell et al., 1932), numerosos estudios han intentado impulsar el desarrollo de procesos de oxidación química (electroquímica y catalítica) de glucosa como una alternativa competitiva a la transformación microbológica.

La oxidación de glucosa puede lograrse fácilmente por catálisis heterogénea en solución acuosa. No obstante, se ha observado que la efectividad del proceso depende directamente de la actividad,

selectividad y estabilidad del catalizador. En su mayoría, las investigaciones se han enfocado hacia el uso de catalizadores de distintos metales de transición, como Pd, Pt y Au, soportados sobre TiO₂, Al₂O₃ y carbón activo, entre otros (Batz & Pruesse, 2007; Biella et al., 2002; Mirescu & Pruesse, 2007; Onda et al., 2008; Tathod et al., 2014). La oxidación catalítica de glucosa se favorece en medio alcalino (pH en torno a 9-10) al aumentar de la velocidad de reacción y evitar la drástica desactivación del catalizador; sin embargo, condiciones de alcalinidad extrema (pH>11) conducen a la descomposición de glucosa (reacciones retro-Claisen, Cannizzaro, condensación e isomerización) (Biella et al., 2002). Por lo general, los catalizadores de Pd o Pt soportados desencadenan reacciones secundarias indeseadas y se desactivan rápidamente a medida que se produce la acumulación de AG, obteniendo un mayor grado de conversión de glucosa cuando se emplea C activo como soporte (Onda et al., 2008). Aunque se ha observado una mejora en la actividad catalítica en sistemas dopados con Bi, la estabilidad del catalizador respecto a posibles fenómenos de lixiviación ha dificultado el uso del AG sintetizado con fines alimenticios y/o farmacológicos (Biella et al., 2002; Karski, 2006; Wenkin et al., 1996). El Au puede ser un excelente catalizador, además de poseer una elevada actividad catalítica, incluso en condiciones ambientales suaves (313 °K y pH 9), ha demostrado ser altamente selectivo (en todos los casos, ≥ 99,5 %) en la oxidación de diversas aldosas, entre ellas, glucosa (Mirescu & Pruesse, 2007); sin embargo, el hecho de que su actividad catalítica decaiga a partir del segundo ciclo dificulta su implantación a escala industrial (Biella et al., 2002).

En los últimos años, con objeto de impulsar industrialmente este tipo de procedimientos, todos los esfuerzos se han orientado hacia la búsqueda de nuevas materias primas y reactivos más económicos y respetuosos con el medio ambiente; por ejemplo, se ha propuesto el

empleo de H_2O_2 , en disolución acuosa, como oxidante alternativo (Bujak et al., 2012; Moreno et al., 2012). En este sentido, cabe destacar el método catalítico optimizado recientemente por Risant et al. (2014), en el que se consiguen conversiones de glucosa del 99 % a 25 °C, empleando FeSO_4 como catalizador y ultrasonidos de baja frecuencia (20 kHz) que aceleran la reacción. Paralelamente, Santhanaraj et al. (2014) proponen la producción catalítica de AG a partir de bioaceite, rico en 1,6-anhidro- β -D-glucosa, procedente de la pirolisis de roble rojo. La oxidación selectiva de glucosa, previamente purificada e hidrolizada, es llevada a cabo en medio alcalino (pH 9,3) empleando O_2 como oxidante y un 5 % de Pd/Cd como catalizador; de este modo, se obtienen rendimientos superiores al 80 % al cabo de 24 h de reacción. Asimismo, Tathod et al. (2014), han estudiado el efecto que ejercen diferentes soportes sobre la actividad catalítica del Pt, a 1 bar de presión y 50 °C, $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3+\text{Na}_2\text{CO}_3$ e hidrotalcita fueron los más destacados, mostrando resultados de oxidación similares: 83 % de rendimiento del AG y 99 % de conversión de glucosa, al cabo de 10 y 12 h respectivamente.

Sin embargo, los altos costes de producción y la elevada probabilidad de desactivación de los catalizadores, unido a los problemas de lixiviación anteriormente comentados, hacen que estos procedimientos químicos continúen siendo menos eficientes que los métodos de fermentación alternativos, especialmente cuando se pretende una aplicación alimenticia o farmacológica (Pal et al., 2016).

2.3.2. Métodos microbiológicos

El potencial de transformación selectiva que tienen muchos sistemas biológicos sobre diferentes sustratos y la economía de los correspondientes procesos, justifican, en gran medida, la importancia actual de este tipo de procesos.

2.3.2.1. Hongos filamentosos

La oxidación de glucosa a AG por hongos filamentosos consiste en una fermentación aeróbica con elevada demanda de oxígeno (Gibson et al., 1964; Reuss et al., 1986), catalizada por la enzima glucosa oxidasa (GOD), que es una flavoproteína parcialmente excretada o mantenida asociada a la membrana celular de especies *Aspergillus* y *Penicillium*; aproximadamente el 80 % de su actividad enzimática, se concentra en estas localizaciones (Bankar et al., 2009; Clarke et al., 2006; Johnstone-Robertson et al., 2008; Witteveen et al., 1992). La biotransformación de D-glucosa a D-glucono- δ -lactona tiene lugar mediante una reacción de deshidrogenación, de la que también se obtiene H₂O₂, que se descompone posteriormente en O₂ y H₂O bajo la acción de una catalasa. El AG es obtenido a partir de la hidrólisis espontánea o catalítica de la lactona. La Figura I.3 muestra el proceso global, en base a la actividad enzimática de GOD en *A. niger*. La hidrólisis de la lactona es espontánea a pH neutro y básico. La enzima lactonasa favorece este proceso, aunque su actividad sólo es requerida cuando se produce la acidificación del medio por acumulación de AG. Posteriormente, el AG puede permear la pared celular y ser metabolizado por la vía de la pentosa-fosfato.

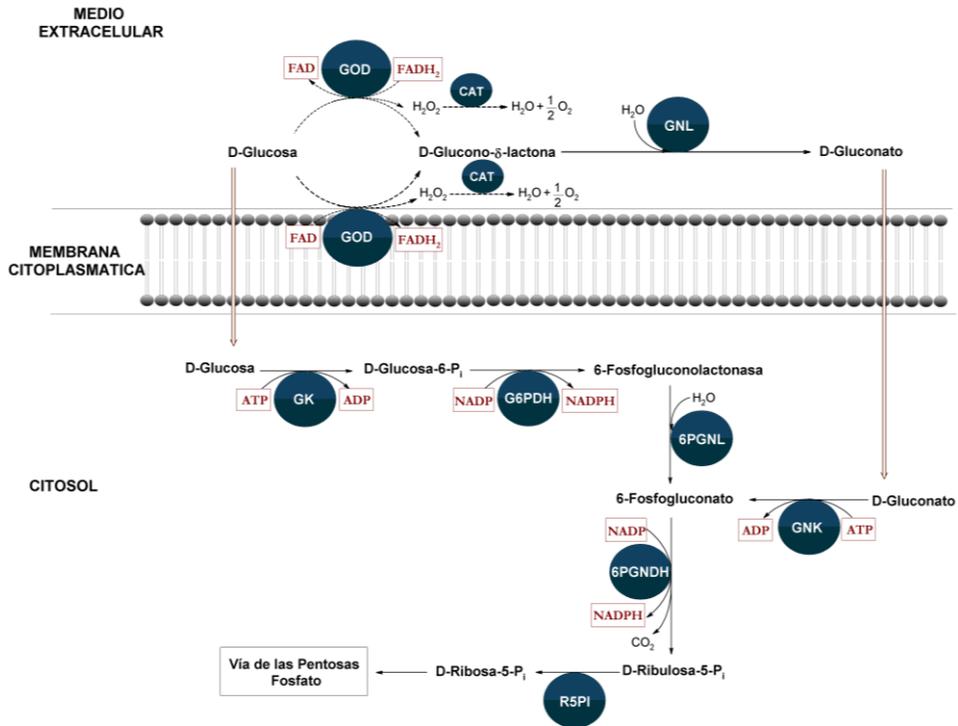


Figura I.3. Metabolismo oxidativo de *Aspergillus niger* (Cañete-Rodríguez et al., 2016). Parcialmente excretada o mantenida asociada a la membrana citoplasmática, la enzima glucosa oxidasa es la principal responsable de la formación de D-gluconato, mientras las enzimas solubles del citosol juegan un papel fundamental en la asimilación de D-glucosa y D-gluconato mediante la vía de las pentosas fosfato. La hidrólisis de la D-glucono- δ -lactona ocurre mayoritariamente de forma espontánea, aunque también puede tener lugar bajo la acción de una gluconolactonasa. GOD, glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4); GNL, gluconolactonasa (EC 3.1.1.17); CAT, catalasa (EC 1.11.1.6); GK, hexoquinasa (EC 2.7.1.1)/glucoquinasa (EC 2.7.1.2); GNK, gluconoquinasa (EC 2.7.1.12); G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49); 6PGNL, 6-fosfogluconolactonasa (EC 3.1.1.31); 6PGNDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44); R5PI, ribosa-5-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.6).

En cualquier caso, la formación de AG no está asociada al crecimiento del hongo, lo que hace imposible operar en modo continuo. Por este motivo, los mayoría de los procesos industriales con *A. niger* se desarrollan mediante fermentación por lotes, empleando medios con alto

contenido en glucosa ($110\text{-}250\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), bajo contenido en compuestos nitrogenados y fosforilados ($< 20\text{ mM N/P}$) y pH en torno a $4,5\text{-}6,5$, que necesitan de la adición de agentes neutralizantes a medida que se produce la acumulación de AG (Ramachandran et al., 2006; Zand et al., 2004). Aunque, en condiciones óptimas, *A. niger* logra convertir el 100 % de glucosa, la formación de micelios da lugar a un aumento en la viscosidad del medio que dificulta la aireación y homogeneización del sistema (Larroche & Gros, 1997). No obstante, este problema se puede paliar controlando el desarrollo morfológico de las células, que depende, en cierta medida, de la velocidad de agitación aplicada durante la preparación del inóculo (Lu et al., 2015). Como alternativa, teniendo en cuenta su alto contenido en GOD, se ha propuesto el empleo de esporas de *A. niger*, tratadas previamente con objeto de inhibir su germinación y favorecer su permeabilización, logrando una velocidad de conversión de glucosa ($4,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) muy superior a la de GOD comercial ($2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) (Ramachandran et al., 2008).

Por otro lado, se han evaluado nuevas estrategias de alimentación de glucosa así como el empleo de otras cepas que pudieran resultar más adecuadas. Por ejemplo, aunque sólo por un corto intervalo de tiempo, *Penicillium variable* P16 registró una productividad máxima de $2,02\text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ de D-gluconato cuando el medio se enriqueció con diferentes sales minerales y peptona micológica, como fuente de N (Crognale et al., 2008). De forma paralela, Anastassiadis & Rehm (2006a, 2006b) describieron diferentes métodos continuos de producción con cepas de *Aureobasidium pulullans*, con y sin retención de biomasa, llegando a producir hasta $375\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AG, con una selectividad del 78 %; esta especie, aerobia estricta, tiene una gran capacidad osmotolerante y degrada hexosas preferiblemente mediante la vía de las pentosas fosfato (Sevilla et al., 1987).

En ámbito de la Ingeniería Genética, los esfuerzos se han orientado hacia la modificación de cepas fúngicas con aplicación industrial para mejorar la eficacia de los procesos y reducir los costes de producción del AG. De las cepas modificadas de *A. niger*, quizás *A. niger* ORS-4.410 haya sido la que más ampliamente ha sido estudiada para la producción de este ácido. Se trata de una cepa modificada de *A. niger* ORS-4, aislada originariamente en residuos industriales de caña de azúcar (Singh et al., 1999), cuya mutación fue inducida mediante sucesivas exposiciones a radiación UV. Además de presentar mayores tasas de crecimiento celular, *A. niger* ORS-4.410 logró rendimientos de AG superiores a los de la cepa salvaje, tanto cuando se emplearon células libres (88 % tras 6 días) como inmovilizadas (78 % tras 12 días) (Singh et al., 2001). Trabajos posteriores han dado cuenta de su excelente habilidad para fermentar azúcares de residuos agroindustriales (uva y plátano) en procesos de producción discontinuos (Singh et al., 2005) y semicontinuos (Singh, 2008). Propiedades similares se han observado en la fermentación de residuos industriales de caña de azúcar, con *A. niger* ARNU-4, registrando rendimientos del 85,2 % (Sharma et al., 2008). Del mismo modo, se ha publicado un aumento en la eficiencia de cepas *A. niger* aisladas en cebolla mediante mutación inducida por radiación UV: la cepa mutada *A. niger* UV-112 produjo 0,66 g de D-gluconato de sodio por g de glucosa frente a los 0,25 g de D-gluconato de sodio por g de glucosa de la cepa parental (Prabu et al., 2012).

2.3.2.2. Bacterias

La diversidad de bacterias capaces de metabolizar glucosa a AG es amplia, incluyendo diferentes géneros de bacterias acéticas y otras cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Zymomonas*. El metabolismo de bacterias aerobias se desarrolla, por lo general, mediante procesos de

oxidación de materia orgánica, produciendo CO₂ y agua. Sólo bajo condiciones específicas de crecimiento, con elevada disponibilidad de nutrientes, algunos microorganismos manifiestan fenómenos de oxidación incompleta (*overflow metabolism*).

2.3.2.2.1. Bacterias acéticas

Un grupo especialmente llamativo es el de las bacterias acéticas, que, con independencia de las condiciones ambientales, oxidan de forma incompleta sus sustratos (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009). Se trata de un conjunto heterogéneo de bacterias aerobias estrictas, que reciben esta denominación dada su capacidad para utilizar etanol como sustrato oxidable, convirtiéndolo en ácido acético. Asimismo, pueden metabolizar un amplio rango de carbohidratos (entre ellos, glucosa) y otros alcoholes primarios y secundarios, conduciendo a la acumulación, transitoria o permanente, de productos orgánicos parcialmente oxidados (ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas). Las bacterias acéticas encuentran múltiples aplicaciones en el ámbito agroalimentario, siendo la producción de vinagre la más conocida (Gullo & Giudici, 2008; Gullo et al., 2014; Mamlouk & Gullo, 2013). Aunque el intervalo óptimo de pH se sitúa en torno a 5,0-6,0, son marcadamente acidófilas, pudiendo crecer a pH más bajo.

Las bacterias acéticas pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*, actualmente integrada por 31 géneros bacterianos y un total aproximado de 130 especies diferentes (The All-Species Living Tress, 2015). De los anteriores, *Gluconobacter* sp., en su mayoría, y *Acetobacter* sp., poseen un gran interés biotecnológico para la producción del AG. Fundamentalmente, ambos géneros difieren en su naturaleza flagelar y metabolismo oxidativo (Figura I.4): *Gluconobacter*, con flagelación polar, no poseen los mecanismos funcionales del ciclo del ácido

tricarboxílico (CAT), no pudiendo oxidar acetato (suboxidantes), mientras que *Acetobacter*, con flagelación peritrica, sí posee dicha ruta metabólica, llegando a oxidar etanol a CO₂ (superoxidantes). Con independencia del género bacteriano, el uso de glucosa puede llevarse a cabo en diferentes lugares de la célula en función de la localización del conjunto enzimático que catalice el proceso (Matsushita et al., 1994). En primer lugar, se puede hacer referencia a una “oxidación directa”, que tiene lugar en el periplasma y está catalizada por la quinoproteína D-glucosa-deshidrogenasa (GDH) que, con una pirrolo-quinolina-quinona (PQQ) como grupo prostético, se localiza en la superficie externa de la membrana citoplasmática. Algunas cepas específicas de *Gluconobacter* son capaces de continuar el proceso oxidativo, metabolizando AG a cetoácidos. *G. oxydans*, oxida gluconato a 2-ceto-D-gluconato mediante una flavoproteína gluconato-deshidrogenasa (GADH) y a 5-ceto-D-gluconato mediante otra enzima PPQ-dependiente, D-gluconato 5-deshidrogenasa (GA5DH), unida a la membrana citoplasmática (Shinagawa et al., 1999). Adicionalmente, existe otra enzima GA5DH NADP-dependiente, que, localizada en el citoplasma, es capaz de producir 5-ceto-D-gluconato (Klasen et al., 1995). Asimismo, *G. oxydans* es capaz de oxidar el 2-ceto-D-gluconato formado a 2,5-Diceto-D-gluconato a través de una segunda flavoproteína, 2-ceto-D-gluconato-deshidrogenasa (2KGADH). Otras cepas, como *G. japonicus*, sólo oxidan gluconato a 2-ceto-D-gluconato y 5-ceto-D-gluconato, pero no a 2,5-Diceto-D-gluconato (Malimas et al., 2009).

Figura I.4. Metabolismo oxidativo de *Gluconobacter* (Cañete-Rodríguez et al., 2016) (versión adaptada según Rogers et al. (2006) y Matsushita et al. (1994)). Diferentes deshidrogenasas, tanto asociadas a la membrana como solubles en el citoplasma, son las principales responsables de la producción y asimilación de D-gluconato. La conversión de D-glucono- δ -lactona a D-gluconato puede tener lugar de forma espontánea o mediante la acción de una glucono- δ -lactonasa (no mostrado en la figura). Las quinoproteínas D-glucosa y 5-ceto-D-gluconato deshidrogenasas, y las flavoproteínas D-gluconato y 2-ceto-D-gluconato deshidrogenasas están ubicadas en la membrana citoplasmática, con sus centros activos orientados hacia el periplasma. Los electrones originados en la oxidación del sustrato son transferidos a la coenzima Q_{10} (Q_{10}). En *G. oxydans*, su forma reducida, ubiquinol ($Q_{10}H_2$), puede ser oxidada por las enzimas citocromo bo_3 quinol oxidasa (Cyt bo_3) o citocromo *bd* oxidasa (Cyt *bd*), de baja afinidad por el oxígeno, para generar un gradiente de protones (Richard et al., 2013). Las enzimas NADP-dependientes, D-glucosa deshidrogenasa y ceto-D-gluconato reductasa, están localizadas en el citoplasma. GDH, D-glucosa deshidrogenasa (en la membrana citoplasmática, EC 1.1.5.2; en el citoplasma, EC 1.1.1.47); GADH, D-gluconato 2-deshidrogenasa (EC 1.1.99.3); 2KGGADH, 2-ceto-D-gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.4); GA5DH, D-gluconato 5-deshidrogenasa (en el citoplasma, EC 1.1.1.69); GK, glucoquinasa (EC 2.7.1.2); GNK, gluconoquinasa; G6PD, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49); 6PGDD, 6-fosfogluconato deshidratasa (EC 4.2.1.12); 6PGDH, 6-fosfogluconato

Igualmente, parece existir una clara asociación entre pH y selectividad de la oxidación de glucosa en especies de *Gluconobacter* (Velizarov & Beshkov, 1998; Olijve & Kok, 1979a, 1979b). A pH 3,5-4,0, *G. suboxydans* IFO 12528 ha demostrado ser altamente selectiva para la síntesis de 5-ceto-D-gluconato, consiguiendo la conversión del 87 % del AG (Ano et al., 2011). En cualquier caso, las enzimas deshidrogenasas están asociadas a la cadena respiratoria mediante la ubiquinona (coenzima Q₁₀) presente en la membrana citoplasmática (Yamada et al., 1969). De este modo, la transferencia de electrones induce un gradiente de protones a lo largo de la membrana citoplasmática que, finalmente, será utilizado para la producción de energía (ATP) disponible para el mantenimiento y/o crecimiento celular. En este mismo contexto, diversos estudios indican que concentraciones de glucosa superiores a 15 mM y valores de pH inferiores a 3,5 inhiben la formación de cetoácidos (Olijve & Kok, 1979a, 1979b; Roehr et al., 2001; Velizarov & Beschkov, 1998). Así, la optimización de procesos industriales de producción de AG por *G. oxydans* permite obtener rendimientos en torno al 75-80 % con una clara influencia del pH, de la concentración de glucosa y del nivel de aireación.

La oxidación intracelular de D-glucosa, catalizada por una batería de enzimas deshidrogenasas solubles NADP⁺-dependientes (GDH y GADH), diferencia distintas rutas metabólicas dependiendo del tipo de bacteria acética. Mientras la mayoría de bacterias *Acetobacter* oxidan D-glucosa mediante la vía de las pentosas fosfato y CAT, *Gluconobacter* lo hace siguiendo la ruta de la pentosa fosfato y la ruta de Entner Doudoroff (Prust et al., 2005).

Del conjunto de bacterias acéticas, *G. oxydans* 621H (DSM 2343) es la cepa que ha demostrado poseer mejor capacidad de adaptación a procesos de producción biotecnológica con una excelente capacidad

oxidativa, incluso, en condiciones de cultivo extremas, con escasa producción de biomasa (Olijve & Kok, 1979a; Sievers & Swings, 2005). No obstante, ha sido la secuenciación de su genoma (Prust et al., 2005) lo que ha permitido describir en profundidad la magnitud de estos procesos metabólicos y su fisiología celular. Una parte importante del metabolismo oxidativo de *Gluconobacter* se desarrolla en su zona periplasmática: la actividad enzimática de la quinoproteína GDH ha resultado ser muy superior (unas 27 veces) a la de su homóloga NADP⁺-dependiente (Pronk et al., 1989). Precisamente, la superioridad de especies *Gluconobacter* para sobrevivir y prosperar en medios de cultivo mixtos se atribuye a su elevado contenido en enzimas deshidrogenasas ligadas a la membrana celular. En medios ricos en nutrientes, estas enzimas captan y retiran rápidamente la glucosa y otras aldosas que puedan estar disponibles en el medio, transformándolas en ácidos orgánicos, que, además de ser no asimilables por otros microorganismos, disminuyen el pH del medio, convirtiéndolo en un entorno más hostil para el crecimiento microbiano de otras poblaciones (Velizarov & Beschkov, 1998). Después, parte del gluconato y el 5-ceto-D-gluconato formado en el espacio periplasmático podrá ser transportado hacia el interior de la célula, para ser asimilado mediante la vía de las pentosas fosfato. Especialmente llamativa es la relación de competencia que se establece entre crecimiento celular y producción de metabolitos (AG y cetoácidos); la interrupción de la actividad enzimática tanto de la GDH asociada a la membrana como las GHDs solubles del citoplasma, conduce al aumento de la velocidad de crecimiento, así como del rendimiento celular (Krajewski et al., 2010).

Entre las especies del género *Acetobacter*, destacan las cepas *A. methalonicus* y *A. diazotrophicus*. En ambos casos, la oxidación de glucosa a AG es catalizada por una GDH PQQ-dependiente unida a la

membrana citoplasmática, que está ligada, a su vez, a una cadena de transportadora de electrones, cuyo fin último es la síntesis de ATP.

Descrita por primera vez por Uhling, et al. (1986), *A. methanolicus* es acidófila y metilotrófica facultativa, que crece adecuadamente en medios minerales con metanol, glicerol o glucosa como única fuente de C y pH en torno a 4,0-4,5. A diferencia del resto de bacterias acéticas, *A. methanolicus* metaboliza metanol mediante la ruta de la ribulosa monofosfato. Si bien está íntimamente ligado al género *Acetobacter* y guarda ciertas similitudes con *G. oxydans*, oxida fuertemente glucosa a AG, pero no a cetoácidos (Sievers et al., 1994). De modo que, previsiblemente, la síntesis de AG por *A. methanolicus* no sufriría los problemas asociados a la formación de cetoácidos.

A. diazotrophicus, aislado por Gillis et al. (1989), crece bien en medios minerales con sales de amonio como fuente de N. Aunque la conversión a AG es elevada, también se obtienen 2-ceto-D-gluconato y 2,5-Diceto-D-gluconato como subproductos de su metabolismo oxidativo (Atwood et al., 1991). No obstante, es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de sustrato (superiores al 30 % glucosa) (Cavalcante & Dobereiner, 1988) y pH muy ácido (<3,5) (Attwood et al., 1991), cualidades presumiblemente deseables a escala industrial.

