

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Proyecto final de graduación, presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos
para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Valorización de bagazo de granos cerveceros de una micro cervecería
a través de la producción de la enzima ligninolítica lacasa por un moho,
mediante una fermentación en medio sólido

Arturo Gutiérrez Pacheco

Carné: B23104

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

Noviembre 2021

Tribunal Examinador

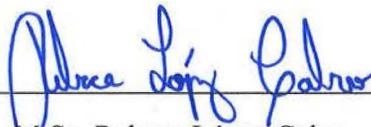
Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimento como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Aprobado por:



PhD. Jessie Usaga Barrientos

Presidenta del Tribunal



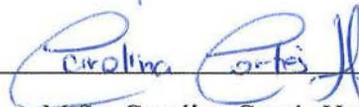
M.Sc. Rebeca López Calvo

Profesora Designada



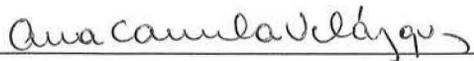
Lic. Vanny Emileth Mora Villalobos

Directora del Proyecto



M.Sc. Carolina Cortés Herrera

Asesora del Proyecto



M.Sc. Carmela Velázquez Carrillo

Asesora del Proyecto

Dedicatoria

Este trabajo, y el esfuerzo implicado en hacerlo, se lo dedico al gremio cervecero. Es un grupo de personas apasionadas y curiosas, características que admiro de sobremanera. Espero que este esfuerzo ayude a mejorar la calidad de sus productos y en algún futuro cercano les permita aprovechar todos los recursos a su disposición para que sus iniciativas y sueños perduren en la sociedad costarricense.

Agradecimientos

Agradezco el apoyo y aliento incondicional de mi familia para llevar a cabo esta investigación. Agradezco el tiempo y dedicación del tribunal examinador en ayudarme a encausar esta investigación. Adicionalmente agradezco el apoyo financiero brindado por el Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica en cuanto a los análisis realizados sobre el bagazo de granos cerveceros.

Índice General

Tribunal Examinador	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Cuadros.....	viii
Resumen.....	ix
Abreviaciones y Definiciones	xi
1. Justificación	1
2. Objetivos:.....	5
2.1 Objetivo general:	5
2.2 Objetivos específicos:.....	5
3. Marco Teórico	6
3.1. Bagazo de granos cerveceros y otros desechos de la industria cervecera	6
3.2. Valorización convencional de Bagazo de Granos de Cerveceros	7
3.3. Aprovechamiento biotecnológico del BGC	9
3.4. Los mohos filamentosos en la producción de enzimas laccasa.....	10
3.5. Bioprospección	13
3.6. Métodos para la identificación de actividad lacasa	14
3.7. Evaluación de procesos de crecimiento y expresión de lacasa	14
3.8. Determinación analítica de la actividad de las enzimas lacasa	17
3.8.1. Determinación de la actividad lacasa con ABTS.....	18
3.9. Análisis colorimétrico	19
3.10. Factores que determinan la producción de lacasas en la FMS	20
3.10.1. Físicos	21
3.10.2. Químicos	21
3.10.3. Biológicos	23
4. Materiales y Métodos	23
4.1. Localización del proyecto	23
4.2. Materias primas:	24

4.3.	Determinación de propiedades funcionales del bagazo de granos cerveceros	25
4.4.	Determinación de características nutricionales del BGC	26
4.5.	Microorganismos estudiados	27
4.5.1.	Mantenimiento de mohos	27
4.5.2.	Determinación de índice de potencia de mohos	27
4.5.2.1.	Análisis de Imágenes Digitales, AID	29
4.6.	Determinación de la actividad enzimática por el Método ABTS	30
4.6.1.	Estandarización del método analítico seleccionado	31
4.6.2.	Optimización del análisis de actividad enzimática en el espectrofotómetro Bio-TEK® Synergy™ HT	31
4.6.3.	Condiciones estandarizadas de fermentación	32
4.6.4.	FMS	33
4.6.4.1.	Cuantificación de actividad enzimática lacasa	34
5.	Resultados y Discusión	34
5.1.	Evaluación de bagazo de granos cerveceros para su utilización como sustrato en una operación FMS	34
5.2.	Selección de moho eficiente en la expresión de enzima lacasa.	40
5.3.	Implementación de método analítico para cuantificar actividad enzimática de lacasa	41
5.4.	Cuantificación de la actividad enzimática durante FMS sobre BGC	44
6.	Conclusiones	49
7.	Recomendaciones	50
8.	Bibliografía	51
9.	Anexos	66

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de generación de residuos (recuadros rojos) durante producción de cerveza. (Elaboración propia)	6
Figura 2. Cascada de biomasa por Peter Westermann, Copenhagen Institute of Technology (Buffington, 2014)	8
Figura 3. Representación esquemática de la reacción catalizada por laccasa, a. oxidación directa: el sustrato se oxida al radical correspondiente como resultado de la interacción y b. oxidación indirecta: el sustrato se oxida en presencia de un mediador.(Agrawal Chaturvedi, & Verma, 2018)	11
Figura 4. Estructuras químicas de sustratos a) no fenólicos y b) fenólicos de lacasa utilizados para la determinación de su actividad enzimática (Foorootanfar & Faramarzi, 2015).....	17
Figura 5. Contenedores acrílicos para las unidades de fermentación.	33
Figura 6. Efecto de la composición del buffer en el menisco formado dentro de un pozo de una microplaca de lectura de espectrofotómetros. De izquierda a derecha: agua, buffer TE, Buffer Tris de alta concentración y Buffer de acetato. (Lampinen <i>et al.</i> , 2012)	43
Figura 7. Actividad de enzima (U/mg), durante doce días de fermentación sobre residuos de granos de cerveza	45
Figura 8. Actividad de enzima lacasa (U/mg) de réplica atípica durante doce días de fermentación sobre residuos de granos de cerveza. Los valores corresponden al promedio de 6 determinaciones para cada punto de muestreo.....	47
Figura 9. Contenido de nitrógeno de extractos de BGC obtenidos durante la fermentación en medio sólido con <i>Pleurotus ostreatus</i> , la cepa comercial.. ..	66
Figura 10. Espacio de captura de imágenes (sin cobertor), con iluminación controlada para la toma de imágenes digitales (López-Gómez, Pérez-Rivero, & Webb, 2019).	66

Índice de Cuadros

Cuadro I. Composición química de bagazo de granos cerveceros (Lynch, 2016).....	7
Cuadro II. Resumen de las categorías de métodos para estimar biomasa en FMS Traducción (Abdul & Webb, 2017).	15
Cuadro III. Composición del agar LBM a ser utilizado para la evaluación de producción de lacasa y enzimas interferentes al ser suplementado con ABTS (Pointing, 1999).	28
Cuadro IV. Herramientas de GIMP 2.10.2 utilizadas en el AID de mohos creciendo en agar LBM en los días 3, 6 y 10.	29
Cuadro V. Promedio e intervalo de confianza de la CRA y PCH de diferentes fracciones de BGC proveniente de la producción de una pale ale artesanal.	35
Cuadro VI. Promedio de macro y micronutrientes presentes en BGC generado en la producción artesanal de cerveza estilo “pale ale” y concentración mínima para el crecimiento y desarrollo metabólico de mohos	39
Cuadro VII. Índice de potencia promedio para las diferentes cepas de los mohos.....	40
Cuadro VIII. Actividad enzimática de lacasa comercial (proveniente de <i>Trametes versicolor</i>)	42
Cuadro IX. Parámetros de precisión para el método de determinación actividad enzimática de Lacasa comercial (<i>Trametes versicolor</i>) en el equipo Bio-TEK® Synergy™ HT	44
Cuadro X. Partículas del endospermo y pericarpio de diferentes fracciones de BGC sobre una línea de referencia de 0,2 mm de ancho.	67
CuadroXI. Micelios de mohos de interés creciendo sobre APD acidificado..	68

Resumen

Gutierrez Pacheco, Arturo

Valorización de bagazo de granos cerveceros de una micro cervecería a través de la producción de la enzima ligninolítica lacasa por un moho, mediante una fermentación en medio sólido

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos- San José, Costa Rica

Las lacasas son un grupo de enzimas de tipo oxidasas, las cuales catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos como compuestos fenólicos, lignina y aminas aromáticas. Su valor comercial deriva de su capacidad de remediación ambiental y aplicación comercial, inclusive se pueden emplear en varias operaciones de la industria alimentaria como la clarificación y envasado. La elaboración de cerveza genera varios residuos y en Costa Rica la mayoría de estos son desechados sin aprovecharse. El más voluminoso es el Bagazo de Granos Cerveceros (BGC), una mezcla húmeda de granos molidos provenientes de una operación de maceración.

Esta investigación valorizó el BGC de una microcervecería, produciendo lacasa nativa por un moho mediante una fermentación en medio sólido. Para esto, se caracterizaron parámetros físicos y químicos del BGC provenientes de una microcervecería costarricense con el fin de evaluarlo como sustrato para una Fermentación en Medio Sólido (FMS). Se determinó que el bagazo utilizado es adecuado para este tipo de proceso fermentativo y que existen diferencias significativas ($p=0,02$) en cuanto a las propiedades funcionales de fracciones de BGC retenidas en los distintos tamices (N°8, N°16, y N°20, U.S Standard); se eligió la fracción retenida en el tamiz N°16 para la producción de la enzima lacasa.

Por otra parte, a partir de un grupo de 5 mohos se seleccionó una cepa comercial de *Pleurotus ostreatus* para la producción de lacasa nativa sobre BGC, al presentar un mayor índice de potencia ($3,1 \pm 0,7$) sobre un medio enriquecido con ácido 2, 2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS). La determinación de estos índices se realizó a partir de un análisis de imágenes digitales; los resultados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza.