2.3.2.2.2. Pseudomonas

Por otro lado, otros estudios preliminares sobre la síntesis microbiológica de AG han tenido como protagonistas a especies de *Pseudomonas*, un grupo de bacterias aerobias estrictas de flagelación polar, que crecen adecuadamente a pH próximo a la neutralidad. Mayoritariamente emplean oxígeno como aceptor final de electrones, aunque en algunos casos el nitrato puede ser usado como aceptor

alternativo de electrones, permitiendo así el crecimiento anaerobio. Estudios llevados a cabo con *P. aeruginosa* han puesto de manifiesto la existencia de dos vías alternativas para el metabolismo de glucosa: la vía de oxidación directa y la vía oxidativa mediante enzimas citoplasmáticas, que incluye los mecanismos funcionales de la ruta de Entner-Doudoroff y CAT. La vía directa implica dos oxidaciones sucesivas en el periplasma en las que la D-glucosa se transforma en D-gluconato por acción de una GDH, y éste, a su vez, en 2-ceto-D-gluconato por acción de una GADH. Aunque ambas rutas operan simultáneamente en *Pseudomonas* sp., se ha observado que la vía oxidativa se ve favorecida en condiciones de aerobiosis, mientras la vía fosforilativa lo es en condiciones de anaerobiosis (Hunt & Phibbs, 1981, 1983). Asimismo, Whiting et al. (1976) demostraron que, en medios con limitada disponibilidad de glucosa, el metabolismo oxidativo de *P. aeruginosa* se desarrolla preferiblemente a través de la vía fosforilativa, debido a la represión del sistema específico de transporte de D-gluconato y 2-ceto-D-gluconato. Otras cepas, como *P. putida*, han mostrado ser altamente competitivas en relación al empleo de glucosa como sustrato oxidable, ya que antes de proceder a su catabolización éste es acumulado en el caldo de fermentación evitando que pueda ser oxidado por otros microorganismos. En consecuencia, el crecimiento de *P. putida* se inicia una vez ha desaparecido toda la glucosa presente en el medio de cultivo (Schleissner et al., 1997). En los últimos años, se ha incrementado el uso de *P. fluorescens* para la producción de 2-ceto-D-gluconato a partir de AG (Sun et al., 2012, 2013, 2015). Al mismo tiempo, otra cepa de *Pseudomonas*, *P. tetraloensis*, ha sido también empleada en la producción simultánea de ácido lactobiónico y AG, empleando suero láctico y glucosa como sustrato (Alonso et al., 2015). Igualmente se ha indicado que estas bacterias también pueden metabolizar el AG a través de la ruta de Entner-Doudoroff para crecimiento y mantenimiento celular;

por lo tanto, desde el punto de vista de la producción de AG, este es un inconveniente que comparten con las bacterias acéticas (véase, Figura I.4).

2.3.2.2.3. *Zymomonas*

Finalmente, conocida por su capacidad para producir etanol, *Z. mobilis* también posee un gran potencial biotecnológico en este contexto. Aunque su clasificación taxonómica ha planteado dificultades, actualmente se la considera perteneciente a la familia *Sphingomonadaceae*. Esta bacteria fue aislada por primera vez en bebidas alcohólicas, como el vino de palma de África o el pulque mexicano, y también como sustancia contaminante en sidra y cerveza. Sus propiedades biológicas y fisiológicas han sido exhaustivamente revisadas por Swings & De Ley (1984). Glucosa, fructosa y sacarosa son los únicos carbohidratos que *Z. mobilis* utiliza como fuente del C para su crecimiento. Se trata de una bacteria anaerobia facultativa que metaboliza su sustrato por la vía de Entner-Doudoroff, ruta generalmente utilizada por organismos aerobios estrictos, como puedan ser *Pseudomonas* spp. En presencia de altas concentraciones de sustrato, oxida simultáneamente glucosa a glucono- δ -lactona y fructosa a sorbitol, bajo la acción de una glucosa-fructosa oxiredorructasa NADP⁺-dependiente (Zachariou & Scopes, 1986). Adicionalmente, la enzima glucono- δ -lactonasa garantiza la rápida hidrólisis de la lactona a AG. A diferencia del resto de bacterias anteriormente analizadas, *Z. mobilis* dispone de un sistema estereoespecífico de difusión facilitada para la glucosa. Aun así, es la velocidad de fosforilación de la glucosa, y no la velocidad de transporte de ésta en el interior de la célula, el factor limitante del metabolismo oxidativo de *Z. mobilis*.

2.4. Beneficios nutricionales

Como ya se ha comentado anteriormente, en el ámbito agroalimentario, tanto AG como sus principales derivados, son calificados como “inofensivos para la salud”. Y es que, el metabolismo de los mamíferos incluye los mecanismos funcionales de degradación de D-gluconato que proporcionan, de forma lenta y uniforme, la energía necesaria para reacciones anabólicas y catabólicas. No obstante, se le atribuyen otros efectos beneficiosos para la salud, no comentados hasta el momento.

El AG, y por extensión su δ -lactona, poseen propiedades prebióticas, actuando como ingredientes que afectan de manera positiva a un número limitado de cepas bacterianas del colón, estimulando selectivamente su crecimiento y/o actividad metabólica. En términos generales, la microbiota intestinal está constituida por bacterias beneficiosas y, en menor medida, por bacterias tóxicas y/o perjudiciales, que establecen relaciones simbióticas mutualistas y comensalistas. En el colón humano, el D-gluconato es fermentado por bacterias del ácido láctico, fundamentalmente especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium adolescentis*, inhibiendo el crecimiento de patógenos entéricos como *Clostridium perfringens* y promoviendo funciones fisiológicas específicas mediante la liberación de metabolitos al lumen intestinal (Tsukahara et al., 2002). Resultados similares se han encontrado en ensayos realizados en ratas (Asano et al., 1997), lechones (Biagi et al., 2006), cerdos (Tsukahara et al., 2002) y perros (Biagi et al., 2010). Estas bacterias transforman el D-gluconato en diferentes ácidos grasos de cadena corta, mayoritariamente lactato y acetato, que además de contribuir a la acidificación del medio, son absorbidos por la mucosa del intestino grueso para proporcionar energía a las células epiteliales (Asano et al., 1994).

Desde que se conociese el importante papel que desempeñan las bifidobacterias en el tránsito intestinal, la industria agroalimentaria ha intentado incorporarlas en diferentes alimentos y bebidas, bien en forma de suplemento dietético o bien como cultivo iniciador (como sucede en el caso de los productos lácteos). No obstante, cada vez con más frecuencia, esta práctica está siendo sustituida por ingredientes prebióticos y probióticos. En este contexto, el AG y derivados podrían ser considerados como potentes agentes de control intestinal, inhibidores intestinales de la putrefacción, desodorantes de heces, e incluso, agentes anti-astringentes, para animales y humanos (Asano et al., 1994). Por ejemplo, desde hace ya algunos años, el AG es ampliamente empleado como suplemento dietético en alimentación animal, en especial de animales destetados, como sustituto natural de los tradicionales antibióticos (Biagi et al., 2006; De Lange et al., 2010).

Las investigaciones más recientes se han orientado hacia el estudio de las propiedades antioxidantes de D-glucono- δ -lactona y D-gluconato de sodio. Los resultados obtenidos demuestran el potencial que este tipo de compuestos podrían tener, en un futuro inmediato, como nutracéuticos para la prevención de trastornos cardiovasculares y/o suplementos dietéticos. De acuerdo con Saluk-Juszczak (2010), la capacidad antioxidante de estos derivados de glucosa estaría asociada a reacciones en las que intervendrían los grupos hidroxilo de la cadena hidrocarbonada, así como su capacidad para secuestrar cofactores metálicos que intervienen en la activación plaquetaria y que podrían desencadenar trastornos arteriales. El estudio *in vivo* de la actividad antioxidante de D-glucono- δ -lactona y D-gluconato de sodio en plasma, ha demostrado igualmente su implicación en la protección de proteínas y lípidos frente a oxidantes fuertes, como el peroxonitrito (Kolodziejczyk et al., 2011).

2.5. Ácido glucónico como aditivo alimentario. Empleo de recursos agroindustriales como materia prima para su producción

Teniendo en cuenta el interés del AG y sus derivados como aditivos alimentarios, no es de extrañar que una de las estrategias de fortalecimiento y consolidación de su mercado se haya orientado a la búsqueda de materias primas más rentables. En su mayoría, se trata de subproductos agroindustriales cuyo empleo, no sólo supondría el abaratamiento de los costes de producción, sino que también ofrecería una excelente oportunidad para mejorar la competitividad de la industria mediante la generación de nuevos productos biotransformados de mayor valor añadido, que pudiesen ser utilizados, por sí solos o combinados con otros ingredientes, en la elaboración de nuevos alimentos. La Tabla I.2 recoge los principales subproductos y técnicas de fermentación estudiadas a tal efecto durante los últimos años, prestando especial atención a la necesidad de adecuar el sustrato a la biotransformación deseada y a su posterior consumo mediante tratamientos previos, así como el rendimiento logrado en el proceso productivo.

Como se puede observar, los tradicionales sustratos a base de glucosa o sacarosa han sido satisfactoriamente sustituidos por subproductos agroindustriales, fuente natural de carbohidratos, como almidón, caña de azúcar, melaza (miel de caña), higo, plátano, uva, fresa, suero lácteo desecho de papel o hidrolizados de materiales lignocelulósicos, que suponen el desarrollo de tecnologías respetuosas con el medio ambiente, orientadas hacia la transformación sostenible de recursos naturales.

El empleo de sustratos a base de almidón da lugar a mejores rendimientos de reacción que los sustratos lignocelulósicos (como el bagazo de caña, el rastrojo de maíz o la cascarilla del arroz), de creciente

interés en estudios sobre producción de gluconatos. Este resultado podría ser previsible, si se tienen en cuenta la amplia variedad de compuestos tóxicos/inhibidores microbiológicos que se generan durante la hidrólisis previa de estos materiales lignocelulósicos, necesaria para la liberación de los azúcares fermentables (Jordan et al., 2011; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000; Zhang et al., 2014, 2016); la exposición a condiciones extremas de temperatura, presión y acidez durante la hidrólisis, conduce a la liberación de ácidos carboxílicos, derivados del furano y compuestos fenólicos, todos ellos, inhibidores de la actividad microbiológica de hongos y bacterias. Así, por ejemplo, empleando sustratos a base de hidrolizados de bagazo de maíz, Zhang et al. (2016) han estudiado el efecto inhibitor ejercido por estos compuestos sobre el crecimiento celular, la producción de AG y la actividad enzimática de GOD de *A. niger* SIIM M276 durante procesos de fermentación glucónica. De todos los compuestos generados durante la hidrólisis (derivados del furano, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos), el furfural resultó poseer la mayor capacidad inhibitor: concentraciones de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ fueron suficientes para reducir a la mitad el crecimiento celular y la actividad de GOD, deteniendo, por completo, la actividad metabólica del hongo, a $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Por otro lado, se observa cómo la fermentación glucónica convencional con cultivo sumergido de células de *A. niger* libres podría también ampliarse con nuevos procedimientos de producción, con células o enzimas inmovilizadas, que, entre otros aspectos, podrían facilitar la reutilización de células, la posibilidad de trabajar en modo continuo y el control de espumas (Singh, 2008; Zhao et al., 2014). En este sentido, diferentes materiales tales como esponjas de poliuretano, alginato de calcio (Singh, 2008) y óxido de grafeno químicamente reducido (Zhao et al., 2014) han sido evaluados como posibles soportes para su inmovilización. Así, por ejemplo, Singh (2008) ha evaluado cómo

la repetición de ciclos de fermentación en estado sólido empleando mosto rectificado de uva como sustrato, permite obtener velocidades de producción de AG de hasta $22,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (2,5 veces mayor que la velocidad de producción de un ciclo típico de fermentación), con rendimientos del 95-98 %, reutilizando células de *A. niger* ORS-4410 inmovilizadas sobre esponjas de poliuretano. En este trabajo, también se ha evaluado el comportamiento de células de *A. niger*, atrapadas en alginato cálcico, en procesos de fermentación sumergida; no obstante, y como suele ser habitual en sistemas aeróbicos (Webb et al., 1986), la velocidad de transferencia de oxígeno en el medio resultó ser la variable limitante del proceso. Aunque este tipo de limitaciones en la transferencia de nutrientes podrían, en cierta medida, resolverse mediante la agitación vigorosa del medio de fermentación, esto supondría para las células un estrés mecánico que afecta de forma drástica a la producción de AG (Singh, 2008).

Tabla I.2. Principales residuos agroindustriales empleados como sustrato para el desarrollo de procesos biotecnológicos de producción de ácido D-glucónico por *A. niger* (Cañete-Rodríguez et al., 2016).

Fuente de C	Microorganismo o Enzima	Método de cultivo	Pretratamiento del sustrato	Rendimiento	Referencia
Almidón	<i>A. niger</i> ORS-4	Cultivo discontinuo	-	24,39 %	Singh and Singh, 2002
		Fermentación sumergida ^a	Hidrólisis	35,92 %	
Almidón	<i>A. niger</i> JCM 5549 inmovilizada	Cultivo discontinuo	Hidrólisis	84,91 %	Matsui et al., 2013
		Fermentación sumergida ^a Tela no tejida ^b			
Material lignocelulósico	Glucoamilasa y Glucosa oxidasa inmovilizadas (<i>A. niger</i>)	Cultivo discontinuo	Hidrólisis	82,00 %	Zhao et al., 2014
		Oxido de grafeno reducido ^b			
Material lignocelulósico	<i>A. niger</i> SIIM M276	Cultivo discontinuo	Hidrólisis	94,83 %	Zhang et al., 2016
		Fermentación sumergida ^a			
Melaza de caña de azúcar	<i>A. niger</i> ORS-4	Cultivo discontinuo	-	8,27 %	Singh and Singh, 2002
		Fermentación sumergida ^a	Clarificación	38,47 %	
Melaza de caña de azúcar	<i>A. niger</i> ARNU-4 (cepa mutada)	Cultivo discontinuo			
		Fermentación en estado sólido ^a Residuos de té ^b	-	85,20 %	Sharma et al., 2008
Melaza de caña de azúcar	<i>A. niger</i> ORS-4410 (cepa mutada)	Cultivo en discontinuo	-	15,30 %	Singh et al., 2005
		Fermentación sumergida ^a	Clarificación	61,30 %	

Suero lácteo	<i>A. niger</i> NCIM 548	Cultivo en discontinuo Fermentación sumergida ^a	Desproteínización	69,00 %	Mukhopadhyay et al., 2005
	<i>A. niger</i> NCIM 548 inmovilizada	Cultivo en discontinuo Fermentación sumergida ^a Esponja de poliuretano ^b		63,00 %	
Higo	<i>A. niger</i> ATCC 10577	Cultivo en discontinuo Fermentación en estado sólido ^a	Esterilización	79,70 %	Roukas, 2000
		Cultivo discontinuo Fermentación superficial ^a	Extracción y esterilización		Roukas and Laikopoulou-Kyriakides, 2002
Residuos de papel	<i>A. niger</i> IAM 2094	Cultivo discontinuo Fermentación superficial ^a	Hidrólisis	40,08 %	Ikeda et al., 2006
	<i>A. niger</i> ORS-4	Cultivo discontinuo Fermentación sumergida ^a	Clarificación	51,70 %	Singh and Singh, 2002
Puré de plátano	<i>A. niger</i> ORS-4410 (cepa mutada)	Cultivo discontinuo Fermentación sumergida ^a	-	72,40 %	Singh et al., 2005
			Rectificación	84,84 %	

Fuente de C	Microorganismo o Enzima	Método de cultivo	Pretratamiento del sustrato	Rendimiento	Referencia
	<i>A. niger</i> ORS-4410 (cepa mutada)	Cultivo discontinuo Fermentación sumergida ^a	- Rectificación	60,40 % 80,60 %	Singh et al., 2005
Mosto de uva	<i>A. niger</i> ORS-4410 inmovilizada (cepa mutada)	Repetición de cultivos en discontinuo Fermentación sumergida ^a Alginato de cálcico ^b Repetición de cultivos en discontinuo Fermentación sumergida ^a Esponja de poliuretano ^b	Rectificación	89,50 % 98,60 %	Singh, 2008

^aCultivation method

^bSupport used to immobilize the cells/enzymes or to grow the cells.

^cSimultaneous co-production of lactobionic and gluconic acid.

^dSimultaneous co-production of citric and gluconic acid.

^eCalculated on utilized glucose.

Otras de las ventajas aparentes del uso de sistemas inmovilizados, hacen referencia al aumento de la productividad del proceso fermentativo, el reciclado de biomasa, el manejo de grandes concentraciones celulares y la posibilidad de trabajar en continuo (Lee, 2015; Pal et al., 2016; Webb et al., 1986). No obstante, el desarrollo satisfactorio de este tipo de procesos todavía plantea cuestiones pendientes de resolver. La estabilidad operacional y la actividad catalítica dependen de la etapa de pre-cultivo, el procedimiento de inmovilización y las condiciones operacionales. En este contexto, una cuestión clave es el llegar a entender cómo pueden influir las condiciones ambientales sobre la fisiología celular: gradientes físico-químicos, problemas de suministro de oxígeno, separación de productos, modificaciones en el crecimiento y el metabolismo celular, así como otros aspectos difíciles de evaluar (Anderson, 1986). Obviamente, existe una amplia variedad de factores determinantes al tratar de seleccionar el reactor más adecuado para llevar a cabo procesos de fermentación con sistemas inmovilizados; mientras el reactor de tanque agitado de mezcla completa es el más empleado en sistemas de fermentación con células libres, los reactores de lecho fluidizado suelen ser la solución más empleada para sistemas con células inmovilizadas. En este sentido, se ha de tener en cuenta la necesidad de evitar importantes esfuerzos de cizalla sobre las partículas con células inmovilizadas (Da Fonseca et al., 1986).

Una alternativa que podría simplificar el proceso y reducir el desarrollo de reacciones secundarias indeseadas, al tiempo que se lograrían rendimientos mayores para el producto de interés, sería la posibilidad inmovilizar enzimas en lugar de células. Sin embargo, ésta es una cuestión bastante compleja; la elección de uno u otro sistema de inmovilización va a depender de las características y necesidades específicas del sistema. En general, la inmovilización de enzimas suele ser una buena opción cuando se trabaja con reacciones simples, de un solo

paso, siempre que el coste de las enzimas sea aceptable y ésta conserve su actividad después de la inmovilización (Birnbaum et al., 1986); por el contrario, la inmovilización de células es la opción más adecuada cuando las enzimas implicadas en el proceso son intracelulares e inestables durante y después de la inmovilización, los microorganismos no dan lugar a reacciones enzimáticas secundarias que pudiesen interferir, y tanto los sustratos como los productos son compuestos de bajo peso molecular (Lee, 2015).

En cuanto a la producción de AG, existen muchos estudios orientados al desarrollo de procesos comerciales de producción mediante el uso de enzimas; sin embargo, esto parece ser todavía poco rentable a escala industrial debido a la inestabilidad y los altos costes de las enzimas. La mayoría de estos trabajos proponen el empleo de GOD, que, como se ha podido comprobar, se desactiva rápidamente después de un solo ciclo de fermentación, cuando ésta se utiliza libre, o después de un corto período de tiempo, si ésta se ha inmovilizado previamente (Anastassiadis & Morgunov, 2007). El problema se complica aún más cuando se precisa de un sistema multienzimático (Anastassiadis & Morgunov, 2007; Mafra et al., 2015; Zhao et al., 2014). Así, por ejemplo, se ha propuesto la co-inmovilización de enzimas glucoamilasa y GOD de *A. niger*, sobre óxido de grafeno y óxido de grafeno químicamente reducido para obtener un biocatalizador que permita la conversión de almidón a AG. Los resultados fueron muy diferentes dependiendo del soporte seleccionado; la actividad del sistema multienzimático al cabo de cuatro ciclos de fermentación resultó ser tan sólo del 10 % en el caso del óxido de grafeno, y de hasta el 85 %, en el caso del óxido de grafeno químicamente reducido (Zhao et al., 2014).

Del mismo modo, se ha estudiado el empleo de un sistema multienzimático, compuesto por enzimas invertasa, GOD y catalasa, para la producción de AG en un biorreactor *airlift*, a partir de sacarosa

procedente de caña de azúcar (Mafra et al., 2015). En comparación con otros estudios similares, éste registró una alta productividad de AG en base a glucosa ($0,266 \text{ g}_{\text{AG}} \cdot \text{g}_{\text{G}}^{-1}$). La evaluación de la estabilidad de las enzimas a lo largo del proceso, puso de manifiesto una clara influencia de la temperatura y pH del medio; así, las condiciones más adecuadas para la producción de AG se conseguían a temperaturas de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH de 6,6, logrando la conservación de hasta el 50 % de la actividad enzimática durante 100 h de fermentación. En contraposición, a temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH 5,0, la pérdida del 50 % de la actividad enzimática de GOD y la catalasa se aceleró drásticamente, ocurriendo a tan sólo 4,24 y 1 h de fermentación, respectivamente.

Con todo ello, aunque el uso de enzimas y sistemas multienzimáticos ha gozado de gran interés en los últimos años, parece que la optimización de su estabilidad operativa y el control eficiente de estos sistemas continúan siendo un desafío en la actualidad (Mafra et al., 2015; Xue & Woodley, 2012).

En cualquier caso, lo anterior sólo son ejemplos de una clara tendencia en la exploración de nuevas opciones que permitan el aprovechamiento y revalorización de excedentes agroindustriales como sustratos de fermentación, en este caso, para la producción de AG y sus derivados. Pues bien, en el contexto de esta Tesis Doctoral, tal y como ya se ha indicado con anterioridad, se estudiarán algunos aspectos fundamentales para el aprovechamiento y revalorización de excedentes de fresa para la obtención de un fermentado glucónico que pueda ser utilizado, como producto base, para la elaboración de nuevos alimentos.

Bibliografía

- Afrin, S., Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Reboredo-Rodriguez, P., Mezzetti, B., Varela-Lopez, A., Giempieri, F., Battino, M. (2014) Promising health benefits of the strawberry: a focus on clinical studies, *J. Agric. Food Chem.* 64, pp. 4435-4449.
- Ahuja, D.K., Bachas, L.G., Bhattacharyya, D. (2007) Modified Fenton reaction for trichlorophenol dechlorination by enzymatically generated H₂O₂ and gluconic acid chelate, *Chemosphere* 66, pp. 2193–2200.
- Alonso, S., Rendueles, M., Diaz, M. (2015) Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas tetraloensis*, *Bioresour. Technol.* 196, pp. 314-323.
- Amiri, F., Mousavi, S.M., Yaghmaei, S., Barati, M. (2012) Biobleaching kinetics of a spent refinery catalyst using *Aspergillus niger* at optimal conditions, *Biochem. Eng. J.* 67, pp. 208–217.
- Anastassiadis, S., Rehm, H.J. (2006a) Continuous gluconic acid production by *Aureobasidium pullulans* with and without biomass retention, *Electron. J. Biotechnol.* 9, pp. 494–504.
- Anastassiadis, S., Rehm, H.J. (2006b) Continuous gluconic acid production by the yeast-like *Aureobasidium pullulans* in a cascading operation of two bioreactors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, pp. 541–548.
- Anastassiadis, S., Morgunov, I.G. (2007) Gluconic acid production, *Recet Pat.* 1, pp. 167-180.

- Anderson, J.G. (1986) Immobilised cell physiology, in: Webb, C., Black, G.M., Atkinson, B. (eds.), Process engineering aspects of immobilized cells systems, First ed., The institution of Chemical Engineers. Rugby, Warwickshire, pp 153-176.
- Ano, Y., Shinagawa, E., Adachi, O., Toyama, H., Yakushi, T., Matsushita, K. (2011) Selective, high conversion of D-glucose to 5-keto-D-gluconate by *Gluconobacter suboxydans*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 75, pp. 586–589.
- Asano, T., Kondo, R., Mori, Y., Takenawa, S., Yamochi, M., Kunugita, K., Terachi, T. (1994) Bifidobacterium growth promoter contg. gluconic acid and/or glucono-delta-lactone – is used as a health promoting additive in food and drink, *Patent*.
- Asano, T., Yuasa, K., Yoshimura, Y., Takenawa, S., Fukuba, H. (1997) Digestion, absorption and intestinal residue of various gluconic acids in rats, J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 50, pp. 287-294.
- Attwood, M.M., Vandijken, J.P., Pronk, J.T. (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*, J. Ferment. Bioeng. 72, pp. 101–105.
- Baatz, C., Pruesse, U. (2007) Preparation of gold catalysts for glucose oxidation by incipient wetness, J. Catal. 249, pp. 34–40.
- Blandino, A., Macías, M., Cantero, D. (2001) Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules, Process Biochem. 36, pp. 601-606.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S., Ananthanarayan, L. (2009) Glucose oxidase – An overview, Biotechnol. Adv. 27, pp. 489–501.
- Biagi, G., Piva, A., Moschini, M., Vezzali, E., Roth, F.X. (2006) Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology, J. Anim. Sci. 84, pp. 370–378.

- Biagi, G., Cipollini, I., Grandi, M., Zaghini, G. (2010) Influence of some potential prebiotics and fibre-rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota, *Anim. Feed Sci. Technol.* 159, pp. 50–58.
- Biella, S., Prati, L., Rossi, M. (2002) Selective oxidation of D-glucose on gold catalyst, *J. Catal.* 206, pp. 242–247.
- Birnbaum, S., Larsson, P.O., Mosbach, K. (1986) Immobilised biocatalysts, the choice between enzymes and cells, in: Webb C., Black, G.M., Atkinson, B. (eds.), *Process engineering aspects of immobilized cell physiology*, First ed., Institution of Chemical Engineering, Rugby, Warwickshire, pp. 35-59.
- Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2006) The use of microorganisms in L-ascorbic acid production, *J. Biotechnol.* 124, pp. 196–205.
- Bujak, P., Bartczak, P., Polanski, J. (2012) Highly efficient room-temperature oxidation of cyclohexene and D-glucose over nanogold Au/SiO₂ in water, *J. Catal.* 295, pp. 15–21.
- Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Ehrenreich, A., Liebl, W., García-García, I. (2016) Gluconic acid: Properties, production methods and applications - An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste biovalorization, *Process Biochemistry*, doi: 10.1016/j.procbio.2016.08.028.
- Cavalcante, V.A., Dobereiner, J. (1988) A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane, *Plant Soil* 108, pp. 23–31.

- Clarke, K.G., Johnstone-Robertson, M., Price, B., Harrison, S.T.L. (2006) Location of glucose during production by *Aspergillus niger*, Appl. Microbiol. Biotech. 70, pp. 72-77.
- Climent, M.J., Corma, A., Iborra, S. (2011) Converting carbohydrates to bulk chemicals and fine chemicals over heterogeneous catalysts, Green Chem. 13, pp. 520–540.
- Crognale, S., Petruccioli, M. Fenice, M., Federici, F. (2008) Fed-batch gluconic acid production from *Penicillium variable* P16 under different feeding strategies, Enzyme Microb. Technol. 42, pp. 445–449.
- Da Fonseca, M.M., Black, G.M., Webb, C. (1986) Reactor configurations for immobilised cells, in: Webb C., Black, G.M., Atkinson, B. (eds.), Process engineering aspects of immobilized cell physiology, First ed., Institution of Chemical Engineering, Rugby, Warwickshire, pp. 63-74.
- Davidzon, M., Alkan, N., Kobiler, I., Prusky, D. (2010) Acidification by gluconic acid of mango fruit tissue during colonization via stem end infection by *Phomopsis mangiferae*, Postharvest Biol. Technol. 55, pp. 71–77.
- De Cal, A., Sandin-Espana, P., Martinez, F., Egueen, B., Chien-Ming, C., Lee, M.H., Prusky, D. (2013) Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of *Monilinia fructicola* on peach fruit, Postharvest Biol. Technol. 86, pp. 418–423.
- De Lange, C.F.M., Pluske, J., Gong, J., Nyachoti, C.M. (2010) Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs, Livest. Sci. 134, pp. 124–134.

- Del Torno-de Roman, L., Alonso-Lomillo, M.A., Dominguez-Renedo, O., Arcos-Martinez, M.J. (2013) Gluconic acid determination in wine by electrochemical biosensing, *Sens. Actuators B Chem.* 176, pp. 858–862.
- Deppenmeier, U., Ehrenreich, A. (2009) Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16, pp. 69–80.
- European Commission-BIO Intelligence Service (2010) Preparatory study on food waste across EU 27, Technical Report-2010-054. ISBN: 978-92-79-22138-5.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division, <http://faostat.fao.org> (Enero 2016).
- Food Chemicals Codex (2010) Seventh ed., United Book Press, Inc, Baltimore, MD United States.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (2007) Wine microbiology: practical applications and procedures, Springer Science & Business Media.
- Galanakis, C.M. (2012) Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications, *Trends Food Sci. Technol.* 26, pp. 68–87.
- Galanakis, C.M., Schieber, A. (2014) Editorial of special issue on “Recovery and utilization of valuable compounds from food processing by-products”, *Food Res. Int.* 65, pp. 299-300.
- Gibson, Q.H., Massey, V., Swoboda, B.E.P. (1964) Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase, *J. Biol. Chem.* 239, pp. 3927–3934.

- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M. (2012) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health, *Nutr.* 28, pp. 9–19.
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Battino, M. (2014) Strawberry and human health: effects beyond antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 18, pp. 3867-3876.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M., Teixeira, K.R.S., Döbereiner, J. Deley, J. (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, pp. 361–364.
- Gullo, M., Giudici, P. (2008) Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection, *Int. J. Food Microbiol.* 125, pp. 46–53.
- Gullo, M., Verzelloni, E. Canonico, M. (2014) Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: process and biotechnological aspects, *Process Biochem.* 49, pp. 1571–1579.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., Meybeck, A. (2011) Global food losses and food waste. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Hadas, Y., Goldberg, I., Pines, O. Prusky, D. (2007) Involvement of gluconic acid and glucose oxidase in the pathogenicity of *Penicillium expansum* in apples, *Phytopathology* 97, 384–390.
- Herrick, H.T., May, O.E. (1928) The production of gluconic acid by the *Penicillium luteum–purpurogenum* group. II. Some optimal conditions for acid formation, *J. Biol. Chem.* 77, pp. 185–195.

- Herrmann, U., Merfort, M., Jeude, M., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2004) Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343, Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, pp. 86–90.
- HLPE (2009) Global agriculture towards 2050. How to feed the world 2050. High Lever Experts Forum, Rome.
- HLPE (2014) Food losses and waste in the context of sustainable food systems, A report by the High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition, Rome. www.fao.org/cfs/cfs-hlpe (Septiembre 2016).
- Hunt, J.C., Phibbs, P.V. (1981) Failure of *Pseudomonas aeruginosa* to form membrane associated glucose dehydrogenase activity during anaerobic growth with nitrate, Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, pp. 1393-1399.
- Hunt, J.C., Phibbs, P.V. (1983) Regulation of alternative peripheral pathways of glucose catabolism during aerobic and anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*, J. Bacteriol. 154, pp. 793-802.
- Hustede, H., Haberstroh, H.J., Schinzig, E. (2012) Gluconic acid, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp., 37-44.
- Isbell, H.S., Frush, H.L. (1931) The oxidation of sugars. I. The electrolytic oxidation of aldose sugars in the presence of a bromide and calcium carbonate, Bureau Stand. J. Res. 6, pp. 1145–1152.
- Isbell, H.S., Frush, H.L., Bates, F.J. (1932) Manufacture of calcium gluconate by the electrolytic oxidation of dextrose, Bureau Stand. J. Res. 8, pp. 571–577.

- Jackson, R.S. (2008) Wine science: principles and applications, Academic press.
- Johnstone-Robertson, M., Clarke, K.G., Harrison, S.T.L. (2008) Characterization of the the distribution of glucose oxidase in *Penicillium* sp. CBS 120262 and *Aspergillus niger* NRRL-3 cultures and its effect on integrated product recovery, Biotechnol. Bioeng. 4, pp. 910–918.
- Jordan, D.B., Braker, J.D., Bowman, M.J., Vermillion, K.E., Moon, J., Liu, Z.L. (2001) Kinetic mechanism of an aldehyde reductase of *Saccharomyces cerevisiae* that relieves toxicity of furfural and 5-hydroxymethylfurfural, Biochim. Biophys. Acta 1814, pp. 1686–1694.
- Karski, S. (2006) Activity and selectivity of Pd-Bi/SiO₂ catalysts in the light of mutual interaction between Pd and Bi, J. Mol. Catal. A Chem. 253, pp. 147–154.
- Kolodziejczyk, J., Saluk-Juszczak, J., Wachowicz, B. (2011) In vitro study of the antioxidative properties of the glucose derivatives against oxidation of plasma components, J. Physiol. Biochem. 67, pp. 175–183.
- König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (2009) Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine, Springer.
- Krajewski, V., Simic, P., Mouncey, N.J., Bringer, S., Sahm, H., Bott, M. (2010) Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation, Appl. Environ. Microbiol. 76, pp. 4369–4376.

- Kummu, M., De Moel, H., Porkka, M., Siebert, S., Varis, O., Ward, P.J. (2012) Lost food, wasted resources: global food supply chain losses and their impacts on freshwater, cropland, and fertiliser use, *Sci. Total Environ.* 438, pp. 477–489.
- Larroche, C., Gros, J.B. (1997) Special transformation processes using fungal spores and immobilized cells, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 55, pp. 179–220.
- Lee, B.H. (2015) *Fundamental of food biotechnology*, Second ed., John Wiley & Sons, Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK.
- Lis, T. (1983) The crystal-structure of D-gluconic acid monohydrate, *Carbohydr. Res.* 122, pp. 23–29.
- Lu, F., Ping, K.K., Wen, L., Zhao, W., Wang, Z.J., Chu, J., Zhuang, Y.P. (2015) Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation, *Process Biochem.* 50, pp. 1342–1348.
- Mafra, A.C.O., Furlan, F.F., Badino, A.C., Tardioli, P.W. (2015) Gluconic acid production from sucrose in an airlift reactor using a multi-enzyme system, *Bioprocess Biosys.* 38, pp. 671–680.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M., Yamada, Y. (2009) *Gluconobacter japonicus* sp nov., an acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*, *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 59, pp. 466–471.

- Mamlouk, D., Gullo, M. (2013) Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation, *Indian J. Microbiol.* 53, pp. 377–384.
- Márquez-Domínguez, J.A. (2008) El marco geográfico en los campos de fresa, *La fresa de Huelva*. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. ISBN: 978-84-8474-222-7.
- Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O. (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria, *Adv. Microbial Physiol.* 36, pp. 247–301.
- Milsom, P., Meers, J.L. (1985) Gluconic and itaconic acids, *Comprehensive biotechnology: the principles, applications, and regulations of biotechnology in industry, agriculture, and medicine*, vol. 3, Pergamon Press, Oxford, pp. 672-700.
- Mirescu, A., Pruesse, U. (2007) A new environmental friendly method for the preparation of sugar acids via catalytic oxidation on gold catalysts, *Appl. Catal. B – Environ.* 70, pp. 644–652.
- Moreno, T., Kouzaki, G., Sasaki, M. Goto, M. Jose Cocero, M. (2012) Uncatalysed wet oxidation of D-glucose with hydrogen peroxide and its combination with hydrothermal electrolysis, *Carbohydr. Res.* 349, pp. 33–38.
- Morrison, R.T., Boyd, R.N. (1998) *Organic chemistry*, fifth ed., Boston, Massachusetts.
- Naziri, E., Nenadis, N., Mantzouridou, F., Tsimidou, M.Z. (2014) Valorization of the major agri-food industrial by-products and waste from Central Macedonia (Greece) for the recovery of compounds for food applications, *Food Res. Int.* 65, pp. 350-358.
- OECD, Organization for Economic Co-operation and Development (2005) *International standardisation of fruit and vegetables. Strawberries*, OECD Publishing.

- Olijve, W., Kok, J.J. (1979a) Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media, Arch. Microbiol. 121, pp. 283–290.
- Olijve, W., Kok, J.J. (1979b) Analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures, Arch. Microbiol. 121, pp. 291–297.
- Onda, A., Ochi, T., Kajiyoshi, K., Yanagisawa, K. (2008) A new chemical process for catalytic conversion of D-glucose into lactic acid and gluconic acid, Appl. Catal. A – Gen. 343, pp. 49–54.
- Pal, P., Kumar, R., Banerjee, S., (2016) Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green production. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 104, pp. 160-170.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology 74, pp. 25-33.
- Pérez-Jiménez, J., Viuda-Martos, M. (2015) Introduction to the special issue Byproducts from agri-food industry: New strategies for their revalorization. Food Res. Int. 73, pp. 1-2.
- Prabu, R., Chand, T., Raksha, S. (2012) Improvement of *Aspergillus niger* for sodium gluconate synthesis by UV mutation method, J. Chem. 9, pp. 2052–2057.
- Pronk, J.T., Levering, P.R., Olijve, W., Vandijken, J.P. (1989) Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*, Enzyme Microb. Technol. 11, pp. 160–164.

- Prusky, D., McEvoy, J.L., Saftner, R., Conway, W.S., Jones, R. (2004) Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit, *Phytopathology* 94, pp. 44–51.
- Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W.F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Deppenmeier, U. (2005) Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*, *Nat. Biotechnol.* 23, pp. 195–200.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C. (2006) Gluconic acid: properties, applications and microbial production, *Food Technol. Biotechnol.* 44, pp. 185–195.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C. (2008) Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose, *Biores. Technol.* 99, pp. 4559–4565.
- Rehr, B., Wilhelm, C., Sahm, H. (1991) Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, pp.144-148.
- Reuss, M., Frohlich, S. Kramer, B., Messerschmidt, K., Pommerening, G. (1986) Coupling of microbial kinetics and oxygen transfer for analysis and optimization of gluconic acid production with *Aspergillus niger*, *Bioprocess Eng.* 1, pp. 79–91.
- Richhardt, J., Luchterhand, B., Bringer, S., Büchs, J. Bott, M. (2013) Evidence for a key role of cytochrome *bo*₃ oxidase in respiratory energy metabolism of *Gluconobacter oxydans*, *J. Bacteriol.* 195, pp. 4210–4220.

- Rinsant, D., Chatel, G., Jerome, F. (2014) Efficient and selective oxidation of D-glucose into gluconic acid under low-frequency ultrasonic irradiation, *Chemcatchem*, 6, pp. 3355–3359.
- Roehr, M., Kubicek, C.P., Komínek, J.C. (2001) Gluconic acid, H.J. Rehm, G. Reed (Eds.) *Biotechnology Set*, Second ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 347–362.
- Rogers, P., Chen, J.S., Zidwick, M.J. (2006) Organic acids and solvent production, Part I: Acetic, lactic, gluconic succinic and polyhydroxyalkanoic acids, in: *The prokaryotes, A handbook on the biology of bacteria*, Third ed., vol 1: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology, Springer, New York, pp. 511–755.
- Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I., Frebortova, J. (2015) Acetic acid bacteria: a group of bacteria with versatile biotechnological applications, *Biotechnol. Adv.* 33, pp. 1260–1271.
- Saluk-Juszczak, J. (2010) A comparative study of antioxidative activity of calcium-D-gluconate, sodium-D-gluconate and D-glucono-1,4-lactone in a human blood platelet model, *Platelets* 21, pp. 632–640.
- Salusjärvi, T., Povelainen, M., Hvorslev, N., Eneyskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Shabalin, K.A., Neustroev, K.N., Kalkkinen, N., Miasnikov, A.N. (2004) Cloning of a gluconate/polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, characterisation of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, pp. 306–314.

- Sankpal, N.V., Joshi, A.P., Sutar, I.I., Kulkarni, B.D. (1999) Continuous production of gluconic acid by *Aspergillus niger* immobilized on a cellulosic support: study of low pH fermentative behaviour of *Aspergillus niger*, *Process Biochem.* 35, pp. 317-325.
- Sankpal, N.V., Kulkarni, B.D. (2002) Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils, *Process Biochem.* 37, pp. 1343-1350.
- Santhanaraj, D., Rover, M.R., Resasco, D.E., Brown, R.C., Crossley, S. (2014) Gluconic acid from biomass fast pyrolysis oils: specialty chemicals from the thermochemical conversion of biomass, *Chemsuschem*, 7, pp. 3132–3137.
- Sawyer, D.T. (1964) Metal–gluconate complexes, *Chem. Rev.* 64, pp. 633–643.
- Schleissner, C., Reglero, A., Luengo, J.M. (1997) Catabolism of D-glucose by *Pseudomonas putida* U occurs via extracellular transformation into D-gluconic acid and induction of a specific gluconate transport system, *Microbiol.-Uk*, 143, pp. 1595–1603.
- Sevilla, M.J., Moragues, M.D., Uruburu, F. (1987) Evolution of several enzyme activities of *Aureobasidium pullulans* during the transition from yeast to mycelium induced by ethanol, in: *Microbiology*, CSIC, Madrid, Spain, pp. 115–122.
- Sharma, A., Vivekanand, V., Singh, R.P. (2008) Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support, *Bioresour. Technol.* 99, pp. 3444–3450.

- Shinagawa, E., Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O. (1999) Production of 5-keto-D-gluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent membrane-bound D-gluconate dehydrogenase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 6, pp. 341–350.
- Sievers, M., Ludwig, W., Teuber, M. (1994) Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the alpha-subclass of proteobacteria based on 16S ribosomal DNA-sequences, *Syst. Appl. Microbiol.* 17, pp. 189–196.
- Sievers, M., Swings, J. (2005) Family *Acetobacteraceae*, in: Springer (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Second ed., New York, pp. 41–95.
- Singh, O.V. (2008) Modulated gluconic acid production from immobilized cells of *Aspergillus niger* ORS-4.410 utilizing grape must, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, pp. 780–787.
- Singh, O.V., Jain, R.K., Singh, R.P. (2003) Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, pp. 208–212.
- Singh, O.V., Kapur, N., Singh, R.P. (2005) Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, pp. 519–524.
- Singh, O.V., Kumar, R. (2007) Biotechnological production of gluconic acid: future implications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, pp. 713–722.
- Singh, O.V., Pereira, B.M.J., Singh, R.P. (1999) Isolation and characterization of a potent fungal strain *Aspergillus niger* ORS-4 for gluconic acid production, *J. Sci. Ind. Res.* 58, pp. 594–600.

- Singh, O.V., Sharma, A., Singh, R.P. (2001) Gluconic acid production by *Aspergillus niger* mutant ORS-4.410 in submerged and solid state surface fermentation, Indian J. Exp. Biol. 39, pp. 691–696.
- Stephan, M.P., Oliveira, M., Teixeira, K.R.S., Martinezdrets, G., Dobreiner, J. (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*, Fems Microbiol. Lett. 77, pp. 67–72.
- Stottmeister, U., Aurich, A., Wilde, H., Andersch, J., Schmidt, S., Sicker, D. (2005) White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32, pp. 651–64.
- Sun, W.J., Zhou, Y.Z., Zhou, Q., Cui, F.J., Yu, S.L., Sun, L. (2012) Semi-continuous production of 2-keto-gluconic acid by *Pseudomonas fluorescens* AR4 from rice starch hydrolysate, Bioresour. Technol. 110, pp. 546–551.
- Sun, W.J., Yun, Q.Q., Zhou, Y.Z., Cui, F.J., Yu, S.L., Zhou, Q., Sun, L. (2013) Continuous 2-keto-gluconic acid (2KGA) production from corn starch hydrolysate by *Pseudomonas fluorescens* AR4, Biochem. Eng. J. 77, pp. 97–102.
- Sun, W., Xiao, F., Wei, Z., Cui, F., Yu, L., Yu, S., Zhou, Q. (2015) Non-sterile and buffer-free bioconversion of glucose to 2-keto-gluconic acid by using *Pseudomonas fluorescens* AR4 free resting cells, Process Biochem. 50, pp. 493-499.
- Swings, J. De Ley, J. (1984) Genus *Zymomonas*, in: Bergey's manual of systematic bacteriology, pp. 576–580.
- Tathod, A., Kane, T., Sanil, E.S., Dhepe, P.L. (2014) Solid base supported metal catalysts for the oxidation and hydrogenation of sugars, J. Mol. Catal. A – Chem. 388, pp. 90–99.

- The All-Species Living Tree, Release LTPs123. <http://www.arb-silva.de/projects/living-tree>, (accessed september 2015).
- Tomás-Barberán, F.A. (2008) La fresa. Un alimento muy saludable, La fresa de Huelva. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. ISBN: 978-84-8474-222-7.
- Tsukahara, T., Koyama, H., Okada, M., Ushida, K. (2002) Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria, J. Nutr. 132, pp. 2229–2234.
- Uhlig, H., Karbaum, K., Steudel, A. (1986) *Acetobacter methanolicus* sp. nov., anacidophilic facultatively methylotrophic bacterium, Int. J. Syst. Bacteriol. 36, pp. 317–322.
- Velizarov, S., Beschkov, V. (1998) Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations, Process Biochem. 33, pp. 527–534.
- Vilanova, L., Vinas, I., Torres, R., Usall, J., Buron-Moles, G., Teixido, N. (2014) Acidification of apple and orange hosts by *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*, Int. J. Food Microbiol. 178, pp. 39–49.
- Webb, C., Black, G.M., Atkinson, B. (1986) Process engineering aspects of immobilized cells systems, First ed., The institution of Chemical Engineers. Rugby, Warwickshire.
- Wenkin, M., Touillaux, R., Ruiz, P., Delmon, B., Devillers, M. (1996) Influence of metallic precursors on the properties of carbon-supported bismuth-promoted palladium catalysts for the selective oxidation of glucose to gluconic acid, Appl. Catal. A – Gen. 148, pp. 181–199.

- Whiting, P.H., Midgley, M., Dawes, E.A. (1976) Role of glucose limitation in regulation of transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, J. Gen. Microbiol. 92, pp. 304–310.
- Witteveen, C.F.B., Veenhuis, M., Visser, J. (1992) Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*, Appl. Environ. Microbiol. 58, pp. 1190–1194.
- Xue, R., Woodley, J.M. (2012) Process technology for multy-enzymatic reaction systems. Bioresource Technology, 115, pp. 183-195.
- Yamada, Y., Aida, K, Uemura, T. (1969) Enzymatic studies on oxidation of sugar and sugar alcohol. V. Ubiquinone of acetic acid bacteria and its relation to classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, especially of so-called intermediate strains, J. Gen. Appl. Microbiol. 15, pp. 181.
- Zachariou, M., Scopes, R.K. (1986) Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production, J. Bacteriol. 167, pp. 863–869.
- Zand, H., Markos, J., Bales, V. (2004) Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: growth and non-growth conditions, Process Biochem. 39, pp. 1341–1345.
- Zhang, S., Winstrand, S., Chen, L., Li, D., Jönsson, L.J., Hong, F. (2014) Tolerance of the nanocellulose-producing bacterium *Gluconacetobacter xylinus* to lignocellulose-derived acids and aldehydes, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, pp. 9792-9799.
- Zhang, H., Zhang, J., Bao, J. (2016) High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. Bioresource Technology, 203, pp. 211-219.