En este estudio, se implementó y validó un método colorimétrico en un lector de microplacas a pH 4,5 y 405 nm utilizando ABTS como agente cromóforo. La evaluación de diferentes pH de la muestra indicó que hay diferencias significativas en este parámetro ($p < 0,0001$). Además no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad al utilizar un lector de microplacas y uno UV-VIS.

Durante los 12 días de FMS analizados, *P. ostreatus* presentó dificultades para desarrollarse (a 23°C, 80% de humedad relativa) sobre el BGC; a pesar de esto, fue posible obtener un extracto con la enzima lacasa que presentaba una actividad máxima de $29,305 \pm 0,732$ U/mg de BGC seco. Esta es una actividad enzimática interesante obtenida en condiciones de fermentación estandarizadas sin optimizar. Por último, este estudio demostró la posibilidad de valorizar el BGC para producir un extracto de lacasas nativas, empleando un microorganismo como *P. ostreatus*, a través de un proceso de FMS.

PALABRAS CLAVE:; LACASA, BAGAZO DE GRANOS CERVECEROS, FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO, ÍNDICE DE POTENCIA, DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA, ABTS, GIMP, ANÁLISIS DE IMÁGENES DIGITALES, ABTS, PLEUROTUS OSTREATUS.

Directora: Lic. Vanny Emileth Mora Villalobos. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica.

Abreviaciones y Definiciones

ABTS Ácido 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico

AID Análisis de Imágenes Digitales (“Digital image análisis”)

BGC Bagazo de granos cerveceros

CRA Capacidad de retención de agua

FMS Fermentación en Medio Sólido

FS Fermentación Sumergida

GRAS “Generally Recognized as Safe”

LBM Medio Basal para la modificación de lignina- (“Lignin modifying basal medium”)

MPB Mohos de Pudrición Blanca

PCH Punto crítico de humedad

UCR Universidad de Costa Rica

1. Justificación

La cerveza suma el 86% del volumen de las bebidas alcohólicas consumidas en Costa Rica, considerándose como la bebida alcohólica más popular entre los costarricenses. Se pronostica que su tasa compuesta de crecimiento anual continuará creciendo por 7% para alcanzar 225 millones de litros en el 2025. Costa Rica también ha emulado la creciente tendencia internacional en cuanto a la producción de cerveza artesanal y aunque Florida Bebidas S.A domina el mercado, 26 cervecerías artesanales se han inscrito con la Asociación de Cerveceros Artesanales de Costa Rica (Euromonitor International, 2021).

A pesar de que pueden encontrarse en diferentes etapas de desarrollo y logrando diferentes volúmenes de producción (Fernández, 2017), todas las cervecerías están produciendo residuos sólidos en la forma de bagazo de granos cerveceros (BGC). La cuantificación de este residuo del proceso puede alcanzar valores de hasta dos kilogramos de desecho húmedo por cada diez litros de cerveza producida (Buffington, 2014). Los retos asociados a la logística de transporte y el manejo de la susceptibilidad a descomposición microbiológica han llevado a que los análisis de costo-beneficio para el aprovechamiento de los residuos no sean rentables (Buffington, 2014) y este se realice de forma muy rudimentaria. En el mejor de los casos es vendido como pienso animal, lo que concuerda con investigaciones realizadas en la Universidad de Costa Rica (UCR) sobre su composición nutricional para este fin (Esquivel, 2002), dejando de lado sus propiedades funcionales.

Para enfrentar el reto que involucra la valorización de este subproducto, se propone utilizar fermentación en medio sólido (FMS) para producir enzimas lacasas. La FMS es una antigua y común técnica de procesamiento de alimentos que ha figurado por miles de años en los procesos de productos originarios de culturas asiáticas, como el “miso” de soya. Esta técnica se vale del crecimiento de microorganismos, usualmente mohos filamentosos, sobre un sustrato humectado. Estos organismos saprófitos degradan su medio de crecimiento mejorando su calidad nutricional y sensorial mediante la acción enzimática (Chikthimmah & Karavally, 2010). Producir enzimas a través de FMS se considera altamente eficiente, sostenible y amigable con el ambiente (Dhillon, Kaur, Brar, & Verma, 2012); de hecho se ha

comprobado que la producción de lacasa por un hongo de pudrición blanca en medio sólido resulta ser hasta 50 veces más barato que la producción realizada en medio sumergido (Osma, Toca-Herrera & Rodríguez-Couto, 2011).

La lacasa es una enzima que se considera de gran importancia para llevar a cabo procesos industriales más “verdes” (industria alimentaria, biorremediación y biorrefinería lignocelulósica). La utilidad de la lacasa fúngica se basa en la capacidad de generar reacciones óxido reductivas capaces de degradar compuestos resilientes como lignina, micotoxinas (Rami, 2008 ; Vanhoutte *et al.*, 2016), colorantes sintéticos (Miele, Giardina, Sannia & Faraco, 2010) y algunos pesticidas (Singh Arora & Kumar Sharma, 2010). Esta enzima ha figurado en investigaciones realizadas por la UCR como herramienta biotecnológica para la descontaminación de plaguicidas en sistemas de biopurificación y de lodos de industrias (Ulate, 2004). A pesar de esto, falta investigación a nivel local sobre las múltiples aplicaciones que tiene la lacasa para la industria alimentaria.

La lacasa expresada por *Aspergillus oryzae* es considerada como segura para el consumo humano (“GRAS” por sus siglas en inglés) desde el 2003 (FDA, 2018). Versiones purificadas de esta ya se comercializan para evitar el sabor a corcho en vinos y prolongar vida útil de la cerveza al actuar como secuestrador de oxígeno (Mate & Alcalde, 2016). Su uso figura dentro de las estrategias para aumentar rendimientos, lograr características sensoriales particulares y prolongar la vida útil de productos (Rosales, Pazos & Sanromán, 2018), pudiendo ser utilizada en la misma industria cervecera. Se ha observado como un extracto crudo de lacasa obtenido de bagazo de granos cerveceros, los cuales fueron colonizados por un moho de pudrición blanca, mejoró la capacidad floculante y las características sensoriales en una cerveza; estos resultados fueron similares a los obtenidos cuando se aplicó un aditivo comercial (Singh, *et al.*, 2012).

Por otra parte el BGC es un sustrato lo suficientemente nutritivo para ser utilizado en un proceso de fermentación en medio sólido (Panesar *et al.*, 2016; Lynch, Steffen, & Arendt, 2016; Pandey, Soccol & Mitchell, 2000). Su alto contenido de ácido ferúlico (Ikram, Huang, Zhang, Wang & Yin, 2017; Skendi, Harasym & Galanakis, 2018; Vieira, Teixeira & Ferreira, 2016) es uno de los factores que vuelven el bagazo de granos cerveceros un interesante

sustrato de producción de lacasa. Se ha comprobado que este compuesto fenólico es un inductor de la expresión de lacasa en un gran número de mohos (Baldrian, 2006; Piscitelli *et al.*, 2011). También se reconoce la presencia de trazas de cobre como una característica deseable para propiciar la expresión de la metaloenzima lacasa por mohos (Piscitelli *et al.*, 2011), el cual se ha detectado a nivel de trazas en BGC (Muthusamy, 2014).

El uso de mohos filamentosos para FMS es común y recomendable ya que las condiciones de proceso se asemejan a su entorno natural (Rodríguez-Couto, 2016). Para este proyecto se propone evaluar mohos con capacidad de expresión de lacasa conocida y mohos aislados de residuos agroindustriales, a partir del supuesto que las cepas de mohos silvestres tienen un mayor potencial de adaptación al sustrato al provenir de ambientes más estresantes (Gomes, Silva, Pereira & Ladino-orjuela, 2016). Se espera que ambos grupos sean capaces de expresar enzimas ligninolíticas para degradar de forma natural esta materia orgánica (Lynch *et al.*, 2016). Generar información sobre estas cepas disponibles podría permitir identificar microorganismos autóctonos y particularmente aptos para valorizar residuos agroindustriales mediante la producción de enzima lacasa.

Existen varias estrategias para mejorar la producción de la enzima lacasa: aislar cepas nuevas; expresión de genes específicos en otros microorganismos; optimización de medios de crecimiento o el uso de inductores o estimuladores de expresión genética (Osma, Toca-Herrera & Rodríguez-Couto, 2011). Este estudio evaluó el potencial de cepas silvestres de mohos y el uso de ácido ferúlico como un inductor naturalmente presente en el sustrato de interés para la expresión de la enzima lacasa. Además, a nivel comercial se ha observado que el costo del medio de crecimiento representa la contribución más importante para el valor de producción de la lacasa (Osma, Toca-Herrera & Rodríguez-Couto, 2011). Emplear el BGC, en lugar de medios sintéticos o inertes, permite su valorización y aprovechamiento, por lo cual es necesario generar información sobre el potencial de este sustrato en FMS para la producción de la enzima.

La disponibilidad de agua para el microorganismo fermentador es una condición crítica para el éxito de la fermentación (Soccol *et al.*, 2017); la capacidad de retención de agua y punto crítico de humedad son indicadores de la cantidad y forma en que los residuos

agroindustriales retienen agua. El establecimiento de rangos aceptables de estos, junto con la presencia de nutrientes para el microorganismo, son esenciales para lograr la FMS (Flores *et. Al*, 2014). Por esta razón, se eligen estos parámetros así como la composición nutricional del BGC como información vital para valorizarlos efectivamente a través de una FMS (Yazid, Barrena, Komilis & Sánchez, 2017).