Zhao, F., Li, H., Jiang, Y., Wang, X. Mu, X. (2014) Co-immobilization of multi-enzyme on control-reduced graphene oxide by non-covalent bonds: an artificial biocatalytic system for the one-pot production of gluconic acid from starch, *Green Chem.* 16, pp. 2558–2565.



Capítulo II
HIPÓTESIS
Y OBJETIVOS

1. Contextualización del plan de investigación desarrollado en la Tesis

Tal y como se ha intentado explicar y justificar con más detalle en la Capítulo I, el presente trabajo se puede situar en un contexto más amplio sobre la necesidad de optimizar los recursos, productos y sub-productos alimenticios que se usan y generan a nivel mundial. La enorme cantidad de alimentos y recursos que se pierden actualmente, o que no se aprovechan debidamente, es absolutamente inadmisibles desde diversos puntos de vista y muy especialmente si se tiene en cuenta el número de personas que, a día de hoy, no pueden alcanzar unos niveles mínimos de alimentación. Por supuesto, el problema es multidisciplinar, amplio y necesita de la concurrencia de muchas personas, especialidades y aproximaciones diversas para su resolución. En este trabajo sólo se pretende realizar una contribución a la investigación e innovación científica que ayude al aprovechamiento de algunos subproductos, especialmente perecederos, como son las sobreproducciones o excedentes de frutas, y en concreto, de fresa.

2. Hipótesis y objetivo generales

La composición de estos excedentes es ideal para llevar a cabo múltiples biotransformaciones para la obtención de compuestos específicos de mayor valor añadido o bien de medios complejos, más estables, con los que se podrían generar nuevos alimentos y condimentos con propiedades beneficiosas para la salud.

En concreto, en colaboración con otros grupos de investigación, se podría estudiar la biotransformación de excedentes de fresa para el desarrollo de nuevas bebidas. El producto final se conseguiría mediante la mezcla adecuada de fermentados glucónicos de puré de fresa con vinagre de fresa. Para ello, se emplearían

levaduras y bacterias seleccionadas; por un lado, se llevaría a cabo una fermentación alcohólica y posterior acetificación para obtener vinagre de fresa y, por otro, una fermentación selectiva para convertir la glucosa de la materia prima en ácido glucónico al tiempo que se intenta conservar el contenido en fructosa del medio. Las nuevas bebidas, no alcohólicas, tendrían un sabor ácido y refrescante endulzado por el contenido natural de fructosa de la fruta al tiempo que mantendría, en mayor o menor medida, las propiedades saludables originales de ésta. El bajo pH final obtenido permitiría evitar el crecimiento de microorganismos no deseados dando estabilidad química y biológica al producto.

El desarrollo del proyecto requiere de la participación de:

- Un grupo especializado en Microbiología (grupo de Biotecnología Enológica de la Universidad Rovira i Virgili, URV) cuyo **objetivo general-URV**, sería la selección de microorganismos para la preparación de los inóculos necesarios, llevar a cabo el control microbiológico de los procesos y productos desarrollados y estudiar aquellos aspectos/problemas que, desde el punto de vista microbiológico, pudieran surgir en el transcurso del proyecto.
- Por otro lado, sería necesario un grupo especializado en análisis químico y sensorial de alimentos (grupo de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Sevilla, USE), con el **objetivo general-USE** de determinar la composición química, en especial los compuestos bioactivos, así como evaluar los aspectos sensoriales y de seguridad alimentaria de los productos desarrollados.

- Y, finalmente, un grupo especializado en Ingeniería de Bioprocesos (grupo de Ingeniería Química RNM271 de la Universidad de Córdoba), con el **objetivo general-UCO** de resolver los diferentes aspectos relacionados con la búsqueda de los tipos de biorreactores y modos de funcionamiento más adecuados para garantizar la obtención de un producto final estable en un medio natural bastante complejo, como es el puré industrial de fresa. De las tres biotransformaciones estudiadas en el proyecto, fermentación alcohólica, acetificación y fermentación glucónica, en esta memoria, sólo se presentarán, como **objetivo general de la Tesis Doctoral**, algunos de los problemas que se han tenido que resolver, a escala de laboratorio, alrededor de la última biotransformación: **conversión de la glucosa en ácido glucónico**. En concreto, como objetivos específicos se abordará el procedimiento de inoculación que ha de seguirse, la evaluación de coeficientes cinéticos básicos para el diseño de los biorreactores y la forma de evitar que el ácido glucónico formado siga biotransformándose en otros compuestos.

3. Hipótesis y objetivo específico 1

El uso alimenticio que se persigue para el producto final, sugiere, a priori, la conveniencia de emplear, como materia prima, purés estabilizados industrialmente mediante tratamientos térmicos suaves de pasteurización frente a otras alternativas más drásticas, como puede ser la esterilización. De este modo, los productos obtenidos, no sólo presentarían nuevas propiedades organolépticas, sino que podrían conservar, en la medida de lo posible, las propiedades sensoriales y nutricionales de la fruta original.

La necesidad de trabajar con puré de fresa pasteurizado ha condicionado, de forma importante, el trabajo que se ha tenido que desarrollar. En efecto, las suaves condiciones aplicadas durante la pasteurización industrial del puré, no son suficientes para eliminar la presencia de otros microorganismos asociados originalmente a la fresa (fundamentalmente, levaduras), aunque sí para reducir su actividad, haciéndoles entrar en un estado de latencia reversible. De este modo, cuando se realice la inoculación del microorganismo seleccionado para llevar a cabo la transformación de la glucosa en ácido glucónico y se incuba todo el medio en las condiciones adecuadas para su crecimiento, los microorganismos indeseados podrían volver a activarse, proliferando en el medio y consumiendo parte del sustrato disponible y generando otros productos no deseados.

Por otro lado, como microorganismo responsable para la formación del ácido glucónico se emplearía una bacteria acética. El especial metabolismo de este grupo de bacterias junto con el uso alimenticio que se pretende del producto final, podría justificar el empleo de estas bacterias frente a otros microorganismos alternativos, por ejemplo hongos (riesgo de formación de micotoxinas).

Dado que se pretende obtener un fermentado glucónico que conserve, entre otros aspectos, el dulzor original de la fresa proveniente de su contenido en fructosa, el grupo URV seleccionó la bacteria *Gluconobacter japonicus* CECT 8443. Esta cepa podría ser una excelente opción, puesto que, además de tolerar condiciones extremas de pH, ha demostrado poseer una elevada selectividad para el consumo de glucosa en medios sintéticos donde existían otras fuentes de Carbono disponibles (fructosa, entre otras). Sin embargo, las bacterias acéticas son bien conocidas por su dificultad de cultivo en medios sólidos para su conservación, aislamiento, reactivación y preparación de inóculos.

Pues bien, si se tiene en cuenta que para las levaduras presentes en la materia prima, es sólo una cuestión de más o menos tiempo lo que tardarían en reactivarse, sólo se dispondría de una ventana temporal, a partir de la inoculación de *G. japonicus*, para que esta bacteria utilice la mayor parte de la glucosa del medio y la transforme en ácido glucónico.

Pues bien, como **hipótesis de trabajo** se plantea que, a pesar de las dificultades de cultivo que tienen las bacterias acéticas, sería posible conseguir un inóculo de *G. japonicus*, plenamente activo y adaptado al medio complejo en el que tendrá que producir el ácido glucónico, que sea capaz de conseguir un rendimiento muy alto de ácido glucónico en base a glucosa, al mismo tiempo que no consuma la fructosa y que lo haga antes de la reactivación de las levaduras presentes en el medio.

Esta hipótesis, convierte la preparación del inóculo en una etapa clave del proceso de fermentación estudiado, llevando a establecer el **primer objetivo específico** de esta Tesis Doctoral, que será desarrollado en la Sección 2.2 del Capítulo III:

- [1] *Estudiar y optimizar las condiciones de preparación del inóculo de *G. japonicus* en puré de fresa, industrialmente pasteurizado, para lograr la imposición de la cepa inoculada frente a otros microorganismos presentes en el medio.*

4. Hipótesis y objetivo específico 2

Otra cuestión clave de este estudio está relacionada con la necesidad de conocer algunos parámetros cinéticos y de rendimiento para el diseño de los fermentadores.

En concreto, un término fundamental para evaluar diferentes aspectos del diseño de un biorreactor y modos posibles de funcionamiento es la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}). Este coeficiente cinético se evalúa, normalmente, a partir de datos experimentales de evolución de la concentración de microorganismos. Sin embargo, en este caso, por un lado, hay que tener en cuenta las dificultades para el cultivo en placa de las bacterias acéticas, y por otro, la complejidad del medio de cultivo, con una gran cantidad de sólidos en suspensión, que dificulta o hace casi imposible el recuento directo al microscopio para obtener medidas fiables de concentración celular. Por lo tanto, la obtención de datos de concentración celular se convierte en una tarea bastante difícil que, entre otros aspectos, afecta a la posibilidad de estimar μ_{max} .

Como **hipótesis de trabajo** se plantea que, teniendo en cuenta el tipo de metabolismo de *G. japonicus*, se podría proponer una metodología que, de forma indirecta, empleando información sobre la evolución del sustrato, permitiera estimar μ_{max} sin datos de concentración celular. Así, se establece el **segundo objetivo específico** de esta Tesis Doctoral, que será abordado en la Sección 3.2 del Capítulo III:

[2] *Estimar parámetros cinéticos claves para el diseño de los biorreactores sin necesidad de disponer de medidas experimentales de concentración celular.*

5. Hipótesis y objetivo específico 3

Por último, el complejo metabolismo oxidativo que presentan las bacterias acéticas, tal y como se ha explicado en el Capítulo I, conlleva que el ácido glucónico pueda continuar oxidándose a

cetoácidos y/o pueda ser asimilado por la bacteria. La rápida oxidación de glucosa a ácido glucónico y, posteriormente, de éste hacia cetoácidos, forma parte de la sofisticada estrategia que tienen estos microorganismos para competir con otros microorganismos menos resistentes a una alta acidez y bajos pHs. Una vez se ha consumido la glucosa del medio, tanto el glucónico como algunos cetoácidos pueden ser asimilados. Numerosos trabajos realizados con *G. oxydans*, con medios sintéticos, han demostrado todas estas biotransformaciones, identificado y caracterizado a las enzimas involucradas, propuesto los correspondientes metabolismos e identificado y cuantificado a las variables operativas más idóneas para los posibles objetivos. Respecto a este último aspecto, entre las principales variables operativas que se han de considerar, cabe destacar la concentración inicial de glucosa en el medio, el pH a lo largo del proceso, la concentración de ion calcio y el nivel de oxígeno disuelto.

Pues bien, de acuerdo con la información básica previa, disponible para bacterias similares, se planteó como **hipótesis de trabajo** que la estabilidad del ácido glucónico, formado por *G. japonicus* CECT 8443, sería muy dependiente de la concentración inicial de glucosa y del pH del medio.

Esto condujo a la formulación del **tercer objetivo específico** de esta Tesis Doctoral, que será tratado en la Sección 4.2 del Capítulo III:

- [3] *Estudiar el efecto del enriquecimiento en azúcares del puré de fresa industrialmente pasteurizado sobre la estabilidad del ácido glucónico en el producto fermentado final.*



Capítulo III

INVESTIGACIÓN

DESARROLLADA

1. Aportación 1 – Revisión bibliográfica

1.1. Breve descripción del trabajo

Teniendo en cuenta la importancia, propiedades y creciente demanda del ácido glucónico, producto obtenido principalmente mediante procesos biológicos y, por otro lado, la necesidad de aprovechar y revalorizar diversos recursos agroalimentarios, se pensó en la conveniencia de estudiar la posibilidad de integrar ambas realidades. En concreto, y por la importancia que tiene para España, y en particular para Andalucía, en esta Tesis Doctoral se considera el caso particular de excedentes de fresa.

Para poder apreciar y valorar debidamente esta propuesta, de forma previa al trabajo experimental desarrollado, se ha realizado un “Trabajo de Revisión” en el que se aborda una profunda revisión de las principales propiedades, aplicaciones y métodos de producción del ácido y sus derivados, especialmente los biotecnológicos, actualizando revisiones previas de autores como Singh & Kumar (2007), Anastassiadis & Morgunov (2007), Ramachandran et al. (2006), Rogers et al. (2006), Roehr et al. (2001) y Milsom & Meers (1985). Todo ello, desde un enfoque práctico que mira constantemente hacia el desarrollo de tecnologías sostenibles, que pudiesen encontrar aplicación, especialmente, en área de la producción alimentaria.

En la Sección 1.2. de este Capítulo, se incluye una copia completa de este Trabajo, en el que se incluyen otros aspectos de interés no comentados en la *Introducción* de la memoria, como puede ser el empleo de microorganismos genéticamente modificados, especialmente bacterias acéticas, en la optimización de los procesos fermentativos existentes y en el desarrollo de otros nuevos.

Bibliografía

- Anastassiadis, S., Morgunov, I.G. (2007) Gluconic acid production, Recet Pat. 1, pp. 167-180.
- Milsom, P., Meers, J.L. (1985) Gluconic and itaconic acids, Comprehensive biotechnology: the principles, applications, and regulations of biotechnology in industry, agriculture, and medicine, vol. 3, Pergamon Press, Oxford, pp. 672-700.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C. (2006) Gluconic acid: properties, applications and microbial production, Food Technol. Biotechnol. 44, pp. 185–195.
- Rogers, P., Chen, J.S., Zidwick, M.J. (2006) Organic acids and solvent production, Part I: Acetic, lactic, gluconic succinic and polyhydroxyalkanoic acids, in: The prokaryotes, A handbook on the biology of bacteria, Third ed., vol 1: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology, Springer, New York, pp. 511–755.
- Roehr, M., Kubicek, C.P., Komínek, J.C. (2001) Gluconic acid, H.J. Rehm, G. Reed (Eds.) Biotechnology Set, Second ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 347–362.
- Singh, O.V., Kumar, R. (2007) Biotechnological production of gluconic acid: future implications, Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, pp. 713–722.

1.2. Copia de la aportación

Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Ehrenreich, A., Liebl, W., García-García, I. (2016) Gluconic acid: Properties, production methods and applications - An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization, *Process Biochemistry*, doi: 10.1016/j.procbio.2016.08.028.

2. Aportación 2 – Preparación del Inóculo

2.1. Breve descripción del trabajo

Tal y como se ha indicado en apartados previos, en el contexto del aprovechamiento y revalorización de recursos naturales y en concreto, de purés de fresa preparados a partir de excedentes de esta fruta, se ha trabajado en la posibilidad de elaborar un fermentado glucónico, resultado de la oxidación selectiva de glucosa a ácido glucónico en puré industrial de fresa. De esta forma, se obtiene un producto complejo, aromático y refrescante, que puede ser empleado como ingrediente o condimento en la elaboración de nuevos productos alimenticios.

La formación de ácido glucónico a partir de glucosa puede llevarse a cabo tanto mediante métodos químicos como biotecnológicos, sin embargo, lo últimos siguen siendo más adecuados desde un punto de vista económico y, en especial, cuando lo que se pretende es realizar esta transformación en un medio complejo como el que nos ocupa.

Aunque, de manera más o menos general, para esta biotransformación se emplean hongos, en concreto *A. niger*, los problemas de homogeneización y aireación que suelen presentar estos cultivos, así como el riesgo de formación de micotoxinas, hacen que se esté considerando el uso de otro tipo de microorganismos como, por ejemplo, es el caso de las bacterias acéticas.

Del conjunto de bacterias acéticas, *G. japonicus* CECT 8443 ha sido la especie seleccionada para llevar a cabo la biotransformación

buscada debido a su capacidad para, por un lado, consumir selectivamente glucosa en presencia de otras fuentes de carbono y, por otro, soportar condiciones extremas de pH. Sin embargo, el problema dista mucho de ser sólo una cuestión de selección del microorganismo, pues dada su versatilidad y dependiendo del tipo de cultivo y condiciones operativas que se establezcan para la fermentación, los resultados pueden ser muy distintos. Además, también hay que tener en cuenta la conocida dificultad que estas bacterias presentan para su cultivo en placa, selección y conservación, lo que puede dificultar el proceso de preparación de inóculos.

Asimismo, teniendo en cuenta el uso alimenticio que se persigue para el fermentado glucónico, es deseable que éste conserve, en la medida de lo posible, las propiedades sensoriales y antioxidantes de la fruta original. Esto hizo conveniente el empleo, como materia prima, de purés industrialmente pasteurizados en lugar de otras alternativas más drásticas, como puede ser la esterilización mediante calor o bien alguna alternativa química para conseguir esterilidad. En este sentido, la pasteurización reduce, de forma eficiente, la actividad de otros microorganismos presentes en el puré (levaduras principalmente), induciéndoles un estado de latencia reversible, que podrán abandonar siempre que se expongan a unas condiciones ambientales favorables para su crecimiento. Por lo tanto, la transformación que se pretende tendría que llevarse a cabo en el periodo de tiempo que va desde la inoculación de la bacteria hasta que las levaduras presentes en la materia prima se reactiven de forma importante y compitan con *G. japonicus* CECT 8443.

Por todo ello, la preparación del inóculo se convierte en una etapa clave para garantizar la actividad de la cepa inoculada en el puré de fresa y la prevalencia de ésta sobre otros microorganismos no deseados presentes en la materia prima.

En el presente trabajo, se ha estudiado, básicamente, el efecto de dos procedimientos diferentes en la preparación del inóculo de *G. japonicus* sobre el comportamiento de la fermentación. A partir de un cultivo conservado en placa a 4 °C, durante nunca más de un mes, el microorganismo se reactivaba siempre, en una primera fase, mediante su incubación en 125 mL de medio líquido GYP durante 24 h. A continuación, antes de continuar la incubación durante otras 24 h, o bien se añadían otros 125 mL del mismo medio, o bien se añadían 125 mL de puré estéril de fresa. De esta forma, se pretendía evaluar el efecto de precultivar a la bacteria en un medio muy parecido al que, posteriormente, se encontraría en el fermentador una vez se llevara a cabo la inoculación. Las condiciones experimentales investigadas se pueden resumir en los siguientes experimentos:

- **Experimento E1.** Preparación del inóculo: **24 h en medio GYP** seguidas de **24 h en medio GYP**. A continuación, el volumen total, 250 mL, se inoculaba en un fermentador con, aproximadamente, 3 L de puré **pasteurizado** de fresa.
- **Experimento E2.** Preparación del inóculo: **24 h en medio GYP** seguidas de **24 h en puré estéril de fresa**. A continuación, el volumen total, 250 mL, se inoculaba en un fermentador con, aproximadamente, 3 L de puré **pasteurizado** de fresa.

- **Experimento E3.** Preparación del inóculo: **24 h en medio GYP** seguidas de **24 h en puré estéril de fresa**. A continuación, el volumen total, 250 mL, se inoculaba en un fermentador con, aproximadamente, 3 L de puré **esterilizado** de fresa.
- **Experimento WI.** El fermentador, conteniendo 3 L de puré **pasteurizado** de fresa, **no se inoculó con bacterias**. Este sería un experimento que actuaría de blanco.

La medida de la evolución de las concentraciones de glucosa, fructosa, y ácido glucónico, así como la evolución celular, especialmente, la población de levaduras, han permitido comparar los resultados obtenidos para los diferentes experimentos. Para facilitar el estudio comparativo, los resultados se han ajustado a funciones sigmoidales que hacen posible evaluar la calidad estadística de las diferencias encontradas.

En el modo batch de cultivo empleado, sin control de pH, *G. japonicus* CECT 8443 ha demostrado poseer una capacidad altamente selectiva para oxidar el contenido original en glucosa del puré de fresa a ácido glucónico, conservando la fructosa del medio. En todos los casos, E1-E3, el consumo de glucosa ha demostrado ser simultáneo a la producción de ácido glucónico, lo que sugiere que la oxidación de glucosa ocurre mayoritariamente por la vía de oxidación directa, en el espacio periplasmático de la célula. Por último, aunque se obtuvieron mejores resultados cinéticos en aquellos casos en los que se emplearon inóculos de *G. japonicus* CECT 8443 previamente precultivados en fresa estéril, no se observaron diferencias

significativas al comparar los rendimientos aparentes obtenidos, el valor promedio fue $0,83 \pm 0,01$ g de ácido glucónico/g de glucosa.

Del mismo modo, la fermentación espontánea del puré pasteurizado sin inocular (experimento WI), puso de manifiesto la existencia de levaduras *Pichia kudriavzevii* y *Saccharomyces cerevisiae*, con capacidad para crecer y metabolizar la glucosa y fructosa contenida en el puré transcurridas las primeras 25 horas de fermentación. Aunque la presencia de estas especies también fue detectada en los experimentos en los que sí se emplearon inóculos de *G. japonicus* CECT 8443 (E1 y E2), no se observó crecimiento alguno antes de que la glucosa hubiera sido consumida por completo por parte de la bacteria. Un comportamiento que puede explicarse, en cierta medida, por los bajos valores de pH alcanzados como consecuencia de la acumulación de ácido glucónico en el medio.

En definitiva, este trabajo pone de manifiesto que es posible transformar selectivamente la glucosa contenida en el puré industrial pasteurizado de fresa, conservando otros azúcares como es la fructosa. Igualmente, si en la fase de preparación del inóculo puro de *G. japonicus* CECT 8443, se introduce una etapa de precultivo en fresa estéril, el resultado es un microorganismo plenamente activo y adaptado al medio que se pretende fermentar; de este modo, se consigue acelerar la biotransformación de la glucosa en ácido glucónico sin que el proceso se vea afectado por las levaduras presentes en el medio, las cuales necesitan más tiempo para que su actividad pueda ser considerada significativa en el proceso global.

Preparation of a pure inoculum of acetic acid bacteria for the selective conversion of glucose in strawberry purée into gluconic acid

Los resultados experimentales completos y una discusión más detallada se pueden encontrar en la Sección 2.2 de este Capítulo.

2.2. Copia de la aportación

Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., Jiménez-Hornero, J.E., García-García, I. (2015) Preparation of a pure inoculum of acetic acid bacteria for the selective conversion of glucose in strawberry purée into gluconic acid. *Food and Bioproducts Processing* 96, pp. 35-42.

3. Aportación 3 – Método indirecto para la estimación de parámetros cinéticos

3.1. Breve descripción del trabajo

El análisis y diseño de las etapas de biotransformación en procesos biológicos, requieren de información cinética sobre las reacciones que se llevan a cabo. Un término fundamental para evaluar diferentes aspectos del diseño de un biorreactor y de sus modos posibles de funcionamiento, es la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}). Este coeficiente cinético se evalúa, normalmente, a partir de datos experimentales de la evolución de la concentración celular; sin embargo, las peculiaridades que se dan en el sistema objeto de estudio en esta tesis, obligan a buscar otras alternativas para su estimación.

En efecto, por un lado, la complejidad del medio con el que se trabaja, puré de fresa con un alto contenido en sólidos en suspensión, hace muy difícil la obtención de datos fiables de concentración celular mediante técnicas de recuento directo al microscopio. En cualquier caso, el empleo de esta técnica conduce a valores promedio que, aunque parecen poner de manifiesto el crecimiento de las bacterias tras su inoculación, llevan asociadas desviaciones estándar demasiado altas para ser aceptables. Por otro lado, si se considerara la posibilidad de llevar a cabo siembras, en medios sólidos con agar, para obtener una estimación sobre la evolución celular a lo largo del tiempo, nos encontramos con las bien conocidas dificultades para el cultivo en

placa de este tipo de bacterias, lo que hace también muy difícil su seguimiento mediante este procedimiento.

Por lo tanto, y antes de considerar técnicas mucho más complejas, se consideró la posibilidad de desarrollar un método sencillo, que no necesitara del conocimiento de la evolución de la concentración celular, para la estimación de μ_{max} e incluso del rendimiento aparente del proceso ($Y_{X/G}$), para el crecimiento de *G. japonicus* CECT 8443 en puré de fresa industrialmente pasteurizado. El método emplearía datos experimentales mucho más fiables como son los correspondientes a la evolución de la concentración de glucosa.

En concreto, la combinación de los balances de glucosa y células, para la fase exponencial de crecimiento, permite obtener la siguiente ecuación:

$$G - G_i = \frac{X_{Vi}}{Y_{X/G}} (1 - e^{\mu_{max} \cdot t})$$

donde G representa la concentración de glucosa; G_i la concentración inicial de glucosa; X_{Vi} , la concentración inicial de células; $Y_{X/G}$, el rendimiento aparente de células en base a glucosa; y t , el tiempo. El ajuste de esta ecuación a los datos experimentales de G y t , sólo durante la fase exponencial, permitiría obtener una estimación de μ_{max} . Del mismo modo, conocida la concentración inicial de células, X_{Vi} , sería posible la estimación de $Y_{X/G}$.

La justificación de esta propuesta requiere tener en cuenta el complejo metabolismo de *G. japonicus* y, establecer para qué

condiciones y fase de crecimiento de un cultivo batch de la bacteria podría aplicarse dicha ecuación.

Al igual que muchas otras bacterias acéticas, tal y como se indicó en la Figura I.4 de la Introducción y se ha comentado en diversos lugares de esta memoria, *G. japonicus* puede usar la glucosa a través de varias vías dependiendo de las condiciones de cultivo. En general, si el medio dispone de una concentración relativamente alta de glucosa, un porcentaje muy alto de ésta es encauzado hacia el periplasma de la célula en donde se somete a una oxidación incompleta *overflow metabolism* que conduce a la acumulación transitoria o permanente de gluconato en el medio. Por el contrario, si la concentración inicial de glucosa en el medio es baja, ésta es dirigida al citoplasma donde se asimila por la célula. Todo esto no es sino una sofisticada estrategia de estos microorganismos para competir con otros cuando se encuentran en un medio de cultivo rico en nutrientes; la rápida formación de ácido glucónico, no sólo elimina glucosa del medio sino que provoca una bajada importante del pH que genera un entorno muy hostil para microorganismos no resistentes a la acidez del medio.

Lógicamente, si el objetivo es la producción de ácido glucónico, interesa incentivar la vía del *overflow metabolism*, en detrimento de la asimilativa, al tiempo que el ácido glucónico formado no sufra ulteriores transformaciones, por ejemplo, hacia la formación de cetoácidos, ni que sea asimilado por la bacteria (véase Figura I.4).

Pues bien, las condiciones prevalentes durante nuestra biotransformación (bajos pHs y niveles de glucosa superiores a 0,9-2,7 g·L⁻¹ durante la mayor parte del proceso), consiguen favorecer la

formación del ácido glucónico e inhibir, en gran medida, la ruta de las pentosas fosfato (vía asimilativa), evitando que la cantidad de glucosa que se metaboliza con fines anabólicos sea muy importante.

Además de todo lo indicado, para la aplicación del método propuesto es necesario que se cumpla que:

- La bacteria no consuma fructosa, por lo tanto, sólo la glucosa es usada durante el periodo en consideración.
- Exista una clara asociación entre crecimiento celular y consumo total de glucosa. Obteniéndose un valor constante del rendimiento celular en base a glucosa.
- No se produzca formación de cetoácidos.
- Se obtenga un rendimiento constante de ácido glucónico en base a glucosa.
- La relación entre el flujo de glucosa usada en la vía del “*overflow metabolism*” y el de la consumida en la vía asimilativa, debe permanecer constante.

Antes de aplicar el método a la fermentación del puré de fresa, se validó utilizando trabajos publicados por otros autores, en los que se estudiaron microorganismos similares en medio sintéticos y en los que sí se disponía de datos de concentración celular durante el proceso. Los microorganismos estudiados fueron: *G. oxydans* ATCC 621H y NBIMCC1043, *G. suboxydans* IFO 12528, y *A. diazotrophicus* ATCC 49037; incluso se ha considerado una bacteria no acética como es *E. coli* W 3110. De este modo, se pudieron comparar los valores de μ_{max} calculados en dichos trabajos con los estimados mediante el método propuesto: la coincidencia fue total.

Aplicado el método al cultivo de *G. japonicus* CECT 8443 en puré pasteurizado de fresa, se estimó un valor de μ_{max} de $0,22 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ y de $1,25 \cdot 10^{10} \pm 0,63 \cdot 10^{10}$ células $\cdot \text{g}_G^{-1}$ glucosa para $Y_{X/G}$; la alta desviación estándar obtenida para $Y_{X/G}$ se debe, fundamentalmente, al error asociado a la medida experimental de X_{Vi} .

En la Sección 3.2 de este Capítulo, se incluye una copia completa del artículo en el que se puede encontrar una justificación y discusión más amplia, los resultados experimentales, así como, el acceso online a material auxiliar en el que se detalla parte de la metodología empleada.

3.2. Copia de la aportación

Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., García-García, I. (2016) An approach for estimating the maximum specific growth rate of some bacteria in complex media without cell concentration data. An example: *Gluconobacter japonicus* growing in strawberry purée. *Biochemical Engineering Journal* 105, pp. 314-320.

4. Aportación 4 – Efecto de la concentración de sustrato sobre la estabilidad del producto

4.1. Breve descripción del trabajo

Como ya se ha comentado en diferentes secciones previas de esta memoria, el metabolismo de la glucosa por parte de bacterias acéticas, y en particular por *Gluconobacter*, puede conducir a productos diferentes dependiendo de las condiciones prevalentes en el medio de cultivo durante la fermentación.

En concreto, si existe un medio rico, susceptible de ser utilizado por otros microorganismos, la bacteria acética expresa, de forma preferente, una vía de oxidación incompleta que transforma la glucosa en ácido glucónico y cetoácidos. Estas transformaciones son llevadas a cabo en la zona periplasmática mediante un conjunto de enzimas deshidrogenasas ligadas a la pared externa de la membrana citoplasmática. Los ácidos formados de esta forma pueden, en una fase posterior, ser asimilados tranquilamente sin tener que preocuparse de una competencia por parte de otros microorganismos, dado que pocos son capaces de desarrollarse en el entorno tan hostil resultante tras la primera fase. La transformación de glucosa en ácido glucónico/cetogluconatos es casi estequiométrica, al menos, una pequeña parte de la glucosa tiene que ser utilizada por la bacteria para mantenerse y dar lugar a un mínimo crecimiento mientras que lleva a cabo la actividad descrita. Por el contrario, si el medio es, inicialmente, pobre en glucosa, la bacteria no puede permitirse el lujo de generar un almacén de nutrientes en la forma de gluconato/cetogluconatos, a salvo de otros microorganismos, para su consumo posterior, sino que

tiene que, directamente, asimilar la poca glucosa disponible en el medio; en este caso, no se formará ácido glucónico ni, por supuesto, cetogluconatos.

Como también ha sido comentado previamente en la memoria, la actividad metabólica de ambas rutas parece estar fuertemente influenciada por las condiciones de pH y las concentraciones de glucosa, calcio y oxígeno disueltos disponibles en el medio de cultivo. Por ejemplo, en especies *G. oxydans*, se ha demostrado, cómo medios ácidos, con pH inferiores a 3,5, o concentraciones moderadas de sustrato, superiores a 5-15 mM, favorecen la inhibición de la vía de las pentosas fosfato (vía asimilativa).

Pues bien, si se pretendiera la transformación de la glucosa en ácido glucónico, de la forma más eficiente posible, todo lo anterior sugiere la conveniencia de establecer, desde el comienzo de la fermentación, unas condiciones operacionales que predispongan a *G. japonicus* CECT 8443 a generar, como producto final, ácido glucónico. De todas las variables mencionadas, la experiencia con *G. oxydans* indica que el pH y la concentración de glucosa ejercen una influencia especialmente importante, por lo tanto, se debería trabajar sin control de pH y con purés de fresa con una concentración de glucosa por encima del rango mencionado.

En definitiva, la disponibilidad de purés industriales de fresa con distinto grado de concentración, la posibilidad de enriquecimiento en azúcares empleando otros suplementos de origen natural, y la influencia particular que estos aspectos pudieran tener en la estabilidad del producto final, ha llevado a estudiar, de forma

específica, el efecto de la concentración inicial de glucosa sobre la estabilidad del ácido glucónico en el fermentado final.

Para ello, se ha comparado la fermentación de puré de fresa (SP) y de puré de fresa enriquecido (ESP), con un contenido inicial de azúcares de 34 y 135-140 g·L⁻¹, respectivamente. Trabajando en modo batch, sin control de pH, la oxidación de glucosa a ácido glucónico tuvo lugar, en ambos casos, con un rendimiento de 0,88-0,90 g de ácido glucónico·g de glucosa⁻¹, no obstante, sólo en el caso en el que el puré de fresa fue enriquecido con azúcares, el ácido glucónico formado se mantuvo estable a lo largo del ciclo. Por el contrario, al emplear puré de fresa sin azúcares añadidos, una vez se ha agotado casi por completo la glucosa, el ácido glucónico es transformado en cetoácidos, para, a continuación, iniciar la asimilación de éstos.

Por otro lado, dado que se ha de trabajar, preferiblemente, con puré de fresa industrialmente pasteurizado, la presencia inevitable de levaduras dio lugar al consumo de fructosa. En cualquier caso, este consumo no comenzó a ser significativo hasta pasadas las primeras 20-30 horas de fermentación; tiempo necesario para que las levaduras resistentes al tratamiento previo de pasteurización del puré, identificadas en la Sección 2.2 de este Capítulo como *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae*, puedan reactivarse.

Los resultados experimentales y una discusión más detallada del problema, haciendo referencia a otras variables como la concentración de calcio y de oxígeno disuelto, pueden encontrarse en la Sección 4.2. de este Capítulo en la que presenta una copia completa del artículo.

4.2. Copia de la aportación

Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., García-García, I. (2016) Revalorization of strawberry surpluses by bio-transforming its glucose content into gluconic acid. *Food and Bioproducts Processing* 99, pp. 188-196.



Capítulo IV
CONCLUSIONES
GENERALES

En el contexto de una investigación más amplia sobre el aprovechamiento de excedentes de frutas, en concreto, de fresa, en esta Tesis se ha abordado el estudio de algunos aspectos claves para el desarrollo de procesos fermentativos que permitieran la obtención de un fermentado glucónico a partir de puré pasteurizado de fresa. Se pretendía conseguir la oxidación selectiva de la glucosa a ácido glucónico al mismo tiempo que se mantuviera el contenido en fructosa y se garantizara la estabilidad de ácido obtenido. Para la biotransformación, se emplearía una bacteria acética, *Gluconobacter japonicus* CECT 8443.

Los aspectos estudiados han venido condicionados, en gran medida, por el hecho de tener que trabajar con un medio natural complejo, con alto contenido en sólidos en suspensión y la presencia de levaduras, que aunque el medio fue previamente pasteurizado, tienen la capacidad de reactivarse si las condiciones ambientales lo favorecen. En concreto, trabajando siempre a escala de laboratorio, se hizo necesario:

1º.- Estudiar la preparación del inóculo de *G. japonicus* CECT 8443 que garantizara su imposición frente a la posible actividad de levaduras.

2º.- Las dificultades para conseguir el crecimiento en placa de *G. japonicus* CECT 8443 así como la presencia de sólidos en suspensión en el medio, hizo también necesario estudiar la posibilidad de evaluar, de forma indirecta, parámetros cinéticos fundamentales para el diseño de los correspondientes biorreactores.

3°.- Dada la complejidad del metabolismo de la bacteria y su capacidad para seguir transformando el ácido glucónico, se estudió el efecto de la disponibilidad de sustrato sobre la estabilidad del ácido obtenido.

Las conclusiones más destacadas de la investigación, organizadas según el artículo a partir del cual se obtienen, se recogen a continuación:

Conclusiones obtenidas del artículo *Preparation of a pure inoculum of acetic acid bacteria for the selective conversion of glucose in strawberry purée into gluconic acid. Food and bioproducts processing 96 (2015) 35–42:*

- 1) Un cultivo de *G. japonicus* CECT 8443 en puré pasteurizado de fresa es capaz de llevar a cabo, de forma selectiva, la biotransformación de glucosa en ácido glucónico. La biotransformación se consigue con un rendimiento aparente del orden de 0,79-0,90 g de ácido glucónico·g de glucosa⁻¹.
- 2) El empleo de puré de fresa pasteurizado, en lugar de puré esterilizado, implica la presencia no deseada de levaduras, fundamentalmente *Pichia kudriavzevii* y en menor extensión *Saccharomyces cerevisiae*, que tras unas 22 h desde el inicio de la fermentación comienzan a tener una presencia y actividad importantes consumiendo la fructosa disponible en el medio.

- 3) Para lograr un cultivo de *G. japonicus* CECT 8843 plenamente activo y adaptado al puré de fresa, la preparación del inóculo ha de incorporar dos etapas: en la primera se cultiva el microorganismo en medio GYP durante 24 h y en la segunda, a todo el medio resultante de la primera etapa se le añade un volumen igual de puré esterilizado de fresa y se cultiva durante otras 24 h.

Conclusiones obtenidas del artículo *An approach for estimating the maximum specific growth rate of Gluconobacter japonicus in strawberry purée without cell concentration. Biochemical Engineering Journal 105 (2016) 314–320*:

- 4) El ajuste de la siguiente ecuación a los datos experimentales de glucosa (G) y tiempo (t), sólo durante la fase exponencial, permite obtener una estimación de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) de *G. japonicus* sobre puré de fresa. Del mismo modo, conocida la concentración inicial de células, X_{Vi} , sería posible la estimación del rendimiento de células en base a glucosa, $Y_{X/G}$.

$$G - G_i = \frac{X_{Vi}}{Y_{X/G}} (1 - e^{-\mu_{max} \cdot t})$$

donde G_i representa la concentración inicial de glucosa. Para la aplicación de la ecuación propuesta, es necesario que se cumpla que:

- 4.1) La bacteria no consuma fructosa, por lo tanto, sólo la glucosa es usada durante el periodo en consideración.
 - 4.2) Exista una clara asociación entre crecimiento celular y consumo total de glucosa, obteniéndose un valor constante del rendimiento celular en base a glucosa.
 - 4.3) No se produzca formación de cetoácidos.
 - 4.4) Se obtenga un rendimiento constante de ácido glucónico en base a glucosa.
 - 4.5) La relación entre el flujo de glucosa usada en la vía del *overflow metabolism* y el de la consumida en la vía asimilativa, debe permanecer constante.
- 5) El método propuesto, en la conclusión 4^a, ha sido validado utilizando datos experimentales de otros autores y microorganismos similares para los que sí se dispone de información sobre la concentración celular a lo largo del proceso. En concreto se ha aplicado a cultivos, sobre medios sintéticos, de *G. oxydans* ATCC 621H, NBIMCC1043, *G. suboxydans* IFO 12528 y *A. diazotrophicus* ATCC 49037; incluso, se ha validado con una bacteria no acética: *E. coli* W 3110.
- 6) La aplicación del método propuesto en la conclusión 4^a a un cultivo de *G. japonicus* CECT 8443 en puré pasteurizado de fresa permitió estimar:

- 6.1) Un valor de $0,22 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$, para la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}).
- 6.2) Un valor de $1,25 \cdot 10^{10} \pm 0,63 \cdot 10^{10}$ células·g de glucosa⁻¹, para el rendimiento de células en base a glucosa ($Y_{X/G}$).
- 6.3) Finalmente, aunque no es identificable en la práctica, sí se puede indicar que el coeficiente de Monod, K_s , tiene un valor igual o menor a 1 g de glucosa·L⁻¹.

Conclusiones obtenidas del artículo *Revalorization of strawberry surpluses by bio-transforming its glucose content into gluconic acid. Food and bioproducts processing 99 (2016) 188–196:*

- 7) La estabilidad del ácido glucónico formado en un cultivo de *G. japonicus* CECT 8443 en puré pasteurizado de fresa, sin control de pH, es, aparentemente, muy dependiente de la concentración inicial de glucosa en el medio. Se han estudiado dos casos:
 - 7.1) Si se trabaja con puré de fresa sin azúcares añadidos (SP), en el que la concentración de glucosa más fructosa es de unos $34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (la mitad de cada una), el ácido glucónico comienza a ser transformado una vez se consume la glucosa del medio y desaparece por completo a las 70 h aproximadamente.

- 7.2) Por el contrario, en el caso en el que el puré de fresa fue enriquecido con azúcares añadidos (ESP), hasta alcanzar una concentración 135-140 g·L⁻¹, la concentración de ácido glucónico se mantiene constante a partir de, aproximadamente, las 17 h, momento en el que se alcanza su concentración máxima.
- 8) Los resultados de la conclusión 7^a parecen ser, en gran medida, la consecuencia de la evolución natural del pH cuando no se controla éste. A medida que es mayor la concentración inicial de glucosa, mayor será la concentración máxima de ácido glucónico que puede obtenerse y menor el valor de pH. En el caso SP, el pH mínimo alcanzado fue de, aproximadamente, 2,8 mientras que en el caso ESP fue de 2,4.
- 9) La evolución del pH y de la acidez total del medio en el caso SP sugieren la existencia de tres fases diferenciadas:
- 9.1) En una primera fase, que dura hasta que la glucosa se consume por completo, a las 10 h aproximadamente, se produce una rápida acumulación de ácido glucónico, un aumento de la acidez total y una bajada del pH.
- 9.2) Durante la segunda fase, hasta las 40 h aproximadamente, el ácido glucónico se va transformando en cetoácidos, lo que explica el mantenimiento del pH y de la acidez total.

- 9.3) Finalmente, cuando la concentración de ácido glucónico es ya muy baja, se inicia una etapa final que implica la asimilación de los cetoácidos y restos de ácido glucónico. Esto sería coherente con la disminución de la acidez total e incremento de pH observados durante esta fase.
- 10) En el experimento ESP, el pH es tan bajo (2,4) y la acidez tan alta (aproximadamente $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) que se inhibe, prácticamente, la actividad de la bacteria, manteniéndose constante la concentración del ácido glucónico producido, la acidez total y el pH.
- 11) Finalmente, desde un punto de vista práctico, para la obtención de un producto final en el que se pueda alcanzar la máxima concentración posible de ácido glucónico y diferentes niveles de fructosa, será necesario controlar el tiempo de fermentación. Si la concentración inicial de glucosa es baja, el proceso debe detenerse tan pronto como se consuma la glucosa, por el contrario, si la concentración inicial de glucosa es alta, el glucónico producido es estable. Sin embargo, si además se desea que el producto final tenga un contenido determinado en fructosa, es necesario tener en cuenta también el consumo que se produce de ésta (preferentemente por levaduras) a partir de, aproximadamente, 20-30 h desde el comienzo del ciclo.



Anexo I

MATERIALES

Y MÉTODOS

GENERALES

En este Anexo se describen los métodos analíticos utilizados para la caracterización de la materia prima y del producto obtenido, así como el equipo experimental, modo de trabajo y solución específica desarrollada para el seguimiento del proceso.

1. Materia prima

Se ha utilizado un puré de fresa comercial de la zona de Huelva (España), producido y suministrado por la empresa HUDISA, Desarrollo Industrial S.A. (Lepe, España) (Hudisa, 2016). El puré ha sido industrialmente pasteurizado a 92 °C durante 90-120 s y, posteriormente, almacenado, en condiciones asépticas, a 0-4 °C. La empresa elabora purés con distintos grados de concentración mediante evaporación a baja presión; de esta forma, se logran productos con una composición en azúcares que oscila entre los 30 y 120 g·L⁻¹ (en una proporción aproximada 50 % glucosa y 50 % fructosa).

Adicionalmente, en aquellos estudios en los que ha sido necesario enriquecer el contenido en azúcares del sustrato, se ha añadido mosto concentrado rectificado de uva, producido por Concentrados Pallejá S.L. (Tarragona, España) (Concentrados Pallejá, 2016), con una concentración de azúcares de 135-450 g·L⁻¹ (de nuevo, en una proporción aproximada 50 % glucosa y 50 % fructosa)

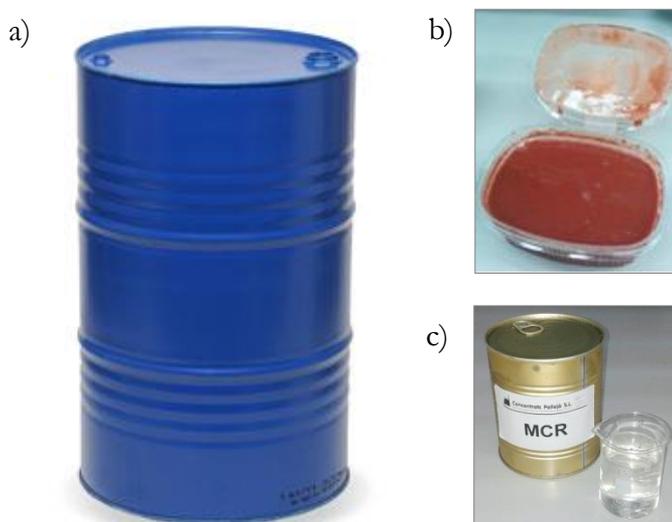


Figura AI.1. Materia prima empleada en los diferentes experimentos. **a)** Bidón de 200 kg de fresa procedente de Hudisa, Desarrollo Industrial S.A., **b)** Puré de fresa sin concentrar, **c)** Mosto de uva concentrado y rectificado procedente de Concentrados Pallejá S.L.

2. Microorganismos

La cepa de *G. japonicus* CECT 8443 empleada ha sido suministrada por el grupo de investigación de Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España). Esta cepa fue aislada inicialmente en mosto de uva, procedente de la bodega experimental de Mas dels Frares (Constantí, Tarragona, España) (Navarro, 2011). Estudios previos, realizados con distintas especies *Gluconobacter* y *Acetobacter*, han puesto de manifiesto la capacidad de esta cepa para la conversión selectiva de glucosa a ácido glucónico, en medios sintéticos conteniendo también otros azúcares, como fructosa (Navarro, 2011; Navarro et al., 2013; Sainz et al., 2016).

2.1. Mantenimiento del cultivo

G. japonicus CECT 8443 se ha mantenido almacenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una disolución de glicerol al 50 % (v/v), como agente crioprotector.

Para ello, el cultivo de *G. japonicus* CECT 8443, inicialmente sembrado en tubos con agar inclinado, se inocula en 125 mL de medio líquido GY [40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa y 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de levadura], previamente esterilizado en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min, y se incuba en agitador orbital con control de temperatura, a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 150 rpm, durante 24 h. Transcurrido este tiempo, en criotubos estériles, y con ayuda de una pipeta semiautomática de volumen variable, se adicionan 80 μL de inóculo líquido de *G. japonicus* CECT 8443 y 20 μL de una disolución de glicerol al 50 % (v/v). Una vez se ha homogenizado suavemente la mezcla, el criotubo, herméticamente cerrado, se congela a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta ser usado.

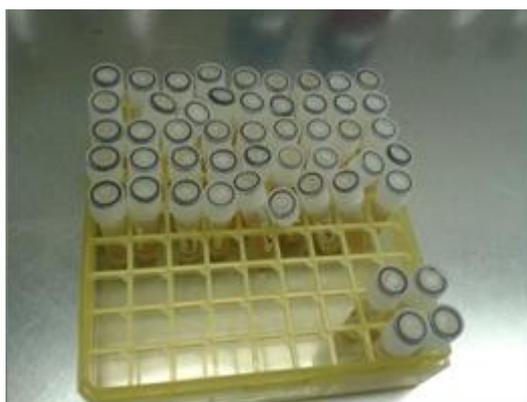


Figura AI.2. Criotubos de *G. japonicus* CECT 8443 almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el laboratorio.