Este proyecto pretende dar valor al bagazo de granos cerveceros al producir las lacasas fúngicas nativas mediante el proceso biotecnológico de FMS, generando información para que las cervecerías puedan reconocer el valor de este sustrato y tener conocimiento de los microorganismos y parámetros de proceso en la producción de las lacasas. Eventualmente, las mismas cervecerías serían capaces de producir extractos enzimáticos crudos a partir de sus propios residuos y aplicarlos a sus procesos para prevenir olores indeseables, mejorar sabor y evitar la formación de compuestos enturbiantes durante el enfriamiento y almacenamiento de la cerveza (Dhillon, Kaur, Brar, *et al.*, 2012).

2. Objetivos:

2,1 Objetivo general:

Valorizar el bagazo de granos cerveceros de una microcervecería, produciendo lacasa nativa por un moho mediante una fermentación en medio sólido.

2,2 Objetivos específicos:

1. Evaluar la capacidad de retención de agua, punto crítico de humedad y características nutricionales particulares del bagazo de granos cerveceros, proveniente de una microcervecería, para su utilización como sustrato en una operación de fermentación en medio sólido para la producción de lacasa.
2. Seleccionar, de un grupo de mohos, uno que sea eficiente en la expresión de la enzima lacasa para su utilización como microorganismo fermentador de bagazo de granos cerveceros.
3. Implementar un método analítico para la cuantificación de actividad enzimática de la lacasa proveniente de una fermentación de bagazo de granos cerveceros.
4. Cuantificar la actividad de enzima lacasa producida por un moho definido durante la operación de fermentación en medio sólido, empleando bagazo de granos cerveceros como sustrato y bajo condiciones de proceso determinadas.

3. Marco Teórico

3.1. Bagazo de granos cerveceros y otros desechos de la industria cervecera

El proceso de producción de cerveza consiste en la fermentación de mosto hervido proveniente de granos cerveceros. La mezcla de cereales de la que se extrae el mosto es mayoritariamente cebada malteada de dos variedades: *Hordeum vulgare* y *Hordeum distichon*. Dependiendo del estilo de cerveza intencionado se agregan a la mezcla “malts especiales” (malts sometidos a procesos de tostado particulares) u otros granos como el trigo (*Triticum aestivum*), la avena (*Avena sativa*) o centeno (*Secale cereale*) (Howe, 2020). Los desechos producidos durante la producción cervecera se observan en los recuadros rojos de la Figura 1 (García, Stone, & Rahimifard, 2019):

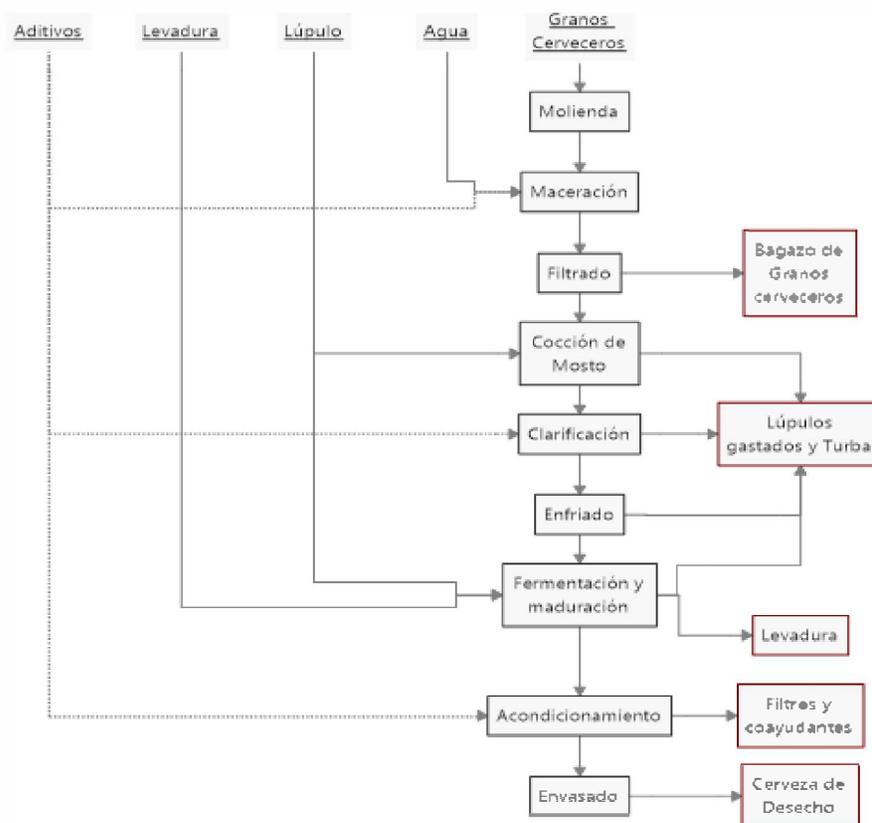


Figura 1. Esquema de generación de residuos (recuadros rojos) durante producción de cerveza. (Elaboración propia)

Durante el filtrado del mosto a través de la cama de granos se retiene el BGC. Este consiste en una mezcla de todos los compuestos insolubles y solubles retenidos. Este material remanente luego de producir el mosto es el residuo más voluminoso del proceso (Skendi, Harasym, & Galanakis, 2018; Vieira, Teixeira, & Ferreira, 2016) con cerca del 85% del volumen total de residuos obtenidos durante el proceso de elaboración de cerveza (Buffington, 2014). Esto resulta en una cama de material lignocelulósico de composición variable (Cuadro I) constituido en gran proporción por cáscaras fibrosas (celulosa, lignina y hemicelulosa) proteína y azúcares fermentables.

Cuadro 1. Composición química de bagazo de granos (Lynch, 2016).

Component	Kanauchi et al. 2001 (86)	Santos et al. 2003 (7)	Carvalho et al. 2004 (87)	Silva et al. 2004 (88)	Mussatto and Roberto 2006 (8)	Celus et al. 2006 (16)	Xiros et al. 2008 (27)	Jay et al. 2008 (89)	Robertson et al. 2010 (19)	Waters et al. 2012 (9)	Meneses et al. 2013 (18)
Hemicellulose (arabinoxylan)	21.8	n.d.	29.6	41.9	28.4	22.5	40	n.d.	22-29	22.2	19.2
Cellulose	25.4	n.d.	21.9	25.3	16.8	0.3	12	31-33	n.d.	26.0	21.7
Starch	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	2.7	10-12	2-8		
Protein	24	31	24.6	n.d.	15.2	26.7	14.2	15-17	20-24	22.1	24.7
Lignin	11.9	16	21.7	16.9	27.8	n.d.	11.5	20-22	13-17	n.d.	19.4
Lipids	10.6	3.0-6.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13	6-8	n.d.		
Ash	2.4	4.0	1.2	4.6	4.6	3.3	3.3	n.d.	n.d.	1.1	4.2
Phenolics	n.d.	1.7-2.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.0	1.0-1.5	0.7-0.9		

All values expressed in g per 100 g dry material (% w/w); n.d., not determined.

Este residuo presenta un gran potencial al considerarse microbiológicamente estable en su punto de producción. Las temperaturas (entre 65 °C y 72 °C) y tiempos (1 hora o más) de la operación de maceración favorecen una microbiota inicial de bacterias aeróbicas termofílicas. En poco tiempo también es posible detectar el desarrollo de bacterias micro y anaerobias. Posteriormente, el residuo es altamente susceptible al deterioro por mohos y levaduras, presentes en el ambiente de procesamiento. En algunas cervecerías es común mezclar los residuos por lo que en ocasiones se podrían estar inoculando el BGC con levaduras de las purgas de fermentadores (Robertson *et al.*, 2010).

3.2. Valorización convencional de Bagazo de Granos de Cerveceros

La industria cervecera ha procesado el BGC para su venta o reincorporado componentes del mismo en el proceso de fabricación de cerveza como estrategias de valorización de este

residuo. En algunos casos, este puede venderse como sale de la olla de maceración (77%-81% de humedad), también se han aplicado operaciones de prensado (promedio de 67% de humedad) o secado posterior (aproximadamente 10% de humedad). Se ha reincorporado en el proceso el líquido proveniente del prensado de los granos, ya sea como concentrado o licor de granos de cerveza (siempre que se apliquen procedimientos de cocción o clarificación respectivamente). El licor se puede vender a un mejor precio que el BGC húmedo para alimentación animal (Huige, 2010; Mussatto, Dragone, & Roberto, 2006).

La posible valorización del BGC fuera de esta industria se observa en la Figura 2, esta incluye: producción de energía a través de combustión o generación de biogás (Mussatto *et al.*, 2006), bioetanol (Buffington, 2014), procesamiento para alimentación humana y animal (Huige, 2010; Ikram, Huang, Zhang, Wang, & Yin, 2017; Mussatto, Dragone, & Roberto, 2006; Skendi *et al.*, 2018) o extracción de compuestos funcionales (Fărcaș *et al.*, 2016; Skendi *et al.*, 2018). Además se han considerado en la producción de ladrillos o como medio adsorbente, y se ha estudiado para retener compuestos orgánicos volátiles de emisiones gaseosas o plomo y cadmio de soluciones acuosas (Mussatto *et al.*, 2006).