2.2. Reactivación del cultivo

El almacenamiento de *G. japonicus* CECT 8443 a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hace necesario la reactivación del microorganismo, de forma previa, a la preparación del inóculo.

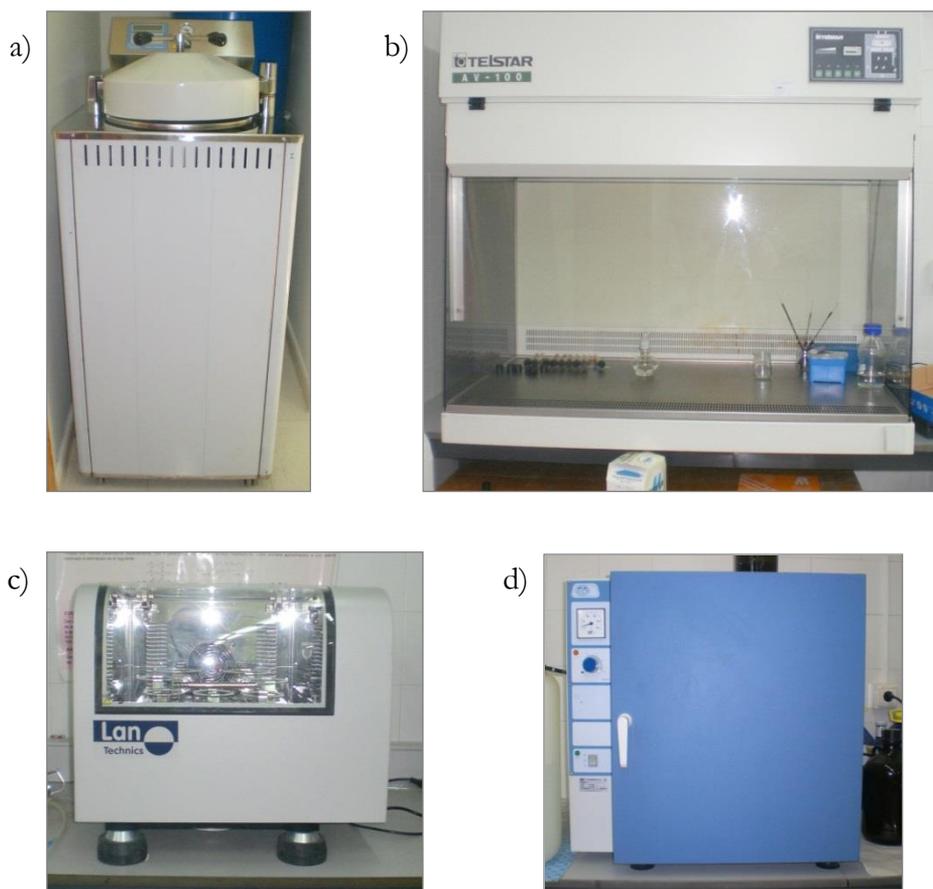


Figura AI.3. Dispositivos empleados en el mantenimiento y reactivación del cultivo de *G. japonicus* CECT 8443, y la preparación del inóculo. **a)** Autoclave RAYPA, modelo Stericlav-S 110L, empleada en la esterilización de material y medios, **b)** Campana de flujo laminar TELSTAR, modelo AV-100, empleada en la siembra de cultivos, **c)** Agitador orbital LAN TECHNICS con control de temperatura, empleado para la incubación de cultivos en medio líquido, **d)** Estufa bacteriológica SELECTA, modelo Desec 50x40x40, empleado en la incubación de cultivos en medio sólido.

Esta reactivación se logra mediante la descongelación y posterior siembra, del contenido del criotubo, en 125 mL de medio líquido GYP [50 g·L⁻¹ de glucosa, 10 g·L⁻¹ de extracto de levadura y 20 g·L⁻¹ de peptona bacteriológica], esterilizado bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Tras 24 h de incubación en agitador orbital con control de temperatura, a 29 °C y 150 rpm, el cultivo se siembra en tubos con medio sólido GY agar inclinado [50 g·L⁻¹ de glucosa, 10 g·L⁻¹ de extracto de levadura y 30 g·L⁻¹ de agar] estériles. Tras una segunda etapa de incubación, de 24-36 h de duración, en estufa bacteriológica a una temperatura de 30 °C, el cultivo alcanza las condiciones adecuadas para proceder a la preparación del inóculo.

2.3. Preparación del inóculo

El inóculo de *G. japonicus* CECT 8443 se ha obtenido mediante una primera siembra y cultivo en 125 mL de medio líquido GYP estéril. Tras 24 h de incubación en un agitador orbital con control de temperatura, a 29 °C y 150 rpm, se han adicionado al medio de cultivo, dependiendo del experimento considerado en la Sección 2.2 del Capítulo III, 125 mL de puré de fresa o medio líquido GYP, previamente esterilizado en autoclave. Transcurridas 24 h adicionales de incubación en el agitador orbital, el cultivo de bacterias acéticas alcanza las condiciones adecuadas para inocular el fermentador.

En cualquier caso, tras comprobar en la Sección 2.2 del Capítulo III cómo la etapa de precultivo en fresa estéril favorece la plena actividad y adaptación de *G. japonicus* CECT 8443 al medio fermentativo, se ha adoptado este procedimiento como método de preparación del inóculo para el resto de estudios realizados (Sección 3.2 y 4.2 del Capítulo III).

3. Sistema experimental

La pieza central del sistema experimental empleado ha consistido en un biorreactor Biostat®-Aplus de tanque agitado, diseñado para el desarrollo de fermentaciones microbiológicas a escala de laboratorio (Sartorius Stedim Biotech, 2016). El dispositivo incorpora una unidad principal, dotada con todas las características y funciones necesarias para el registro y control del proceso: módulos de aireación y agitación, sistema de control de temperatura, bombas peristálticas para el suministro automatizado de agentes neutralizadores y antiespuma, y conexión a los sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto.

De este modo, el biorreactor dispone de todo el equipamiento necesario para llevar a cabo el control y seguimiento de la fermentación glucónica de forma autónoma, fijando las condiciones de trabajo mediante su programación previa en el ordenador correspondiente.

Todos los procesos de fermentación glucónica estudiados han sido desarrollados en modo discontinuo, estableciendo siempre las mismas condiciones operacionales:

Tabla AI.1. Variables operacionales establecidas y/o controladas en este trabajo de investigación.

Variable operacional	Valor establecido
Volumen de inóculo	250 mL
Volumen de sustrato	3 L
Velocidad de agitación	250 rpm
Temperatura	29 °C
Porcentaje de oxígeno disuelto	20 %
pH	No controlado

La Figura AI.4. muestra el montaje experimental utilizado para la realización de experimentos, compuesto por el reactor biológico, distintos elementos de trabajo y control, y el software necesario para el registro y adquisición de datos. A continuación, se describirá de forma individual cada equipo.



Figura AI.4. Dispositivo experimental empleado en el laboratorio.

3.1. Reactor biológico

El reactor empleado ha consistido en un tanque cilíndrico de borosilicato UniVessel®, con una capacidad efectiva de 5 L (capacidad total de 6,6 L), provisto, en su parte superior, de una tapa de acero inoxidable que permite el cierre hermético del sistema.

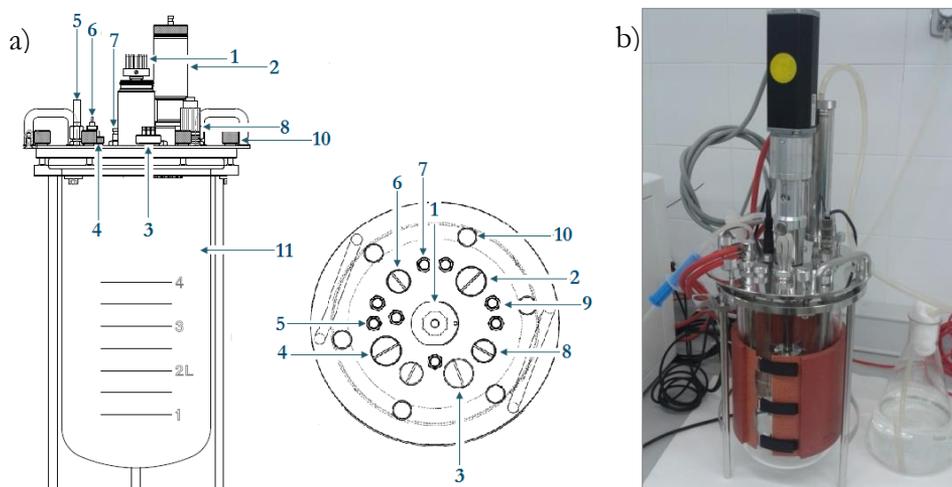


Figura AI.5. Reactor de tanque agitado. **a)** Diseño y equipamiento: (1) Motor, (2) Condensador, (3) Carga/descarga de medio, (4) Dedo frío, (5) Toma de muestra, (6) Sonda de pH, (7) Entrada de aire, (8) Sonda de O₂, (9) Sonda de temperatura, (10) Tornillos de fijación, (11) Vaso del fermentador. **b)** Vista del montaje real.

Los elementos de trabajo necesarios para llevar a cabo el estudio, se incorporan al sistema a través de los orificios y conectores disponibles en la tapa superior del tanque, y se concretan en los sistemas de aireación, agitación y termostatación, así como en los dispositivos de adición, extracción y control.

3.2. Sistema de aireación

Un sistema centralizado de aire a presión y un filtro de membrana de politetrafluoroetileno de 0,2 μm (Millex-FG₅₀, 50 mm \varnothing , Millipore) aportan el aire estéril necesario para el proceso desde un tubo anular ubicado en la parte inferior del fermentador, cerca de las paletas de agitación, para que éstas se encarguen de su distribución. El caudal de aire se ajusta con una válvula y un rotámetro ubicados en la unidad principal de control.

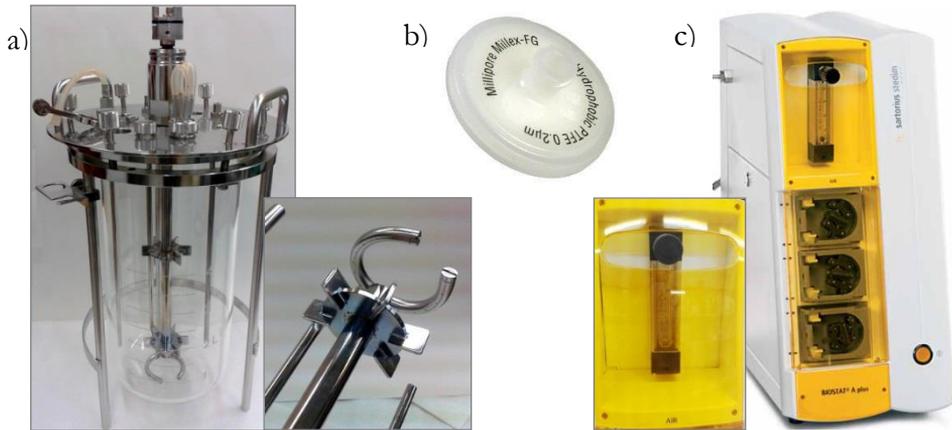


Figura AI.6. Elementos del sistema de aireación. **a)** Tubo anular borboteador, **b)** Filtro de membrana Millex-FG₅₀, **c)** Válvula y rotámetro para regular el caudal de entrada de aire.

3.3. Sistema de agitación

El sistema de agitación está compuesto, fundamentalmente, por el motor de 120 W, fijado en la parte superior de la tapa, y el eje de agitación de acero inoxidable con dos impulsores de disco de seis palas (64 mm Ø). El flujo radial que genera, aumenta la transferencia del oxígeno al disminuir el tamaño de las burbujas que introduce el sistema de aireación, a la vez que favorece el mezclado del medio fermentativo. La velocidad de agitación se puede regular automáticamente.

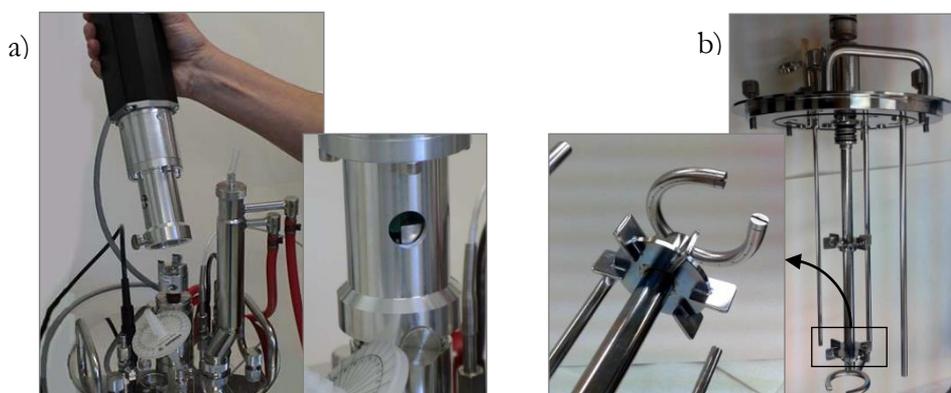


Figura AI.7. Elementos del sistema de agitación. **a)** Fijación del motor de agitación a la tapa del fermentador, **b)** Eje de agitación e impulsor de disco de seis palas.

3.4. Sistema de termostatación e intercambio de calor.

Para regular la temperatura del medio, el biorreactor dispone de una manta calefactora, que rodea la pared externa del tanque, y un condensador de dedo frío de acero inoxidable que se sumerge en el medio. Por otro lado, se dispone de un cambiador de calor para la condensación parcial de los gases de escape. Ambos sistemas, ensamblados a la tapa superior del tanque, están conectados a un baño termostático de agua a 4 °C, dotado de una bomba de recirculación. El sistema de transferencia de calor, compuesto por la manta calefactora y el condensador de dedo frío, está conectado al sistema de control de temperatura de la unidad de principal.

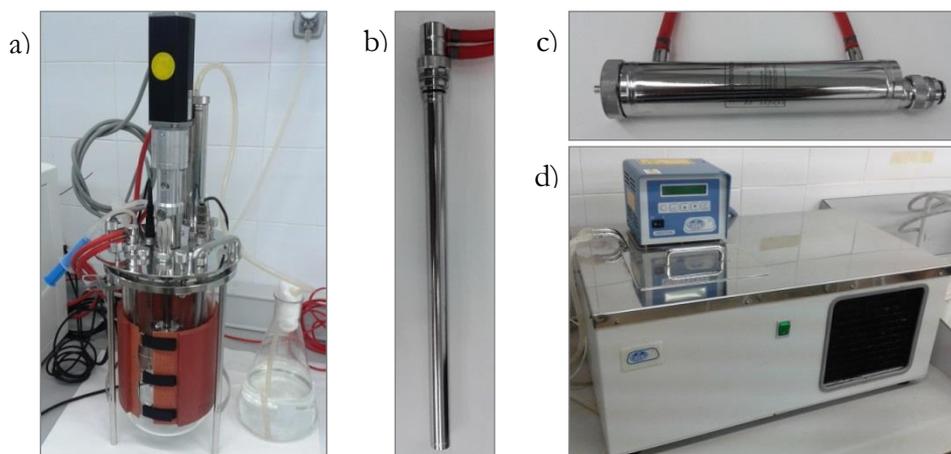


Figura AI.8. Elementos del sistema de termostatización e intercambio de calor. **a)** Vista general del sistema, **b)** Dedo frío, **c)** Condensador de gases de escape, **d)** Baño termostático SELECTA, modelo FRIGITERM-10.

El condensador de gases de escape evita/reduce la pérdida de compuestos volátiles, y está conectado, a su vez, a un sistema de borboteo en agua estéril, para evitar problemas de sobrepresión derivados de los gases generados en la fermentación y que no exista riesgo de contaminación ambiental.

3.5. Dispositivos de adición, extracción y control

Los dispositivos de adición y extracción permiten la adición del medio de cultivo y los microorganismos, así como la toma de muestras del medio fermentativo. Los dispositivos de control son, fundamentalmente, sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Todos ellos se fijan a la tapa del fermentador, debiendo estar correctamente sellados para evitar problemas de contaminación.

3.5.1. Dispositivos de adición y extracción del medio

La carga del sustrato y descarga del medio fermentado se ha llevado a cabo mediante un sistema de gomas estériles y bombas peristálticas Ismatec (modelo ISM 912C) (Ismatec, 2016). Por su parte, la inoculación se ha realizado manualmente haciendo uso de un embudo estéril colocado en uno de los orificios de la tapa del tanque.

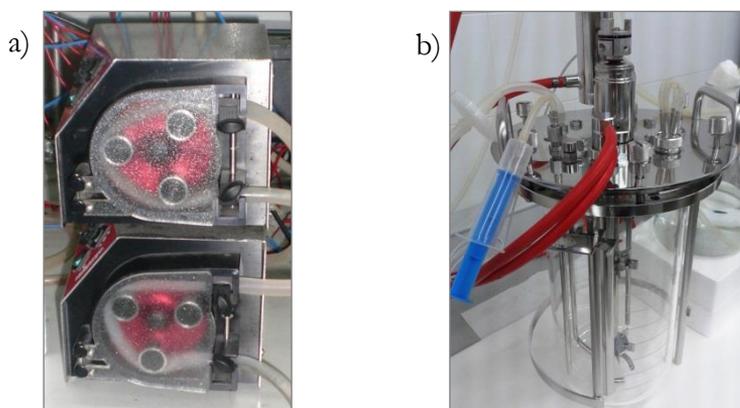


Figura AI.9. Dispositivos de adición y extracción. **a)** Bombas peristálticas empleadas en la carga y descarga de medio fermentativo, **b)** Jeringa de émbolo conectada al sistema para la extracción de muestra.

Para la toma de muestra, el biorreactor dispone de un tubo de acero inoxidable paralelo al eje de agitación que, conectado en su parte superior a una jeringa de émbolo estéril, ha permitido extraer, por succión, muestras del tanque.

3.5.2. Dispositivos de control

3.5.2.1. Sonda de pH

El pH del medio se mide mediante un electrodo combinado de pH HAMILTON de Ag/AgCl, con KCl-gel como electrodo de referencia, (modelo EASYFERM PLUS K8 325) (Hamilton, 2016), cuyo rango de medida varía entre 0 y 14 unidades de pH. La sonda soporta

temperaturas de hasta 135 °C, y presiones de hasta 6 bares (a 25 °C). La calibración se realiza a través de un sensor digital, utilizando disoluciones tampón HAMILTON DURACAL.

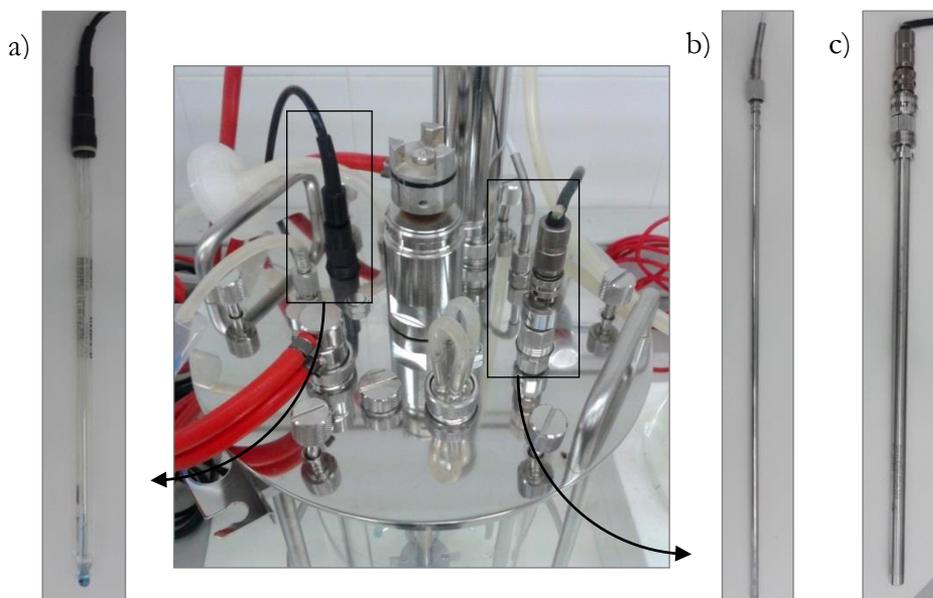


Figura AI.10. Dispositivos de control. **a)** Sonda de pH, **b)** Sensor de temperatura, **c)** Sonda de oxígeno disuelto.

3.5.2.2. Sensor de temperatura

La medida de la temperatura se lleva a cabo haciendo uso de una sensor de temperatura Pt-100 (Typ, 300-4) fabricado en acero inoxidable, sumergido en el seno del medio fermentativo. Esta sonda no precisa calibración.

3.5.2.3. Sensor de oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto en el medio se mide mediante un electrodo de O₂ esterilizable HAMILTON (modelo OXYFERM™ FDA 325) (Hamilton, 2016), compuesto por un ánodo de Ag y un cátodo de Pt

conectados conductivamente mediante una disolución electrolítica alcalina, que, además, forma una fina capa de electrolito sobre la membrana polimérica permeable a O₂ gaseoso (sensor amperométrico de CLARK). La sonda posee un rango de medida varía entre 0 % y 100 % de saturación de oxígeno, soportando temperaturas de hasta 130 °C, y presiones de hasta 4 bares (a 25 °C). La calibración se realiza a través de un sensor digital, determinando los parámetros de corriente cero y de pendiente del sensor, para lo que se utiliza un medio acuoso libre de oxígeno y otro saturado de aire, respectivamente.

3.6. Software

El elemento de control es un PC equipado con una tarjeta de red Ethernet para comunicación con el módulo de interfaz de red del sistema de adquisición y acondicionamiento. De esta manera, es posible tanto recibir la información procedente de los sensores, como enviar, a los actuadores, las señales de control generadas.

La gestión y el control del sistema se llevan a cabo mediante la ejecución del software micro-DCU, la solución específica desarrollada por Sartorius Stedim Biotech ([Sartorius Stedim Biotech, 2016](#)), que permite la monitorización del proceso en cada instante, así como el establecimiento de consignas por parte del usuario. El entorno de programación posibilita la comunicación con los módulos de adquisición y acondicionamiento, incorporando, en el software, los controladores de dispositivo necesarios.

3.6.1. Interfaz de usuario

La interfaz de usuario ofrece una vista gráfica de la unidad controlada, en la que se representan, mediante símbolos, los reactores, componentes del suministro de gas (válvulas, caudalímetros máxicos (MFC), etc.), sondas, bombas, contadores de dispensación y los periféricos adicionales y sus ubicaciones típicas con respecto al reactor. La interfaz se divide en tres secciones claramente diferenciadas:

- **Encabezado**

Visualización del estado del sistema, junto con la fecha y hora. Ante cualquier anomalía, también incluye la visualización de la alarma generada, junto con la hora y la descripción del tipo de fallo ocasionado.

- **Área de trabajo**

Visualización de los elementos funcionales del sistema, de acuerdo a la configuración previa del mismo, y los submenús del botón de menú activo: valores de proceso preseleccionados con corriente medida o valor de consigna.

- **Pie de página**

Acceso a los menús principales de los botones de menú asociados: principal “Main”, calibración “Calibration”, controladores “Controller”, tendencias “Trends”, y ajustes “Settings”. Así como, activación de funciones adicionales: manejo desde un equipo externo “Remote” y resumen de las alarmas que hayan podido activarse durante el proceso “Alarm”.