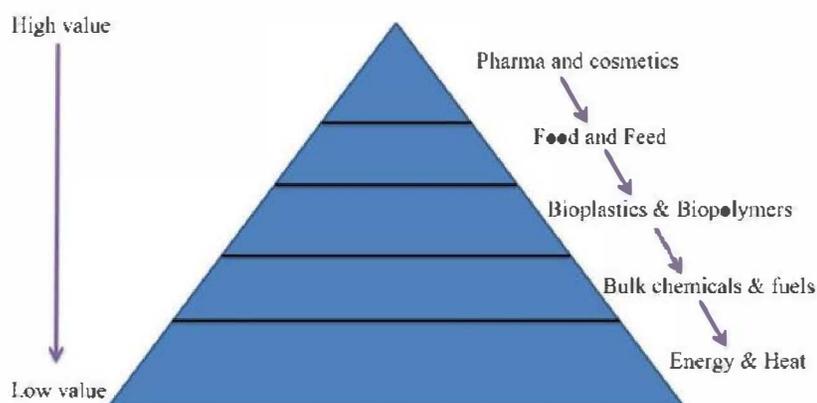


Figura 2. Cascada de biomasa por Peter Westermann, Copenhagen Institute of Technology (Buffington, 2014)

Valorizar el BGC conlleva muchas dificultades. El reto logístico, al ser un producto perecedero, y costo de trasiego han limitado los esfuerzos para aprovechar este residuo. El aprovechamiento de compuestos funcionales como todos los materiales lignocelulósicos, es difícil ya que se deben extraer de entre el resistente material vegetal (Buffington, 2014). A

pesar de los beneficios en términos de fibra y contenido de proteína, la incorporación de este subproducto a gran escala en alimentos humanos es limitado por las características sensoriales resultantes (Huige, 2010). Por estos motivos la estrategia más común de valorización de los BGC es la alimentación animal (García *et al.*, 2019; Lynch *et al.*, 2016), aunque enviarlo a vertederos no es una práctica inusual (Kerby & Viresekoop, 2017). De igual forma, esto aún puede implicar un gasto para la cervecería, dependiendo de su ubicación y volumen de producción (Kerby & Viresekoop, 2017).

3.3. Aprovechamiento biotecnológico del BGC

La FMS de BGC puede llevarse a cabo sobre un medio desprovisto de agua libre a diferencia de la fermentación líquida (o sumergida FS), que requiere de un medio generalmente a base de agua (donde también se han usado el BGC ampliamente) (Hashemi, Razavi, Shojaosadati, & Mousavi, 2011; Hassan, Tiwari, Williams, & Jaiswal, 2020; Wolters, Schabronath, Schembecker, & Merz, 2016; Xiros, Moukouli, Topakas, & Christakopoulos, 2009; Ribau Teixeira *et al.*, 2020).

Los BGC se han empleado como sustrato único para la FMS (Khidzir *et al.*, 2010; Singh Arora & Kumar Sharma, 2010; Dhillon, Kaur, Brar, & Verma, 2012; Fernandes, Salgado, Peres, Teles, & Belo, 2019; Stoffel *et al.*, 2019) o en mezclas (Mussatto *et al.*, 2006; Gregori, Švagelj, Pahor, Berovič & Pohleven, 2008 ; Lynch *et al.*, 2016), donde se obtiene tanto el soporte como nutrientes requeridos por los microorganismos, lo que puede reducir el costo del proceso de FMS de manera radical (S. Rodríguez, Rosales, Gudín, & Sanromán, 2004).

La FMS se considera en la valorización de residuos ya que la mano de obra involucrada requiere de menos entrenamiento para ser efectiva y que los costos son menores en el mantenimiento del entorno, control de la temperatura y materia prima. Además la producción de enzimas resulta ser una opción particularmente interesante ya que su concentración suele ser mucho mayor a la producida por FS (Gopalan & Nampoothiri, 2016). Adicionalmente la FMS fúngica tiende a ser menos susceptible a problemas de inhibición metabólica y resulta en enzimas generalmente más estables a rangos amplios de temperatura y pH. El tiempo de fermentación tiende a ser menor y el peligro de que enzimas de interés sean degradadas por proteasas es mínimo (Kosseva, 2013).

Bacterias y mohos son utilizados como agentes biotecnológicos en FMS para producir enzimas con actividades muy distintas (Khidzir *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2020). Se ha estudiado la expresión enzimática de géneros *Bacillus* (Pollegioni, Tonin, & Rosini, 2015), *Streptomyces*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Lynch *et al.*, 2016) utilizando BGC, aunque la aplicación industrial de lacasas bacterianas es limitada debido a su bajo nivel de expresión y eficiencia catalítica (Nunes & Kunamneni, 2018). Los mohos y levaduras son productores enzimáticos particularmente interesantes ya que al manipular condiciones de cultivo o agregando inductores se puede propiciar la sobre expresión de isoenzimas particulares con características bioquímicas definidas (Sharma *et al.*, 2018; Velázquez *et al.*, 2014; Wosten, Scholtmeijer, & Vries, 2007).

El BGC favorece el crecimiento de mohos al tener un alto contenido de proteína, humedad y propiedades físicas, como tamaño de partícula, proporción de volumen/peso, densidad específica, porosidad y capacidad de retención de agua adecuadas (Mussatto *et al.*, 2006). Este sustrato también se ha utilizado para la producción de cepas comestibles de géneros como *Pleurotus*, *Agrocybe*, *Lentinus* (Mussatto *et al.*, 2006) *Auricularia*, *Agaricus* (Stoffel *et al.*, 2019) o *Hericium erinaceus* (Skendi *et al.*, 2018), así como en la producción de otros metabolitos además de enzimas como lo son ácidos orgánicos, biopesticidas, biosurfactantes, bioetanol y compuestos aromáticos (Yazid *et al.*, 2017).

3.4. Los mohos filamentosos en la producción de enzimas lacasa

La degradación de una matriz sólida es un bioproceso liderado por enzimas que se adsorben en sitios accesibles para suplir al microorganismo con nutrientes, liberados a través de la hidrólisis enzimática (L. Wang, Liu, & Chen, 2018). Se ha observado que las enzimas oxidoreductoras, entre las que se encuentra la lacasa, son capaces de actuar sobre sitios de difícil acceso a través de mediadores; estas son moléculas de un menor tamaño que permiten la acción sobre sitios no accesibles (Sharma *et al.*, 2018). En la figura 3 se muestra una representación del modo de acción de la enzima lacasa.

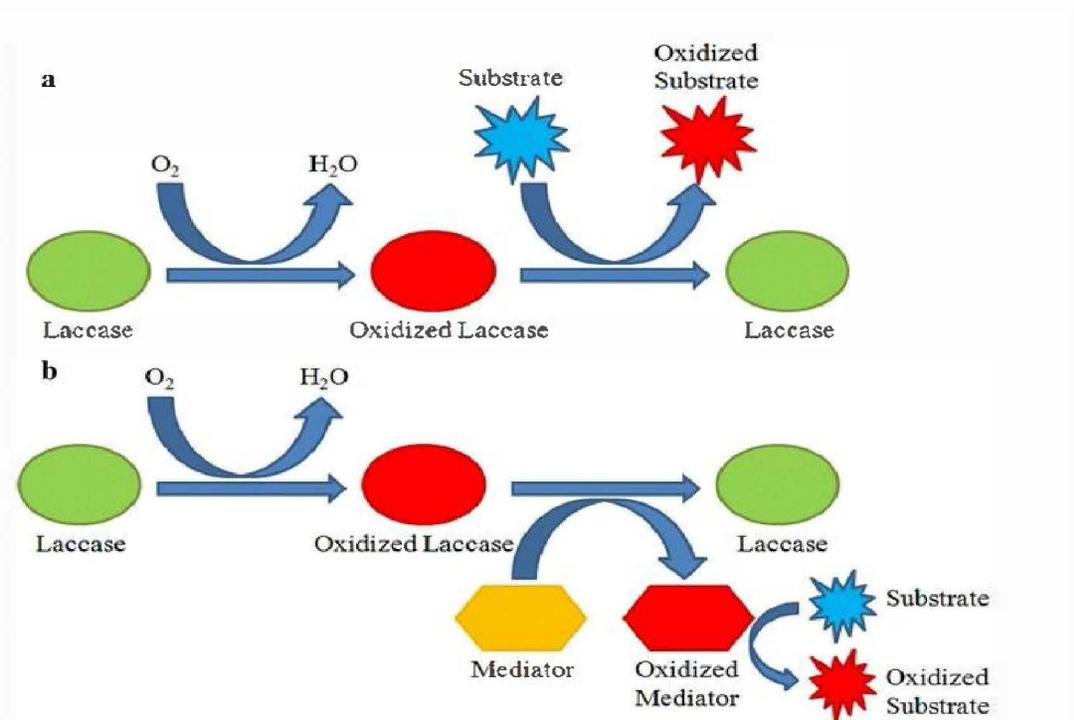


Figura 3. Representación esquemática de la reacción catalizada por lacasa, a. oxidación directa: el sustrato se oxida al radical correspondiente como resultado de la interacción y b. oxidación indirecta: el sustrato se oxida en presencia de un mediador (Agrawal Chaturvedi, & Verma, 2018).

Los mohos capaces de degradar madera, se dividen coloquialmente en mohos de pudrición “blanca” o pudrición “café” según el efecto visual que tienen sobre madera en descomposición (Peralta *et al.*, 2017). Ambos han sido estudiados en cuanto a su producción de lacasa aunque los de pudrición blanca son los más interesantes por su capacidad de degradación de lignina (Ning *et al.*, 2016). Además de la degradación de lignina se considera que la secreción de lacasa es una respuesta fúngica básica a la presencia de condiciones antagónicas por ejemplo como respuesta a otros microorganismos, xenobióticos, metales, toxinas y compuestos biológicamente activos (Janusz *et al.*, 2020).

Las lacasas (bencendiol: oxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) forman parte de la familia de enzimas ligninolíticas junto con las peroxidasas. Solamente entre el 2010 y 2017 se publicaron más de dos docenas de revisiones de literatura científica que abarcan desde su ocurrencia, propiedades bioquímicas, posibilidad de inmovilización, aplicaciones (Yang *et al.*, 2017), determinación analítica, mediación, inducción, inhibidores, producción en

distintos tipos de fermentaciones y estrategias de purificación (Forootanfar & Faramarzi, 2015). A la fecha, más de 150 isoformas de lacas se han aislado y caracterizado (Nunes & Kunamneni, 2018). Estas enzimas catalizan la oxidación de varios sustratos reduciendo el oxígeno molecular a agua, a través de una transferencia concomitante de cuatro electrones (More *et al.*, 2011).