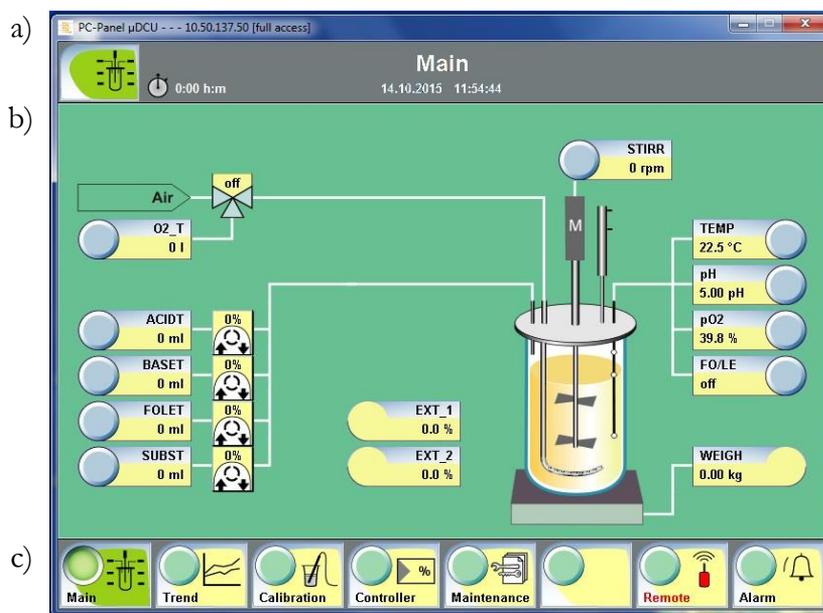


Figura AI.11. Vista del menú principal “Main” del software micro-DCU. a) Encabezado, b) Área de trabajo, c) Pie de página.

3.6.2. Menú principal “Main”

El menú principal muestra un resumen gráfico de la unidad de principal, permitiendo la visualización de los componentes de la configuración actual, de los valores medidos y de los parámetros del proceso, y el acceso directo a menús importantes para la introducción de datos funcionales.

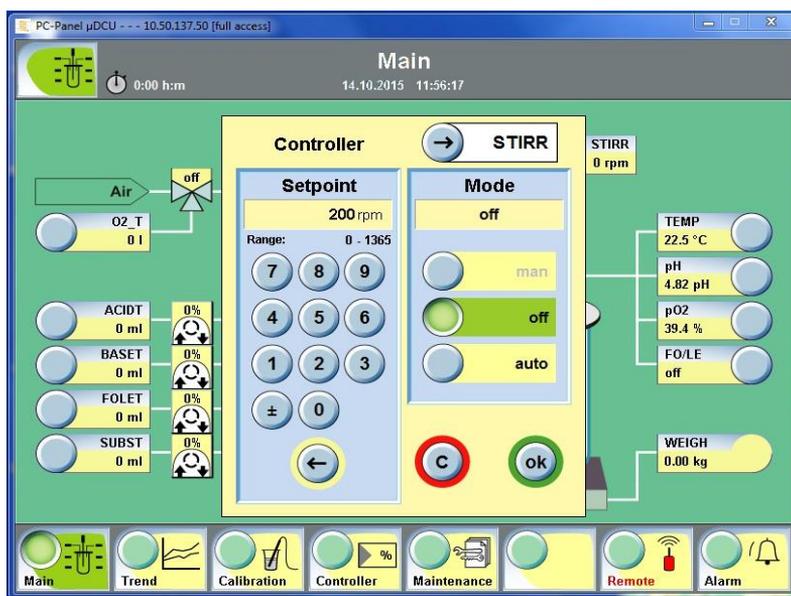


Figura AI.12. Acceso directo al menú “Controller” de la agitación “STIRR”. Desde este menú se puede introducir el valor de consigna “Setpoint” y el modo de funcionamiento: manual “man”, sin control “off” o con control durante el proceso “auto”.

3.6.3. Menú tendencias “Trends”

La pantalla “Trends” permite visualizar gráficamente los valores, de hasta ocho, parámetros durante las últimas 72 h del proceso. Esta función permite conocer, en cualquier instante, la evolución del sistema y los valores de los parámetros seleccionados en tiempo real.



Figura AI.13. Vista del menú tendencia “Trends” del software micro-DCU.

3.6.4. Menú calibración “Calibration”

El menú de “Calibration” permite activar todas las acciones necesarias para el funcionamiento rutinario: rutinas de calibración y pruebas de funcionamiento de los sensores de pH y pO₂, calibración del contador de llenado de las bombas de ácido y base y de llenado de gas N₂, O₂ o CO₂, así como de las balanzas. No obstante, teniendo en cuenta los requerimientos de la investigación desarrollada, a continuación, sólo se presentan aquellos submenús de calibración empleados, correspondientes a las sondas de pH y pO₂.

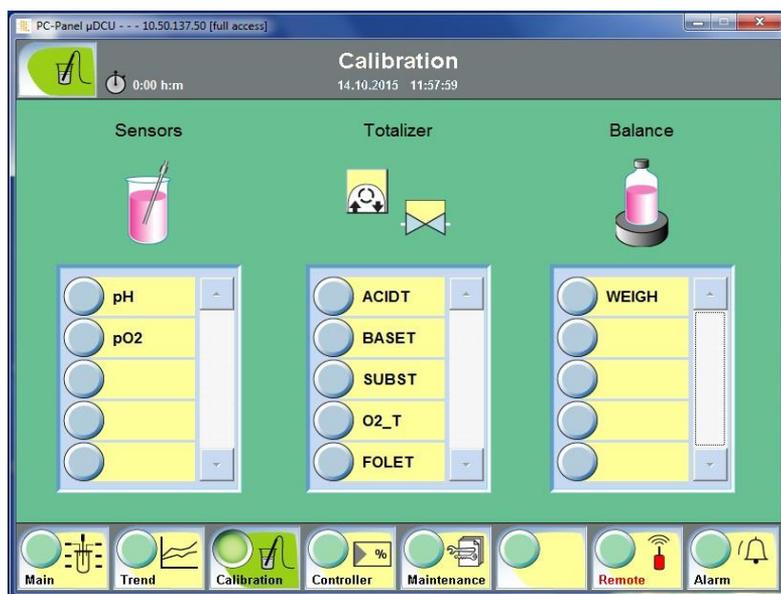


Figura AI.14. Vista del menú calibración “Calibration” del software micro-DCU.

Los parámetros de calibración permanecen guardados aunque el sistema micro-DCU se apague. Cuando se restablece la alimentación eléctrica, el sistema sigue utilizando los datos guardados hasta que se ejecute una nueva calibración.

3.6.4.1. Calibración de la sonda de pH

El sensor de pH se calibra con soluciones tampón mediante una calibración completa de dos puntos, en la que se determina los parámetros de potencial eléctrico cero (“zero”) y de la pendiente (“slope”), en el modo “Calibration”, o mediante una calibración exclusivamente de la pendiente de la recta de calibración, en el modo “Slope calibration”. Durante la medición del pH, el sistema calcula el valor del potencial del sensor, aplicando la ecuación de Nernst y teniendo en cuenta la desviación del punto cero, la pendiente y la temperatura. Durante la calibración, la temperatura de referencia se

puede introducir manualmente; durante la medición del pH, la compensación de temperatura se realiza automáticamente en función de la temperatura medida en el biorreactor.

Para recalibrar el sensor de pH en el caso de que se hubiesen producido cambios en las condiciones de medición durante el proceso, el modo “Recalibration” permite medir el valor de pH externamente en una muestra tomada del proceso e introducir el valor obtenido en el menú de calibración. La función de calibración compara el valor de pH medido en línea con el obtenido externamente, calcula el desplazamiento del punto cero resultante y muestra el valor de proceso corregido.



Figura AI.15. Vista del menú calibración “Calibration” de la sonda de pH del software micro-DCU. Selección del modo de calibración.

La pantalla de operador de los sensores de pH muestra el valor de pH y la tensión presente en la cadena de medición de los sensores, así como el desplazamiento del punto cero “zero” y los parámetros del sensor de pendiente. Esto permite comprobar fácilmente el funcionamiento del sensor de pH.

3.6.4.2. Calibración de la sonda de pO₂

El sensor de pO₂ ha de estar polarizado de forma previa a su calibración. Ésta es una calibración de dos puntos, en la que se determina los parámetros de corriente cero (“zero”) y de pendiente del sensor (“slope”). El valor de referencia para “zero” se corresponde con un medio libre de oxígeno, para lo que se ha empleado un medio acuoso con una disolución de gran poder reductor (“Calib. Air”), aunque también se podría haber utilizado una corriente de gas N₂ puro que desplazase el oxígeno disuelto presente en el medio (“Calib. Nitro.”). Para determinar la corriente correspondiente al segundo punto (“slope”) se emplea un medio acuoso saturado de aire, que se define como saturado al 100 % y se utiliza como base para determinar la pendiente de la recta de calibrado.



Figura AI.16. Vista del menú calibración “Calibration” de la sonda de pO₂ del software micro-DCU. Selección del modo de calibración del punto cero (“zero”).

Como se puede observar en la Figura AI.16, la pantalla del operador para calibrar el sensor de pO₂, es similar a la anteriormente mostrada para la calibración del pH.

Además de la saturación del pO₂, la pantalla del operador muestra el sensor de corriente actual, así como la corriente cero y la pendiente, junto con las condiciones de calibración. Esto facilita la regulación de las funciones del sensor.

3.6.5. Menú controlador “Controller”

Los bucles de control del sistema micro-DCU funcionan como controladores PID, generadores de valores de consigna o controladores de dos puntos, y están adaptados a sus correspondientes circuitos de control. Las salidas del controlador supervisan sus respectivos elementos de control de forma continua o mediante modulación por ancho de pulsos. El sistema tiene implementado un control de rangos partidos y de un solo flanco.

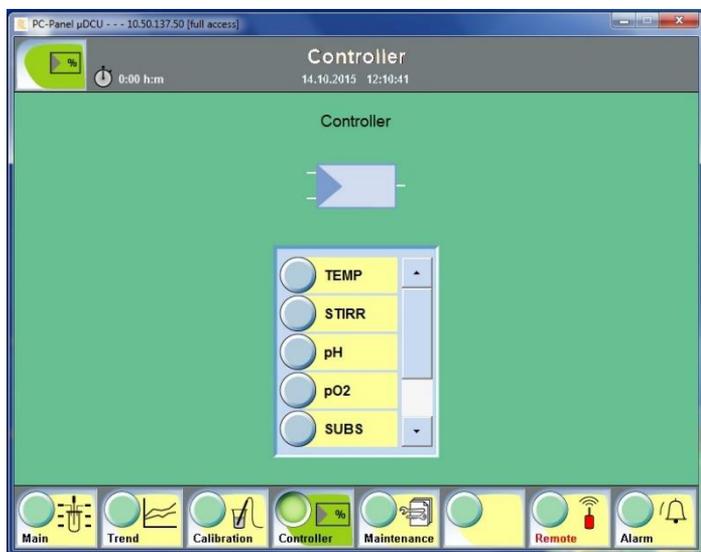


Figura AI.17. Vista del menú controlador “Controller” del software micro-DCU. Selección del controlador que se desea configurar.

En la siguiente tabla, se detalla la función de aquellos controladores que, disponibles en el software micro-DCU, han sido de especial interés para la investigación desarrollada:

Tabla AI.2. Principales controladores del sistema micro-DCU empleados en la investigación. (*) Función de control utilizada en los experimentos realizados.

Controladores	Función
Controlador de temperatura “TEMP”	Controlador PID en cascada con salidas de rango dividido y modulación por ancho de pulsos para el control del calefactor y/o de la válvula en la toma de agua de refrigeración(*), con el valor de temperatura medido en el recipiente de cultivo como valor de control.
Regulación de la velocidad “STIRR”	Generador de valores de consigna para el controlador de motor externo que controla el motor del agitador.
Controlador de pH “pH”	Controlador PID con salidas de rango dividido y modulación por ancho de pulsos que controla la bomba de ácido y/o el suministro de CO ₂ , y la bomba alcalina.
Controlador de pO ₂ “pO2”	Controlador PID en cascada para controlar hasta cuatro controladores esclavos: <ul style="list-style-type: none">– Controlador de gas de relleno: aire, O₂ o N₂(*)– Controlador del caudal de gas(*)– Regulador de velocidad– Controlador del suministro de sustrato

3.6.6. Menú mantenimiento “Maintenance”

En el menú “Maintenance”, el sistema micro-DCU ofrece varias funciones de mantenimiento y resolución de problemas del sistema, como son: ajustes generales (“System Parameters”), como fecha, hora o tiempo de espera en caso de fallo; ajustes para la comunicación con dispositivos externos (“External”); definición de los valores del proceso, y de sus rangos y límites (“PV Ranges”); funcionamiento manual de las entradas y salidas digitales y analógicas o de los controladores de simulación (“Man. Operation”), y funciones de mantenimiento (“Service”), como, por ejemplo, reiniciar el sistema o seleccionar la configuración del sistema.

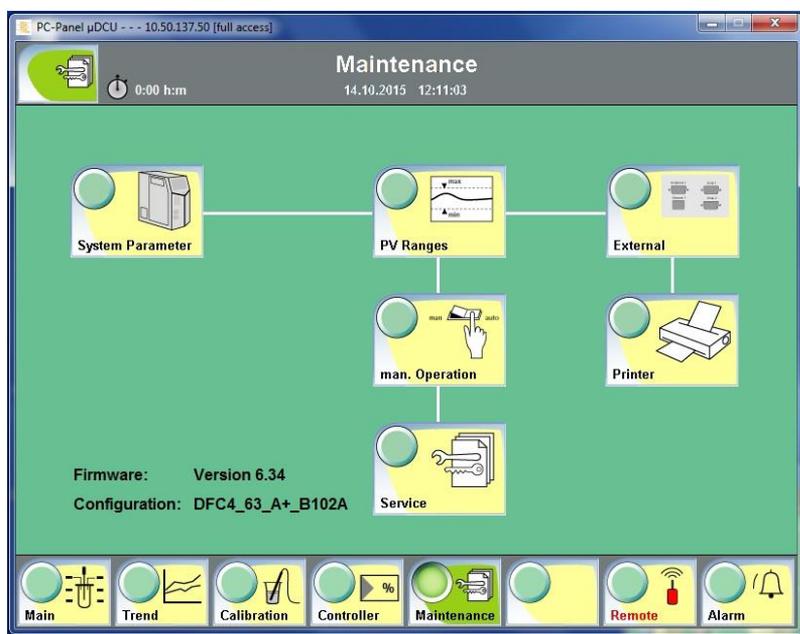


Figura AI.18. Vista general del menú mantenimiento “Maintenance” del software micro-DCU.

4. Métodos de análisis experimental

A lo largo de cada ciclo de fermentación, se han tomado muestras periódicas del medio fermentativo, así como del fermentado glucónico final, antes de proceder a su estabilización y almacenamiento. Éstas han sido caracterizadas mediante la determinación de la concentración de azúcares, fundamentalmente glucosa y fructosa, ácido glucónico y acidez total. Adicionalmente, se ha determinado la concentración de células totales, levaduras y bacterias, tanto en el inóculo como en las muestras de fermentado.

Las dificultades encontradas al tratar de determinar experimentalmente la concentración de bacterias, dada la complejidad del puré de fresa empleado como sustrato, ha llevado a desarrollar y optimizar un método rápido para la determinación indirecta de parámetros cinéticos y de rendimientos fundamentales para el diseño del biorreactor, válido para la etapa de crecimiento exponencial, que se detalla en la Sección 3.2 del Capítulo III de esta memoria.

4.1. Preparación de la muestra

Todas las muestras han sido analizadas inmediatamente después de ser tomadas. Los análisis de azúcares y ácido glucónico, mediante kits enzimáticos, han requerido la filtración y dilución previa de las muestras. La filtración, por gravedad, se ha llevado a cabo de forma simultánea a la primera dilución de la muestra, se ha empleado un embudo cónico con un filtro de pliegues, situado sobre un matraz aforado que sirve de recipiente de recogida. Esta disolución madre (1:25), que se obtiene a partir de repetidos lavados, con agua destilada, de una fracción aproximada de 10 g de muestra, se utiliza posteriormente en la preparación de las disoluciones que finalmente han sido analizadas. El factor de dilución de estas últimas (F) ha dependido, en cualquier caso,

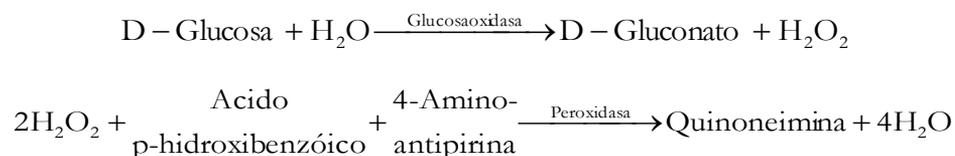
del grado de concentración inicial del sustrato empleado en cada experimento y del método analítico aplicado.

Todas las determinaciones, tanto de concentración de compuestos como de concentraciones celulares, han sido llevadas a cabo, al menos, por triplicado, obteniéndose un valor promedio y una desviación estándar de cada magnitud medida por muestra tomada.

4.2. Determinación de la concentración de azúcares

4.2.1. Determinación de la concentración de glucosa

La cuantificación aislada de glucosa ha sido llevada a cabo empleando el kit enzimático K-GLUC07/11 de Megazyme® (Megazyme, 2016). Este método colorimétrico recurre al uso de enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa, en base a los siguientes mecanismos de reacción:



De esta forma, la concentración de D-glucosa se determina, de forma indirecta, a partir de la quinoneimina formada, un compuesto de color rojo, que da valores de absorbancia a 510 nm. La Tabla AI.3 muestra, en detalle, el procedimiento seguido:

Tabla AI.3. Procedimiento kit K-GLUC07/11 (Megazyme®).

	Blanco	Estándar	Muestra
Reacción [Dejando incubar a 40-50 °C durante 20 min]	3,0 mL Mezcla de disolución tampón pH 7,4 (ácido p-benzóico y azida de sodio) con suspensión de glucosa oxidasa, peroxidasa y 4- aminiantipirina		
	0,1 mL agua destilada	0,1 mL disolución estándar D- glucosa (1g·L ⁻¹)	0,1 mL muestra
Medida de absorbancia (510 nm)	Tomando el Blanco como referencia, se obtiene $\Delta A_{\text{Estándar}}$ y $\Delta A_{\text{Muestra}}$		

Los diferentes reactivos han sido añadidos haciendo uso de pipetas semiautomáticas de volumen variable. La reacción enzimática se ha llevado a cabo en tubos de ensayo de teflón, provistos de tapón para su cierre hermético, soportados sobre una gradilla colocada dentro de un baño termostático con agua a 45 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, el contenido de cada tubo se ha trasvasado a cubetas de plástico desechables, de 1 cm de paso de luz, para proceder a la medida inmediata de la absorbancia a 510 nm.

Finalmente, el cálculo de la concentración de D-glucosa presente en una muestra dada, se logra fácilmente aplicando la siguiente expresión:

$$[\text{D-Glucosa}]_{\text{Muestra}} \left(\frac{\mu\text{g}}{0,1\text{mL}} \right) = \frac{\Delta A_{\text{Muestra}}}{\Delta A_{\text{Estándar}}} \cdot 100 \cdot F \quad [\text{Ec. AI.1}]$$

donde $\Delta A_{\text{Estándar}}$ y $\Delta A_{\text{Muestra}}$ representan la diferencia de absorbancias $A_{\text{Estándar}} - A_{\text{Blanco}}$ y $A_{\text{Muestra}} - A_{\text{Blanco}}$, respectivamente; y F, el factor de dilución de la muestra original.

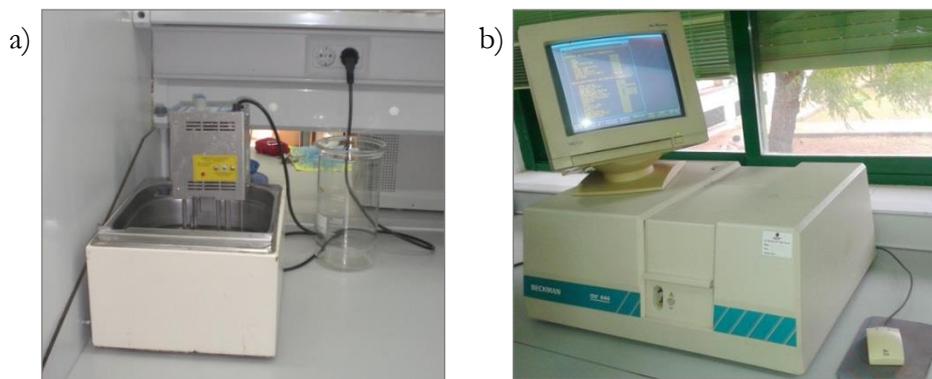
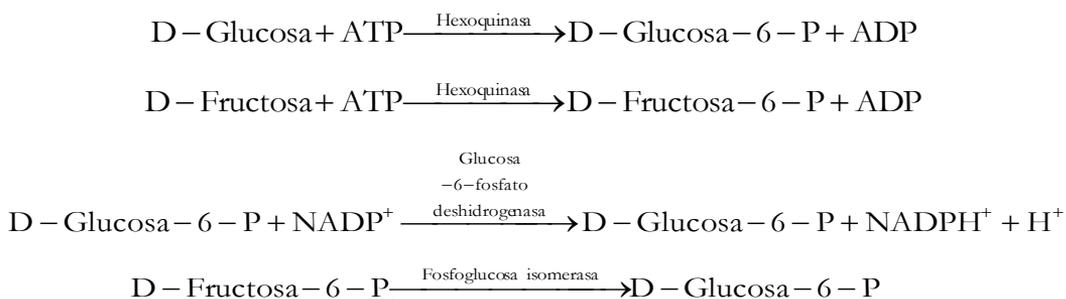


Figura AI.19. Instrumentos empleados en la determinación de concentraciones de azúcares y ácido glucónico. **a)** Baño termostático LAUDA, modelo RM 20, empleado en la incubación de muestras, **b)** Espectrofotómetro UV-Visible BECKMAN, modelo DU 640, empleado en la determinación de la concentración de azúcares y ácido glucónico.

4.2.2. Determinación de la concentración de glucosa y fructosa

La concentración de glucosa ha sido también determinada de, forma simultánea a la concentración de fructosa, empleando el kit enzimático K-FRUGL12/12 de Megazyme® (Megazyme, 2016). Este método recurre al uso de enzimas hexoquinasas, deshidrogenasas e isomerazas, de acuerdo a los siguientes mecanismos de reacción:



De forma que, la concentración de glucosa se determina, de forma indirecta, a partir de la cantidad de NADPH formada, generando un incremento del valor de absorbancia a 340 nm. Por su parte, la fructosa requiere de una etapa previa de conversión de D-fructosa-6-P a D-glucosa-6-P. La tabla AI.4 muestra el procedimiento detallado:

Tabla AI.4. Procedimiento kit K-FRUGL12/12 (Megazyme®).

	Blanco	Muestra
Reacción [Dejando reaccionar durante 3 min]	2,10 mL Agua destilada	2,00 mL Agua destilada 0,10 mL Muestra
Medida de absorbancia (340 nm)		A ₁
Reacción [Dejando reaccionar 5 min]	0,02 mL Suspensión de hexoquinasa y D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	
Medida de absorbancia (340 nm)		A ₂
Reacción [Dejando reaccionar 8-10 min]	0,02 mL Suspensión de fosfoglucosa isomerasa	
Medida de absorbancia (340 nm)		A ₃

Desde el inicio del ensayo, la reacción enzimática se ha llevado a cabo directamente en las cubetas de plástico desechables que han sido, después, utilizadas para la medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 340 nm. Los diferentes reactivos han sido añadidos haciendo uso de pipetas semiautomáticas de volumen variable.