A pesar de que las lacasas ocurren naturalmente en plantas, insectos, líquenes y bacterias, su potencial redox es menor a 500 mV (Arregui *et al.*, 2019), mientras que las de origen fúngico son particularmente interesantes al demostrar un mayor potencial redox (Sharma *et al.*, 2018) que rondan entre los 400 mV y 700 mV (Glazunova, Trushkin, Moiseenko, Filimonov, & Fedorova, 2018), o hasta de 800 mV (Frasconi, Favero, Boer, Koivula, & Mazzei, 2010; Mikolasch & Schauer, 2009); lo que les confiere una acción degradativa más amplia, ya que les permite oxidar sustratos grandes (colorantes o lignina) o compuestos monofenólicos resistentes que requieren de potenciales mayores a los 700 mV (Glazunova *et al.*, 2018) sin la necesidad de mediadores. Esto se denomina transferencia electrónica directa (Aleksejeva, Mateljak, Ludwig, Alcalde, & Shleev, 2019), aunque su efectividad siempre se puede ver potenciada por el apoyo de mediadores (Agrawal, Chaturvedi, & Verma, 2018; Forootanfar & Faramarzi, 2015; Sharma *et al.*, 2018).

Las lacasas fúngicas normalmente son proteínas glicosiladas con una masa molecular de entre 50-140 kDa. Comúnmente son monoméricas aunque se han reportado estructuras dimericas (Ning *et al.*, 2016) y multiméricas (Agrawal *et al.*, 2018). Las lacasas se han categorizado en blancas o amarillas dependiendo de la configuración y propiedades de sus sitios activos (Agrawal *et al.*, 2018). La presencia de grupos funcionales nucleofílicos, especialmente en la posición ortho de anillos aromáticos, afecta proporcionalmente la afinidad de compuestos fenólicos con la lacasa (Dwivedi, Singh, Pandey, & Kumar, 2011) y la acidez del medio de reacción es particularmente importante en cuanto a la afinidad de compuestos no fenólicos con lacasas (Kolomytseva *et al.*, 2017).

Las mayores barreras para la aplicación industrial de enzimas suelen ser el costo y la falta de disponibilidad de estas, con características específicas para mantener una actividad adecuada bajo las condiciones del proceso (Panesar, Kaur, Singla, & Sangwan, 2016;

Rodríguez-Couto, 2016). Las fuentes nativas podrían no responder a la demanda industrial ya que normalmente cada organismo es capaz de producir varias isoenzimas con características distintas; la estrategia de aislar una isoenzima de interés aumenta los costos, asumiendo que no se encuentra silenciada y se expresa abundantemente (Arregui *et al.*, 2019). Procurar el organismo correcto al mercado meta es una de las consideraciones más importantes que un proveedor de enzimas tiene que realizar (Gopalan & Nampoothiri, 2016).

3.5. Bioprospección

En la bioprospección se buscan y desarrollan nuevas fuentes de compuestos químicos, recursos genéticos, microorganismos, macroorganismos y productos valiosos de la naturaleza como una forma de comercializar la biodiversidad (Paterson & Lima, 2017). Es difícil y rara vez rentable para el sector industrial (Paterson & Lima, 2017) ya que aislar cepas comercialmente interesantes de la naturaleza es un proceso tedioso que requiere inversión de tiempo y recursos en términos de reactivos y horas (Gopalan & Nampoothiri, 2016). A pesar de esto, es importante considerar que se estima que solamente entre un 3% y 8% de las especies de mohos han sido descubiertas y descritas (Hawksworth & Lücking, 2017), de ahí la importancia de hacer bioprospección empleando prácticas de selección de microorganismos, incluyendo una caracterización genética de las cepas (Linnakoski *et al.*, 2018).

Una bioprospección efectiva de mohos filamentosos se basa en buscar ambientes similares a los de la aplicación esperada de los productos enzimáticos, esta estrategia ha sido aplicada en países con una alta biodiversidad como Brasil (Vicente, Teixeira de Souza, Celestino, Jessyca, & Walter, Simplicio de Souza, 2017) Colombia (Arboleda, Mejía, Franco-Molano, Jiménez, & Penninckx, 2008), Cuba (Sánchez-López *et al.*, 2008) y Borneo (Hadibarata & Yuniarto, 2020). Hay numerosos reportes de cepas de mohos productoras de lacasa aisladas del ambiente de manera exitosa, por ejemplo *Marasmiellus palmivorus*, aislado de hojas de piña (Chenthamarakshan *et al.*, 2017) y *Aureobasidium pullulans* NAC8 de suelo con materia orgánica en descomposición (Ademakinwa & Agboola, 2016), por lo

que también hacer bioprospección de mohos con potencial biotecnológico particularmente en la producción de lacasas en Costa Rica es un aspecto que debe ser considerado.

3.6. Métodos para la identificación de actividad de la lacasa

Tradicionalmente se ha utilizado agares suplementados con compuestos cromóforos para seleccionar cepas con capacidad de expresar enzimas oxido reductivas como método cualitativo (Sarria-Alfonso *et al.*, 2013; Mali, Kuuskeri, Shah, & Lundell, 2017). La descomposición de colorantes resistentes presentes en un medio sólido también permite discernir cepas productoras de enzimas ligninolíticas con alto potencial redox (Schalchli *et al.*, 2017), mientras que los métodos espectrofotométricos son de gran utilidad para caracterizar las actividades de extractos a diferentes condiciones (pH y temperatura) y así poder responder a condiciones definidas de proceso (Kolomytseva *et al.*, 2017).

Otra estrategia es el uso de un índice de potencia de actividad enzimática, que relaciona el tamaño de la colonia y el halo producido por la acción del compuesto de interés; es similar al método tradicional de agares suplementados con agentes cromóforos pero permite realizar un análisis cuantitativo de la capacidad del microorganismo para secretar el compuesto que se desea (Forootanfar, Faramarzi, Shahverdi, & Yazdi, 2011). Hasta hace poco, la evaluación de este tipo de análisis obligaba a los investigadores a recurrir a valores discretos como resultados para reducir la subjetividad al analizar la coloración o decoloración observada (Eichlerová, Homolka, Žifčáková, *et al.*, 2015) y dependía de la homogeneidad de forma de la colonia (López-Gómez *et al.*, 2019).

3.7. Evaluación de procesos de crecimiento y expresión de lacasa

El monitoreo del desarrollo de biomasa y estado fisiológico del microorganismo es necesario para lograr optimizar los procesos de FMS (Abdul & Webb, 2017). Sin embargo, el uso de mohos dificulta este seguimiento ya que se adhieren al sustrato y es sumamente difícil separarlos. Esto ha resultado en que la estimación de la biomasa normalmente sea compleja, tediosa y poco precisa (Taidi, Khalil, & Kurek, n.d.; Abdul & Webb, 2017). El

Cuadro 2 resume algunas características de las distintas categorías de métodos disponibles para estimar la biomasa en procesos de FMS.

Cuadro 2. Resumen de las categorías de métodos para estimar la biomasa en FMS (Traducida de Abdul & Webb, 2017).

Categoría	Comentarios
Medición de componentes celulares que no están presentes dentro de la matriz sólida	La mayoría de los componentes celulares no se detectan de manera proporcional a la masa celular durante las etapas de desarrollo. Extracción tediosa, consume mucho tiempo. Reactivos y químicos costosos, químicos fuertes, preparación de soluciones tampón
Medición de componentes de biomasa probablemente presentes en matriz sólida y biomasa	Es difícil diferenciar el origen de componentes encontrados en la biomasa. Interferencia con sustratos ricos en proteína. No hay definición certera de concentración de biomasa. Extracción tediosa, consume mucho tiempo. Reactivos y químicos costosos, químicos fuertes, preparación de soluciones tampón.
Medición de otros metabolitos secundarios	La mayoría de los componentes celulares no se detectan de manera proporcional a la masa celular durante las etapas de desarrollo. No siempre relacionada a crecimiento. Extracción tediosa, consume mucho tiempo. Reactivos y químicos costosos, químicos fuertes, preparación de soluciones tampón
Medición de actividad metabólica	La tasa de consumo de oxígeno (OUR), tasa de evolución de dióxido de carbono (CER), y técnicas de evolución de calor metabólico son las más fáciles de operar en línea. No hay un proceso de muestreo regular. Muestra potencial de desarrollo. La producción metabólica es proporcional a la concentración de biomasa pero puede variar a través del tiempo. Siempre relacionada al crecimiento. Requiere de equipo costoso y software especializado. Requiere calibración constante.
Medición de imágenes a través de microscopio u observación directa	Intensa en cuanto a mano de obra, consume tiempo, células se adhieren a matriz sólida causando problemas de daño, requiere tiempo. Microscopio tiene una mayor resolución que microscopios convencionales. Adecuado si se utiliza un sustrato artificial
Medición de biomasa de la matriz sólida	Adaptada para mohos solamente, separación completa de biomasa es difícil. Adecuado a unos cuantos casos, especialmente práctico en estudios de escala de laboratorio

Los métodos no destructivos de determinación son los más interesantes para el monitoreo del proceso, por ejemplo el análisis de imágenes digitales (López-Gómez *et al.*, 2019), medición de capacitancia (Botella, Hernandez, & Webb, 2019) y respirometría (Torres-Mancera *et al.*, 2018). Particularmente el AID analiza las áreas y cambios de color en superficies de interés a un bajo costo mediante el uso de una computadora, con esto se puede evaluar el crecimiento superficial de un sistema. Para poder utilizar la información recopilada por una cámara es importante considerar como la iluminación afecta la intensidad percibida de colores, por lo que es vital estandarizar la iluminación a la hora de tomar las imágenes de las muestras (López-Gómez *et al.*, 2019).

Se han utilizado imágenes a color para monitorear el desarrollo de colonias de mohos, sus densidades (López-Gómez *et al.*, 2019), patrones y morfologías (Taidi *et al.*, n.d.; Barry & Williams, 2011) y desarrollo de biomasa, evaluando la efectividad de métodos de inoculación (Manan & Webb, 2018; Guowei, Lili, Yufeng, & Hailei, 2019). También es posible utilizar AID para caracterizar el medio de crecimiento, cuantificando de esta manera la condensación en superficies o la misma biomasa. La capacidad de monitorear y regular parámetros relacionados, en particular actividad de agua es esencial para lograr el desarrollo pleno del microorganismo (Agarwal, Kumar, Varadwaj & Tiwari, 2020).

Para el procesamiento de las imágenes digitales se puede utilizar cualquier programa de edición de imágenes. El uso del histograma en estos programas brinda información sobre la cantidad y tipo de píxeles presentes en la imagen o porción seleccionada de esta (López-Gómez *et al.*, 2019). El análisis se puede potenciar realizándole transformaciones a la imagen o utilizando programas como MATLAB que aplica algoritmos para transformar y analizar la imagen (Taidi *et al.*, n.d.; Agarwal, Kumar, Varadwaj & Tiwari, 2020). En esta investigación se empleó el AID que aumenta la sensibilidad y permite realizar análisis estadísticos (López-Gómez *et al.*, 2019).

3.8. Determinación analítica de la actividad de las enzimas lacasa

Por motivos de sensibilidad y simplicidad, normalmente se recurre a ensayos espectrofotométricos para cuantificar la actividad lacasa (T. Wang, Xiang, Liu, Chen, & Hu, 2017), estos utilizan indicadores fenólicos y no fenólicos y monitorean los subproductos oxidados por la lacasa con el fin de identificar la presencia de la enzima o determinar cuantitativamente su actividad. Los sustratos comúnmente empleados (figura 4) son guayacol, 2,6-dimethoxyphenol (2,6 DMP), syringaldazina o ácido 2,2'- azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS) (Hommes, Gasser, Ammann, & Corvini, 2013)(Forootanfar & Faramarzi, 2015).

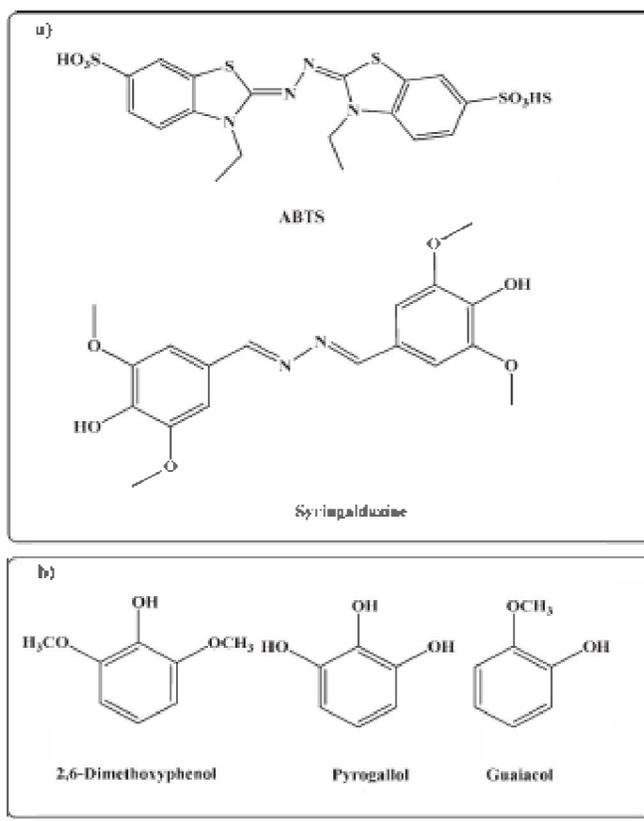


Figura 4. Estructuras químicas de sustratos a) no fenólicos y b) fenólicos de lacasa utilizados para la determinación de su actividad enzimática (Forootanfar & Faramarzi, 2015).

El ABTS ha probado ser hasta tres veces más sensible que 2,6 DMP y 40 veces más sensible que los demás sustratos (guaiacol, syringaldazina) (Eichlerová, Homolka, Žifčáková, *et al.*, 2015). Por otra parte, al utilizar syringaldazina el producto oxidado es insoluble en medio acuoso volviéndolo menos fiable (Farnet, Ferre, Gil, & Gastaldi, 2010), mientras que el 2,6 DMP y estructuras similares se pueden polimerizar al ser catalizado por lacasas con altos potenciales redox, como es el caso de las lacasas de origen fúngico (Wan, Du, & Miyakoshi, 2008). Recientemente se está empleando un derivado de resourfin, denominada “amplex red”, para una determinación fluorimétrica altamente sensible. Aun así compuestos que presentan un mayor potencial redox, como el ABTS, son más adecuados para evaluar la actividad de lacasas de interés industrial (T. Wang *et al.*, 2017).

3.8.1. Determinación de la actividad lacasa con ABTS

Se debe considerar que las reacciones oxidoreductivas son poco específicas. El ABTS es un compuesto que se puede oxidar dos veces, resultando en una primera forma denominada catión $ABTS^{*+}$ (color verde con absorbancia máxima en $\lambda=417$ nm) y en una segunda forma que corresponde al dicatión $ABTS^{2+}$ (color rojizo con absorbancia máxima en $\lambda=518-520$ nm) (Gramss, 2017). Ambas formas se consideran relativamente estables, pero electroquímicamente reversibles. Como se mencionó anteriormente, el alto potencial de la primera oxidación del ABTS, 0,61 V contra el electrodo estándar de hidrógeno (Scott, Chen, Bakac, & Espenson, 1993), es lo que lo hace útil para la cuantificación de actividad de enzimas potencialmente interesantes para la industria.

La inexactitud a la hora de estimar la actividad enzimática de lacasa empleando ABTS se atribuye principalmente a la gran cantidad de potenciales sustratos y la formación de complejos $ABTS-ABTS^{*+}$. Este complejo genera una subestimación espectrofotométrica a un 75%-78% de la cantidad de ABTS oxidado presente en soluciones de trabajo con una concentración entre 1 y 5 mM de ABTS. Por este motivo se ha recomendado realizar la medición en la presencia de al menos 1 mM de ABTS y aplicando un factor de corrección de 1,33 (Johannes & Majcherczyk, 2000).

La posible subestimación de la actividad se ha atribuido a inhibidores como compuestos capaces de secuestrar (agentes quelantes) o sustituir (metales pesados) el cobre del sitio activo de las lacasas, desnaturalizarla y la naturaleza reducible del ABTS oxidado. La susceptibilidad de la lacasa a inhibición depende de manera importante del microorganismo de origen e isoenzima en cuestión (Forootanfar & Faramarzi, 2015). Entre los inhibidores confirmados de lacasa se destaca la azida de sodio (NNa_3) (Johannes & Majcherczyk, 2000). La reducción del ABTS se debe a una baja energía de activación que se puede dar con numerosos compuestos fenólicos. Monitorear la reducción de ABTS^{*+} en ensayos para determinar la capacidad antioxidante es una de las tres metodologías más citadas en la base de datos SCOPUS (Ilyasov, Beloborodov, Selivanova, & Terekhov, 2020). Esto es particularmente relevante dependiendo de la muestra de interés. Por ejemplo para analizar muestras de suelos sería pertinente emplear un indicador no susceptible a ser reducido debido a la presencia de ácido tánico y húmico (como el amplex red) (T. Wang *et al.*, 2017). Estos compuestos son capaces de reducir el ABTS radical formado por la actividad de la lacasa induciendo un error negativo en la cuantificación de actividad enzimática (Terrón *et al.*, 2004; Forootanfar & Faramarzi, 2015).

3.9. Análisis colorimétrico

Las características espectrofotométricas del ABTS y sus versiones oxidadas se utilizan para realizar ensayos colorimétricos. La actividad enzimática de lacasas se puede calcular empleando la Ley de Beer-Lambert, ecuación 1 (Solís-Oba, Ugalde-Saldívar, González, & Viniegra-González, 2005).

$$A = \varepsilon * C * d \quad (1)$$

Donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de extinción molar, (L/ mol cm), C es la concentración del compuesto absorbente y d es la distancia recorrida (cm). De acuerdo con esta, la concentración de un compuesto tiene una correlación lineal a su absorbancia a una longitud de onda definida y recorrido fijo, ecuación 2.

$$C = \frac{A}{\varepsilon * d} \quad (2)$$

Para un cálculo certero es preciso conocer la distancia recorrida por el haz de energía. Esto resulta en un reto para los equipos en que la distancia recorrida no es fija, como los lectores de microplacas. En estos equipos es necesario medir o calcular la distancia en cada pocillo antes de poder aplicar la ley de Beer-Lambert para calcular la concentración de un compuesto en solución (Lampinen, Raitio, Perälä, Oranen, & Harinen, 2012). Esto también aplica para el coeficiente de extinción molar, otro de los componentes de la Ley de Beer-Lambert.