Con todo ello, la concentración de D-glucosa presente en la muestra, vendría dada por la siguiente expresión:

$$[\text{D} - \text{Glucosa}] \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{V_{\text{Reactivos-F}} \cdot Pm_{\text{Glucosa}}}{\epsilon \cdot d \cdot V_{\text{Muestra}}} \cdot \Delta A_{\text{Glucosa}} \cdot F = 0,6634 \cdot \Delta A_{\text{Glucosa}} \cdot F$$

[Ec. AI.2]

donde V_{Muestra} y $V_{\text{Reactivos-F}}$ representan los volúmenes de muestra (0,1 mL) y total de reacción (2,32 mL); Pm_{Glucosa} , el peso molecular de la glucosa (180,16 g·mol⁻¹); ϵ , el coeficiente de extinción molar de NADPH a 340 nm (6300 L·mol⁻¹·cm⁻¹); d , el paso de luz de la cubeta (1 cm); y $\Delta A_{\text{D-GLUCOSA}}$, es la diferencia $[A_2 - A_1]_{\text{Muestra}} - [A_2 - A_1]_{\text{Blanco}}$; F , el factor de dilución de la muestra original.

De forma similar, la concentración de D-fructosa presente en la muestra, se obtendría de la expresión:

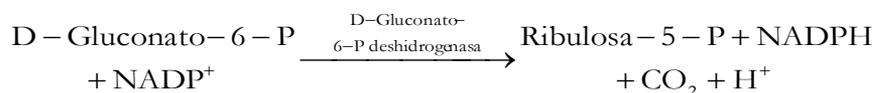
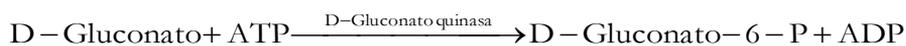
$$[\text{D} - \text{Fructosa}] \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{V_{\text{Reactivos-F}} \cdot F \cdot Pm_{\text{Fructosa}}}{\epsilon \cdot d \cdot V_{\text{Muestra}}} \cdot \Delta A_{\text{Fructosa}} \cdot F = 0,6692 \cdot \Delta A_{\text{Fructosa}} \cdot F$$

[Ec. AI.3]

donde todos los términos de la expresión serían idénticos a los especificados en la expresión de la concentración de D-glucosa, a excepción de $V_{\text{Reactivos-F}}$ (2,34 mL), Pm_{Fructosa} (180,16 g·mol⁻¹) y $\Delta A_{\text{Fructosa}}$, que representa la diferencia $[A_3 - A_2]_{\text{Muestra}} - [A_3 - A_2]_{\text{Blanco}}$.

4.2.3. Determinación de la concentración de ácido glucónico

La concentración de ácido glucónico ha sido determinada, empleando el kit enzimático K-GATE12/12 de Megazyme® (Megazyme, 2016). Este método emplea, de forma simultánea, el uso de enzimas quinasas y deshidrogenasas, así como una disolución tampón a pH alcalino, de acuerdo a los siguientes mecanismos de reacción:



La concentración de ácido D-glucónico se determina, de forma indirecta, a partir de la cantidad de NADPH formada, que se traduce en un incremento de la absorbancia a 340 nm. La Tabla AI.5. muestra el procedimiento detallado:

Tabla AI.5. Procedimiento kit K-GATE12/12 (Megazyme®).

	Blanco	Muestra
	2,10 mL Agua destilada	2,00 mL Agua destilada
Reacción		0,10 mL Muestra
[Dejando reaccionar 5 min]	0,20 mL Disolución tampón pH 7,6 0,20 mL Disolución NADP ⁺ y ATP 0,02 mL Suspensión D-Gluconato-6-fosfato deshidrogenasa	
Medida de absorbancia (340 nm)		A ₁
Reacción		
[Dejando reaccionar 6 min]	0,02 mL Suspensión D-gluconato quinasa	
Medida de absorbancia (340 nm)		A ₂

Desde el inicio del ensayo, la reacción enzimática se ha llevado a cabo directamente en las cubetas de plástico desechables que han sido, después, utilizadas para la medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 340 nm. Los diferentes reactivos han sido adicionados haciendo uso de pipetas semiautomáticas de volumen variable.

Finalmente, el cálculo de la concentración de ácido D-glucónico presente en la muestra, vendría dada por la expresión siguiente:

$$[\text{Ac. D - Glucónico}] \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{V_{\text{Reactivos-Finall}} \cdot P_{\text{m Ac Gluc}}}{\epsilon \cdot d \cdot V_{\text{Muestra}}} \cdot \Delta A_{\text{Ac Gluc}} \cdot F$$

$$= 0,6634 \cdot \Delta A_{\text{Ac Gluc}} \cdot F$$

[Ec. AI.4]

donde V_{Muestra} y $V_{\text{Reactivos-F}}$ representan los volúmenes de muestra (0,1 mL) y final de reacción (2,54 mL); $P_{\text{m}_{\text{Ac Gluc}}}$, el peso molecular del ácido D-glucónico ($196,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); ϵ , el coeficiente de extinción molar de NADPH a 340 nm ($6300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); d , el paso de luz de la cubeta (1 cm); y $\Delta A_{\text{Ac Gluc}}$, es la diferencia $[A_2-A_1]_{\text{Muestra}}-[A_2-A_1]_{\text{Blanco}}$; F , el factor de dilución de la muestra original.

4.3. Determinación de la acidez total

La acidez total, que representa la totalidad de los ácidos volátiles y fijos que contiene el fermentado glucónico, se ha determinado mediante una volumetría de neutralización, empleando una disolución previamente estandarizada de NaOH 0,5N y fenolftaleína como indicador del punto final de la valoración (pH 8,2).

Para ello, se pesan, aproximadamente, 5 g de muestra en un matraz erlenmeyer, se añade un poco de agua para favorecer la homogeneización del puré, se añaden dos gotas de indicador y se valora lentamente con la disolución de NaOH contenida en la bureta. Previamente, la disolución valorante es estandarizada con ftalato ácido de potasio para determinar, con exactitud, su normalidad.

Con todo ello, la acidez total, expresada en términos de $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido D-glucónico, se obtiene de la forma que sigue a continuación:

$$[\text{Acidez total}] \left(\frac{\text{g}_{\text{Ac Gluc}}}{\text{L}} \right) = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot 0,5 \cdot f \cdot P_{\text{m}_{\text{Ac Gluc}}}}{P_{\text{Muestra}} \cdot d_{\text{Muestra}} \cdot 10} = 9,805 \cdot \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot f}{P_{\text{Muestra}}}$$

[Ec. AI.5]

donde V_{NaOH} representa el volumen de valorante consumido; f , el factor de estandarización de la disolución valorante; $P_{\text{m}_{\text{Ac Gluc}}}$, el peso molecular del ácido D-glucónico ($196,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); P_{Muestra} , el peso de muestra que se

ha tomado para el análisis; y d_{Muestra} , la densidad de la muestra ($\approx 1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$).



Figura AI.20. Montaje empleado en para la determinación de la acidez total.

4.4. Determinación de la concentración de células totales

La determinación de la concentración de células totales, bacterias y levaduras, se realiza mediante observación y recuento directo al microscopio óptico, utilizando una cámara de Neubauer, en la que se deposita la muestra previamente diluida (Baena-Ruano et al. 2006). Este recuento de células totales presentes en el fermentado es especialmente importante para conocer, a lo largo del proceso, el estado del cultivo inoculado y de otros microorganismos indeseados que, presentes inicialmente en estado latente en el puré, pudiesen reactivarse, crecer y competir por el consumo de glucosa, e incluso, de otros azúcares disponibles en el medio, como pueda ser la fructosa.

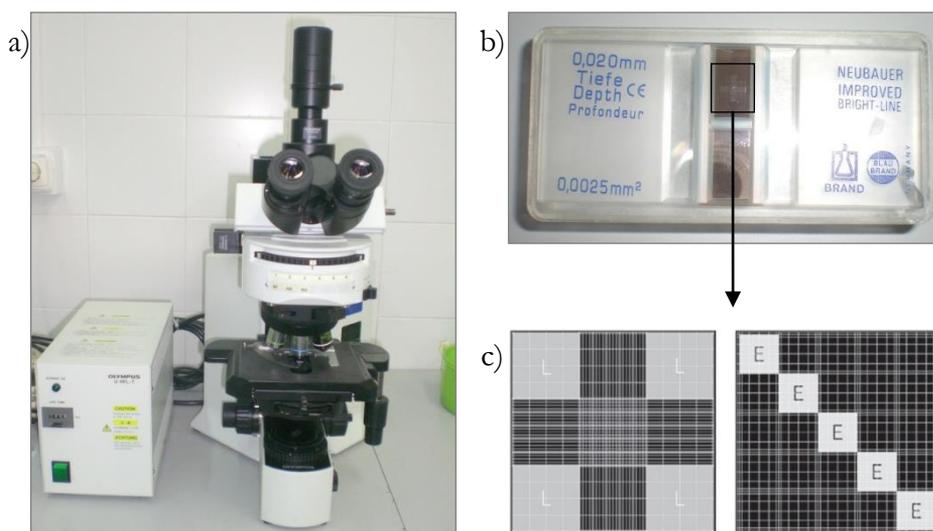


Figura AI.21. Dispositivos empleados en la determinación de la concentración de células totales (bacterias y levaduras). **a)** Microscopio óptico OLYMPUS, modelo BX51/BX52, **b)** Cámara de Neubauer BLAUBRAND® de 0,02 mm de profundidad y una superficie de conteo de 0,0025 mm², **c)** Ampliación de una zona de conteo (izquierda) y del cuadrado grande central (derecha) de la cámara de Neubauer.

4.4.1. Determinación de la concentración de bacterias totales

Para el recuento de bacterias totales, en tubos de plástico, se toma 1 mL de muestra o inóculo, previamente diluido, y se enrasa hasta 5 mL con una disolución H₂O:HCl 0,1N. La mezcla se homogeniza y se deja reposar durante 5 min, a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se toman, con ayuda de una micropipeta, 5 µL de la mezcla, se depositan sobre una de las zonas de conteo de la cámara de Neubauer, procurando ocupar toda la superficie del cuadrado grande central, y se tapa con un cubreobjetos, evitando la presencia de burbujas de aire. Una vez fijada la cámara a la platina del microscopio, se procede al recuento de las bacterias contenidas en los cinco cuadrantes

pequeños de la diagonal formada por los cuadrantes pequeños, marcados con la letra E en la Figura AI.21c.

El cálculo de la concentración de bacterias totales presentes en la muestra, se consigue aplicando la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} [\text{Bacteria}] \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) &= \frac{\text{Bacterias}_{\text{Diagonal E}}}{5} \cdot \frac{V_F}{V_{\text{Muestra}}} \cdot F_{\text{Muestra}} & [\text{Ec. AI.6}] \\ &= 1,25 \cdot 10^6 \cdot \text{Bacterias}_{\text{Diagonal E}} \cdot F_{\text{Muestra}} \end{aligned}$$

donde $\text{Bacterias}_{\text{Diagonal E}}$ representa el número de bacterias contadas en los cinco cuadrantes pequeños de la diagonal; V_{Cuadrado} , es el volumen de un cuadrante pequeño de la cámara de Neubauer ($0,02\text{cm} \cdot 0,02\text{cm} \cdot 0,002\text{cm} = 8 \cdot 10^{-7} \text{ mL}$); V_F , es el volumen final de la mezcla (5mL); V_{Muestra} , es el volumen de muestra (1 mL); F_{Muestra} , es el factor de dilución de la muestra.

4.4.2. Determinación de la concentración de levaduras totales

Para determinar la concentración de levaduras totales presentes en la muestra, se mezcla, en un tubo de ensayo de plástico, 1 mL de muestra diluida y 1mL de agua destilada, y a continuación, se procede al recuento de levaduras usando una cámara de Neubauer, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, en la Sección 4.4.1, para el recuento de bacterias.

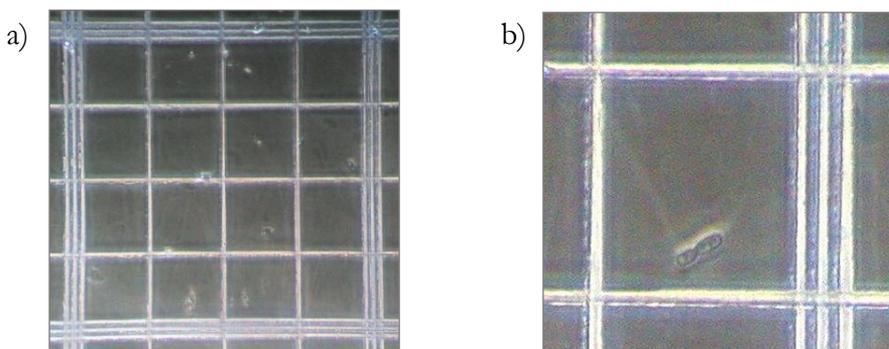


Figura AI.22. Vista de levaduras presentes en el fermentado glucónico de fresa. **a)** Vista de uno de los cuadrados de la diagonal de recuento (Cuadrado grande central de la cámara de Neubauer), **b)** Vista de la gemación de levaduras (Mini-cuadrado de la cámara de Neubauer).

Con todo esto, el cálculo de la concentración de levaduras totales se realiza de acuerdo a una expresión matemática similar a la Ec. AI.5.6:

$$[\text{Levaduras}] \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Levaduras}_{\text{Diagonal E}}}{5} \cdot \frac{V_{\text{F}}}{V_{\text{Muestra}}} \cdot F_{\text{Muestra}} \quad [\text{Ec. AI.7}]$$

$$= 5 \cdot 10^5 \cdot \text{Levaduras}_{\text{Diagonal E}} \cdot F_{\text{Muestra}}$$

donde $\text{Levaduras}_{\text{Diagonal E}}$ representa el número de levaduras contadas en los cinco cuadrantes pequeños de la diagonal; V_{Cuadrado} , es el volumen de un cuadrante pequeño de la cámara de Neubauer ($0,02\text{cm} \cdot 0,02\text{cm} \cdot 0,002\text{cm} = 8 \cdot 10^{-7} \text{ mL}$); V_{F} , es el volumen final de la mezcla (2mL); V_{Muestra} , es el volumen de muestra (1 mL); F_{Muestra} , es el factor de dilución de la muestra.

4.5. Preparación de muestras de fermentado para el aislamiento e identificación de microorganismos

De forma puntual, se ha procedido a la siembra en placa de inóculos y muestras de fermentado glucónico de fresa a lo largo de ciclos completos de fermentación para su posterior caracterización microbiológica; estas placas se enviaban al Grupo de investigación de Biotecnología Enológica de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España). En concreto, estas muestras corresponden a inóculos de *G. japonicus* CECT 8443 sembrados en medio líquido sintético GYP y pre-cultivado en fresa estéril, muestras de sustrato de fresa sin inocular y recién inoculado, así como muestras de fermentado, tomadas, de forma periódica, durante el proceso de fermentación.

Para ello, se toman, con ayuda de una micropipeta, 0,1 mL de muestra de inóculo o fermentado, según proceda, y se siembra, por estría, sobre la superficie de medio GY agar contenido en placas de Petri. Este procedimiento se repite con diluciones 1:10 y 1:100 de la muestra. Una vez finalizado el proceso, las placas de Petri se almacenan a 4 °C en frigorífico hasta ser enviadas, manteniendo la cadena de frío.

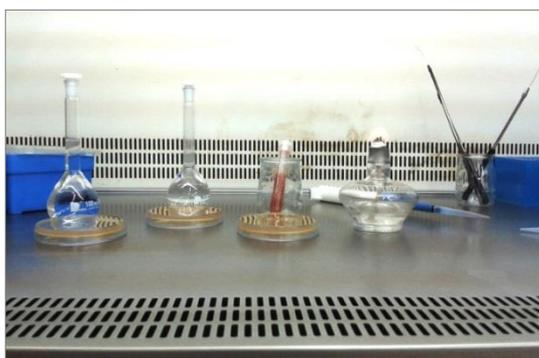


Figura AI.23. Siembra en placa de muestras de fermentado glucónico para su caracterización microbiológica por el Grupo de investigación de Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España).

Bibliografía

- Baena Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., García-García, I. (2006) Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochem.* 41, pp. 1160–1164.
- Concentrados Pallejá S.L., Riudoms (Tarragona, España) <http://www.concentradospalleja.com/es> (Agosto 2016).
- Hamilton, www.hamiltoncompany.com (Agosto 2016).
- Hudisa. Desarrollo Industrial S.A., Lepe (Huelva, España), <http://www.hudisa.com/index.php> (Agosto 2016).
- Ismatec, <http://www.ismatec.com> (Agosto 2016).
- Megazyme International Ireland, www.megazyme.com (Agosto 2016).
- Navarro, D. (2011) Gluconic acid production by selective glucose fermentation using acetic acid bacteria. Tarragona, España (Master Thesis, UVR).
- Navarro, D., Mateo, E., Torija, M.J., Mas, A. (2013) Acetic acid bacteria in grape must. *Acetic Acid Bacteria* 2, pp. 19-23.
- Sainz, F., Navarro, D., Mateo, E., Torija, M.J., Mas, A. (2016) Comparison of D-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 222, pp. 40-47.
- Sartorius Stedim Biotech S.A., www.sartorius.us/us (Agosto 2016).



Anexo II

INFORME CON EL

FACTOR DE IMPACTO

Y CUARTIL

Esta Tesis Doctoral ha sido presentada en la en la modalidad de Compendio de Publicaciones. A tal efecto, en este Anexo, se recoge el informe con el factor de impacto y cuartil del *Journal Citation Reports* del área en el que se encuentran las publicaciones presentadas:

1. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Ehrenreich, A., Liebl, W., García-García, I. (2016) Gluconic acid: Properties, production methods and applications - An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste biovalorization, *Process Biochemistry*, doi: 10.1016/j.procbio.2016.08.028. (Presentada en la Sección 1.2 del Capítulo III).

- Indicios de calidad:
 - Índice de impacto en 2015 de 2,529.
 - Posición 21/133 en el área de Chemical Engineering.
 - Primer cuartil (Q1).

2. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., Jiménez-Hornero, J.E., García-García, I. (2015) Preparation of a pure inoculum of acetic acid bacteria for the selective conversion of glucose in strawberry purée into gluconic acid. *Food and Bioproducts Processing* 96, pp. 35-42. (Presentada en la Sección 2.2 del Capítulo III).

- Indicios de calidad:
 - Índice de impacto en 2015 de 2,687.
 - Posición 23/124 en el área de Food Science & Technology.
 - Primer cuartil (Q1).

3. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., García-García, I. (2016) An approach for estimating the maximum specific growth rate of some bacteria in complex media without cell concentration data. An example: *Gluconobacter japonicus* growing in strawberry purée. *Biochemical Engineering Journal* 105, pp. 314-320. (Presentada en la Sección 3.2 del Capítulo III).
 - Indicios de calidad:
 - Índice de impacto en 2015 de 2,463.
 - Posición 38/135 en el área de Chemical Engineering.
 - Segundo cuartil (Q2).

4. Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., García-García, I. (2016) Revalorization of strawberry surpluses by bio-transforming its glucose content into gluconic acid. *Food and Bioproducts Processing* 99, pp. 188-196. (Presentada en la Sección 4.2 del Capítulo III).
 - Indicios de calidad:
 - Índice de impacto en 2015 de 2,687.
 - Posición 23/124 en el área de Food Science & Technology.
 - Primer cuartil (Q1).



Anexo III

OTRAS APORTACIONES

DERIVADAS DE LA

TESIS DOCTORAL

Artículos de investigación

1. Álvarez-Fernández, M.A., Cerezo, A.B., Cañete-Rodríguez, A.M., Troncoso, A., García-Parrilla, M.C. (2015) Composition of non-anthocyanin polyphenols in alcoholic-fermented strawberry products, using LC-MS (QTRAP), high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS), LC-DAD and antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, pp. 2041-2051.
2. Ordoñez, J.L., Cañete-Rodríguez, A.M., Callejón, R.M., Santos-Dueñas, I.M., Troncoso, A.M., García-García, García-Parrilla, M.C. (2016) Effect of gluconic acid submerged fermentation of strawberry purée on amino acids and biogenic amines profile. *Journal of Food Processing and Preservation*, doi:10.1111/jfpp.12787.

Trabajos presentados en Congresos

1. Póster: Submerged cultures of *Gluconobacter* genus in strawberry pulp for making a gluconic acid based product. An ingredient for new healthy beverages. [Cañete-Rodríguez, A.M.](#), Santos-Dueñas, I.M., García-Mauricio, J.C., Martínez-Pedrajas, C., García-García, I. *III International Conference on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products (AAB2012)*. Córdoba (España), Abril 2012.
2. Póster: Production of strawberry vinegar as a base product in the development of new healthy beverages. [Cañete-Rodríguez, A.M.](#), Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Jiménez-Hornero, J.E., García-García, I. *III International Conference on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products (AAB2012)*. Córdoba (España), Abril 2012.
3. Póster: Ingeniería de procesos biológicos. Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Baena-Ruano, S., Álvarez-Cáliz, C., [Cañete-Rodríguez, A.M.](#), Jiménez-Hornero, J.E., [García-García, I.](#) *La investigación en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba*. Córdoba (España), Mayo 2012.
4. Comunicación oral: Aprovechamiento de fresa no apta para su comercialización. [Cañete-Rodríguez, A.M.](#) *II Congreso Científico de Investigadores en Formación Agroalimentaria CeIA3*. Córdoba (España), Abril 2013.

5. Comunicación oral: Fermentación glucónica en el contexto del aprovechamiento de excedentes de fresa para elaboración de una nueva bebida. [Cañete-Rodríguez, A.M.](#), Santos-Dueñas, I.M., García-Martínez, T., Torija-Martínez, M.J., Mas, A., García-García, I. *VII Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CYTA2013*. Córdoba (España), Junio 2013.
6. Comunicación oral: Colaboración universidad-empresa para la docencia en ingeniería bioquímica. [García-García, I.](#), Pérez de Toro, R., Santos-Dueñas, I.M., [Cañete-Rodríguez, A.M.](#), Martín-Martín, A. *XXXI Jornadas de Ingeniería Química*. Almería (España), Septiembre 2013.
7. Póster: Comparación de la capacidad fermentativa de tres especies de levaduras para la elaboración de vino de fresa. [Cañete-Rodríguez, A.M.](#), García-García, I., Santos-Dueñas, I.M., García-Martínez, T., Mauricio, J.C. *III Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación Ceia3*. Cordoba (España), Noviembre 2014.
8. Comunicación oral: Gluconic acid bioproduction by acetic acid bacteria, a difficult equilibrium to reach. [García-García, I.](#), [Cañete-Rodríguez, A.M.](#), Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E. *IV International Congress on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products (AAB2015)*. Taiyuan (P.R.China), Septiembre 2015.
9. Póster: Strawberry purée: selective bio-transformation of its glucose content into gluconic acid. Influence of the initial concentration of substrate on the stability of the products. [García-García, I.](#), [Cañete-Rodríguez, A.M.](#), Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, Torija-Martínez, M.J., Mas, A. *IV International Congress on Acetic Acid*

Bacteria. Vinegar and other products (AAB2015). Taiyuan (P.R.China), Septiembre 2015.

10. Comunicación oral: Aspectos clave en el desarrollo de procesos de fermentación para la producción de ácido glucónico a partir de puré de fresa. [Cañete-Rodríguez, A.M.](#), Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., García-García, I. *VII Jornadas de divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología*, Córdoba (España), Junio 2016.