Este coeficiente (ϵ) depende del pH, temperatura del medio, fuerza iónica de la mezcla de reacción, al igual que la solución tampón y absorbancia máxima de la sustancia (Forootanfar & Faramarzi, 2015). Posiblemente por esto se han empleado una gran cantidad de coeficientes de extinción para calcular la actividad enzimática para ensayos colorimétricos que utilizan el ABTS. Se han reportado valores de ϵ entre $2,93 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (a 436 nm) y $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (420 nm), todos trabajando en medios con un pH entre 4 y 5 (Solís-Oba *et al.*, 2005). Inclusive se ha utilizado un coeficiente de $4,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH de 4,5 en buffer 0,05 M citrato/0,1 M fosfato o 10 mM de acetato (Ander & Messner, 1998). El valor utilizado más ubicuamente es $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para 417 nm a pH de 5 empleando numerosos buffers (Belšak-Šel, Gregori, Leitgeb, Klinara, & Čelan, 2015 ; Karp *et al.*, 2015) o pH 6 con el buffer B&R (Alcalde & Bulter, 2003).

3.10. Factores que determinan la producción de lacasas en la FMS

La producción de cualquier metabolito va a depender de una combinación del medio de crecimiento y el microorganismo utilizado (Rodríguez-Couto, 2016). El medio de crecimiento se puede modificar de varias maneras mientras que el microorganismo solamente se puede elegir a partir del conocimiento disponible o generado a partir de pruebas preliminares. Diferentes pretratamientos mejoran la accesibilidad de los nutrientes para los microorganismo favoreciendo su colonización, estos pueden ser físicos (reducción de tamaño) (L. Wang *et al.*, 2018), químicos (digestión ácida o alcalina que resultan en cambios en la composición química) y biológicos (como el co-cultivo de mohos de interés con otras especies o inclusive especies de bacterias y levaduras) (Yang *et al.*, 2017).

3.10.1. Físicos

Los parámetros físicos del sustrato determinan la disponibilidad de oxígeno durante la fermentación, indispensable para la actividad metabólica de los mohos (L. Wang *et al.*, 2018). La porosidad de un sistema de FMS no se mantiene constante durante el proceso debido al crecimiento del micelio. Sin embargo, en sistemas pequeños es posible que no se den cambios significativos en la porosidad del medio conforme aumenta la biomasa siempre y cuando se mantenga la humedad constante (Karimi, Shojaosadati, Hejazi, Vasheghani-farahani, & Hashemi, 2014). Se ha registrado que la porosidad de BGC molido a 500 mm es de un 30,14% (Mladenović *et al.*, 2018).

Por otra parte, la reducción del tamaño de partícula contribuye a una mayor área de superficie del sustrato, haciendo más biodisponibles sus nutrientes y potenciales compuestos inductores, por lo que inclusive puede resultar en diferencias en las enzimas secretadas y la degradación final del sustrato (L. Wang *et al.*, 2018). De hecho, se ha registrado que la proporción geométrica y tamaño de fibras de bagazo de caña molido generaron un impacto diferenciado en la expresión de lacasa por parte de dos cepas de *P. ostreatus* (Membrillo, Sánchez, Meneses, Favela, & Loera, 2008). Trabajar con fracciones demasiado finas podría generar un impacto indeseable en la transferencia de masa y energía, reduciendo la disponibilidad de oxígeno para el moho e inhibiendo la actividad metabólica si aumenta la temperatura el medio; ambos efectos se vuelven más difíciles de controlar en condiciones industriales donde se trabaja con mayores volúmenes de sustrato (L. Wang *et al.*, 2018).

3.10.2. Químicos

La cantidad y disponibilidad de agua para el microorganismo fermentador es un parámetro crítico para el éxito de la fermentación (Soccol *et al.*, 2017), esta es un solvente para perpetuar el metabolismo celular donde cantidades inadecuadas pueden desacelerar o detener completamente el mismo. Además cumple una función estructural donde estabiliza biopolímeros, asegura la permeabilidad de las membranas e interconecta moléculas

intracelulares (Agarwal, Kumar, Varadwaj & Tiwari, 2020). La capacidad de retención de agua (CRA) y punto crítico de humedad (PCH) son indicadores de la cantidad y forma en que los residuos agroindustriales retienen agua. Ambos índices, junto con la presencia de nutrientes para el microorganismo, son esenciales para lograr la FMS (Flores *et al.*, 2014). La CRA indica la habilidad del sustrato para absorber agua y depende de la disponibilidad de grupos hidrofílicos y la capacidad de sus macromoléculas de formar geles, normalmente se busca valores de CRA altos para sustratos destinados a FMS. El PCH representa la cantidad de agua enlazada al material que no es utilizable por el microorganismo por lo que se prefieren valores bajos de este parámetro (J. J. Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2017; Mladenović *et al.*, 2018; Orzua *et al.*, 2009). Debido a estos parámetros las levaduras y hongos son los microorganismos más aptos para procesos de FMS ya que se pueden desarrollar en medios con una menor cantidad de agua, con valores de a_w entre 0,6 y 0,7 (Londoño *et al.*, 2020)

Otros factores químicos, como los inductores e inhibidores, deben considerarse para el proceso fermentativo, los inductores pueden potenciar la capacidad hiperproductiva de los mohos, por ejemplo la presencia de metales, antioxidantes y compuestos xenobióticos. En cuanto a la producción específica de enzima lacasa se ha constatado el efecto inductor de compuestos fenólicos y no fenólicos como ácido gálico, ferúlico xylicidina, guaiacol, syringaldazina, etanol, fenol y alcohol veratryl (G. S. Dhillon *et al.*, 2012; Forootanfar & Faramarzi, 2015). El cobre es el inductor más utilizado y mejor comprendido, aun en casos donde no induce su producción se especula que este metal estabiliza el centro catalítico de la enzima. (Yang *et al.*, 2017). La adición moderada de surfactantes, como Tween 80, al sustrato es común en estos estudios ya que incrementan la biodisponibilidad de sustratos poco solubles, aumentan la permeabilidad de oxígeno y transporte de enzimas extracelulares (Barba, Assumpc, Silveira, & Ju, 2016).

Numerosos artículos han confirmado la presencia de diferentes cantidades de compuestos fenólicos, principalmente ácido ferúlico y p-coumarico en el BGC (Fărcaș *et al.*, 2016; Ilram *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2016). En cebada estos se encuentran en la cáscara y los ácidos hidroxycinnamicos en las paredes celulares, lo que la convierte en una fuente potencialmente

valiosa y económica de ácidos fenólicos (Pompeu *et al.*, 2018). El ácido ferúlico es un inductor de la enzima lacasa en numerosas especies de mohos (Baldrian, 2006; Piscitelli *et al.*, 2011), por lo que resulta un residuo agroindustrial apto para investigar su producción.

3.10.3. Biológicos

El o los microorganismos elegidos y sus estrategias de colonización del sustrato son de los factores más importantes para la producción exitosa de lacasa (Mladenović *et al.*, 2018). Los mohos se pueden inocular en la forma de esporas o micelio viable. A nivel comercial es común preferir un inóculo de micelio (10% en peso del sustrato a colonizarse) al ser más reproducible ya que utiliza un solo clon en el proceso productivo (Barba *et al.*, 2016). Los procesos donde el sustrato es inoculado con esporas tienen una eficiencia dependiente de la carga y homogeneidad del inóculo (Manan & Webb, 2018), en especial la concentración de inoculación es uno de los factores que se deben optimizar, por ejemplo Hardik Pate, Gupte & Gupte, (2009) encontraron que para *Pleurotus sp* este parámetro resultó ser un factor significativo en la producción de enzima lacasa observada (Hardik Patel, Gupte, & Gupte, 2009).

En la naturaleza hay interacciones secuenciales de microorganismos donde la competencia o disponibilidad de metabolitos podrían inducir una sobreexpresión de la lacasa (Bhardwaj, Kumar, Agrawal, & Verma, 2019). Este efecto es dinámico y altamente dependiente del tiempo por lo que su estudio es complejo (Mali *et al.*, 2017). A pesar de esto, se han llevado a cabo estudios donde se registra que al algunas combinaciones de cocultivo de microorganismos resulta en una sobreexpresión de lacasa (Oliveira Rodrigues *et al.*, 2020).

4. Materiales y Métodos

4.1. Localización del proyecto

La sección experimental del proyecto se realizó en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). La caracterización física del BGC se llevó a cabo en los

laboratorios de química del CITA y de la Escuela de Tecnología de Alimentos (ETA). El secado y molienda de este residuo agroindustrial se realizó en la planta piloto del CITA.

El análisis de azúcares del BGC lo realizó el laboratorio de química del CITA, el contenido de minerales fue realizado por el Laboratorio de Análisis Foliare del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), mientras que la determinación de lignina la realizó el Centro de Investigación de Nutrición Animal (CINA). Todas estas instalaciones se ubican en la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, en San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

4.2. Materias primas:

Se utilizó el BGC obtenido luego de la producción de cerveza estilo golden ale, comercializada como “Pico Blanco” por la Cervecería Escazú. Esta empresa maquila la producción de cerveza en una planta ubicada en La Uruca, San José. Se utilizaron como sustratos, muestras de un mínimo de 10 kg de residuos de lotes de producción que fueron recolectados durante el 2020. Los residuos se mantuvieron en refrigeración por no más de dos semanas antes de su secado. Se aplicaron las siguientes operaciones para su acondicionamiento:

Secado

El BGC se secó con el secador de aire caliente marca National. El proceso se llevó a cabo en la cabina de este equipo a 65°C por aproximadamente 36 horas (de las cuales cerca de 15 fueron secado activo). Esta operación se realizó sobre bandejas con una capa no mayor a 2 cm de grosor del residuo agroindustrial. La humedad se redujo por debajo de 10% lo cual permite estabilizar este residuo para su almacenamiento y posterior uso (Lynch *et al.*, 2016). Las muestras secas fueron almacenadas en bolsas de polipropileno y luego en cajas plásticas cerradas hasta que se realizaron los análisis respectivos o experimento de FMS.

Tamizado

La materia prima de cada lote se sometió a un fraccionamiento por tamizaje con un juego de tamices US. Standard. Se utilizaron los platos N°8 (2,882 mm), N°16 (1,807 mm) y N°20 (1,027 mm), las fracciones retenidas se conservaron separadas para su análisis.

Almacenamiento

Cada fracción se almacenó a temperatura ambiente en bolsas de polipropileno hasta su análisis o uso en FMS. Se comprobó que las fracciones mantuvieran una humedad menor a 10% previo a su uso, para asegurar que estuvieron estables durante el almacenamiento (Lynch *et al.*, 2016).

4.3. Determinación de propiedades funcionales del bagazo de granos cerveceros

La capacidad de retención de agua (CRA) y punto crítico de humedad (PCH) se evaluaron sobre las tres fracciones de cada lote de bagazo de granos cerveceros secos. Para cada análisis se realizó un mínimo de 3 réplicas, se reportaron promedios con un intervalo de confianza al 95%.

Se analizaron los promedios utilizando una distribución T-student con un alfa de 0,05 y cuando fue necesario se compararon los promedios empleando la prueba de Tukey-Kramer.

Capacidad de Retención de Agua:

Se agregaron 15 mL de agua destilada a 1,250 gramos de cada fracción de interés. Se mezclaron por 10 minutos a una velocidad baja con una pastilla magnética para asegurar una hidratación completa del residuo. Se colocó la mezcla en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 18,000 g por 10 minutos (Flores-Maltos *et al.*, 2014). El sobrenadante se decantó y se pesó el gel resultante en una balanza semi analítica. La CRA se calculó de la siguiente manera (3).

$$CRA = \frac{\text{peso de gel (gramos)}}{\text{peso de residuo seco (gramos)}} \quad (3)$$

Punto Crítico de Humedad:

Se siguió el método descrito por Flores-Maltos *et al.* (2014) modificando la masa analizada. Se tomaron por triplicado muestras de aproximadamente 0,5 gramos del gel formado en la prueba de CRA; se realizaron tres repeticiones por gel. Para la determinación se utilizó el analizador termogravimétrico TGA 701 marca Leco . Las muestras se colocaron en crisoles de cerámica sin cubierta para ser analizados durante 1 h 30 min. Este análisis consistió en 30 min de rampa térmica, de 3 °C por minuto, y 1 h a 120 °C. La masa inicial fue determinada por la balanza interna del TGA, el cual determina la humedad perdida durante el análisis. A partir de los datos obtenidos se calculó el PCH como se indica en la ecuación (4):

$$PCH = \left(\frac{\text{masa humedad perdida}}{\text{masa inicial}} \right) * 100 \quad (4)$$

4.4. Determinación de características nutricionales del BGC

Los análisis se realizaron sobre mezclas de partes iguales de las fracciones retenidas en el tamiz N°16 y N°20 para cada uno de los lotes de BGC, se emplearon estas fracciones al ser tamaños estudiados para FMS en otros residuos agroindustriales (Membrillo *et al.*, 2008). Se caracterizó el BGC por su contenido de azúcares simples (fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa), azúcares complejos (lignina) y composición elemental (nitrógeno, carbono, potasio, calcio, magnesio, fósforo, sulfuro, hierro, cobre, zinc, manganeso y boro).

El contenido de lignina detergente ácido se realizó según el método AOAC 973,18. Se aplicó un análisis de humedad de materia seca a 135 °C, como se indica en AOAC 930,15. Se analizaron muestras de 500 g por lote.

El nitrógeno total se determinó por combustión seca en un autoanalizador N-exceed. Los demás minerales se cuantificaron por digestión húmeda con HNO₃ y determinación por espectrometría atómica con plasma de acuerdo con el Método-ICP. El contenido de proteína cruda de los sustratos se calculó a partir del nitrógeno determinado empleando un factor de 6,25 (Sánchez & Royese, 2001).

4.5. Microorganismos estudiados

Se incluyeron microorganismos de tres fuentes, en el caso de los mohos de pudrición blanca, su capacidad de expresión de lacasa es reconocida (Rodríguez-Couto, 2016).

1. Colección del Laboratorio de Microbiología del CITA: 2 mohos aislados a partir de residuos agroindustriales (Proyecto 735-B7-059 “Valorización de subproductos agroindustriales mediante FMS para la producción de enzimas de uso alimentario”).
2. Colección del CIA: *Pleurotus* sp., de la colección de mohos mantenida por el CIA provenientes de Pennsylvania State University Mushroom Culture Collection.
3. Biofungi SA: *Pleurotus ostreatus* y *Leninula edodes*, conocido también como hongo Shiitake.

4.5.1. Mantenimiento de mohos

Se mantuvieron respaldos de todos los mohos utilizados en el estudio a temperatura ambiente sobre tubos inclinados de agar papa dextrosa (APD) y en refrigeración sobre placas APD acidificadas. Los respaldos mantenidos en refrigeración fueron subcultivados cada tres meses, como mínimo, para mantener su actividad (Osma *et al.*, 2011). Previo a cualquier evaluación se realizaron subcultivos a una temperatura controlada de 23 °C por siete días sobre APD a pH de 3,5 (Schalchli *et al.*, 2017). El micelio de cada cepa se obtuvo cortando 1 cm² del extremo de colonias aisladas que presentaban una morfología rizomorfa (Stamets & Chilton, 1983).

4.5.2. Determinación de índice de potencia de mohos

Para estudiar la eficiencia de expresión de lacasa de los mohos de interés y seleccionar el moho que se utilizó en la fermentación, se determinó el índice de potencia (Teck Nam, Gek Chen, & Adeline Seak, 2010). Este correspondió a la variable respuesta en un diseño experimental factorial completo. Este diseño factorial constó de tres niveles para el factor “tiempo de crecimiento” (días 3, 6 y 10 de crecimiento) y 5 niveles (la cantidad de cepas

viables) para el factor “moho”. El índice de potencia se calculó como la proporción entre el área del halo y el área de la colonia formada, como lo indica la ecuación (6). Las mediciones del halo y la colonia se tomaron a partir de un análisis de imágenes digitales, ver sección 4,5,2,1.

$$\text{Índice de Potencia} = \frac{\text{Área de tinción}}{\text{Área de colonia de moho}} \quad (6)$$

La composición del medio basal para la detección de enzimas modificadoras de lignina (LBM, por sus siglas in inglés) se muestra en el Cuadro III. Este se preparó según lo indicado por Pointing (1999), exceptuando únicamente la adición del sulfato de manganeso. Esta mezcla se esterilizó (15 min a 121 °C) y se mantuvo refrigerada para la posterior preparación de medio. Para la preparación del medio, el agar y ABTS se agregaron antes de autoclavar, mientras que la solución de glucosa estéril se integró justo antes de chorrear las placas. Dada la naturaleza quimio-organotrófica de los mohos y su necesidad de carbohidratos para su crecimiento (Walker, 2018), el LBM contiene glucosa, que también se encuentra presente en el sustrato de forma natural (Dhillion, 2012). La señal de inicio de síntesis de las lacasa está dada por la presencia del ABTS en el medio, el desarrollo de una coloración verde-azulada en la placa indica la presencia de la enzima lacasa y un mayor tamaño de este halo refleja una mayor actividad (Teck Nam, Gek Chen, & Adeline Seak, 2010)

Cuadro III. Composición del agar LBM a ser utilizado para la evaluación de producción de lacasa y enzimas interferentes al ser suplementado con ABTS (Pointing, 1999).

Ingrediente	Concentración (g/L)
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,001
Fe(SO ₄) ₃	0,001
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,01
Extracto de levadura	0,01
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5
C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆ (Tartrato de amonio)	0,5
KH ₂ PO ₄	1
Glucosa	2
Agar	16

Se utilizaron placas Petri desechables (8 cm de diámetro) con aproximadamente 20 mL de medio LBM suplementado con ABTS. Se realizaron pruebas de crecimiento sobre estas inoculando cada una de las cepas de interés en el centro de cada placa con aproximadamente 5 mm² de micelio. Cada tratamiento se evaluó por triplicado. Las placas se incubaron a 23 °C (Bavaro *et al.*, 2017), por un periodo de diez días tomando las imágenes en los días especificados anteriormente.

Se realizó un análisis de varianza, con una confianza del 95%, y los diagnósticos pertinentes para validar el modelo obtenido. A partir de los resultados se seleccionó el moho que fue utilizado para la producción de lacasa por FMS sobre el BGC.

4.5.2.1. Análisis de Imágenes Digitales, AID

La toma de imágenes digitales se realizó con una cámara de 13 megapíxeles y resolución de 4128 x 3096 píxeles. Estas se tomaron bajo condiciones de iluminación estandarizadas (Figura 10, sección de anexos) (López-Gómez *et al.*, 2019). Se usaron en formato “.jpg” de tamaño no mayor a 4 KB. El AID se realizó empleando el software libre Gimp versión 2.10.2, el cual permite la manipulación de fotografías, dibujos u otro tipo de imagen digital en forma de mapa de bits (UCR; 2020). Las imágenes analizadas parten de un tamaño de 3088 x 3088 píxeles con resolución de 300 x 300 píxeles en un espacio de color Red-Green-Blue (RGB). Estas se almacenaron en el archivo nativo de GIMP (.xcf). Se utilizaron las herramientas detalladas en el cuadro IV para el procesamiento y análisis de las imágenes.

Cuadro IV. Herramientas de GIMP 2.10.2 utilizadas en el AID de mohos creciendo en agar LBM en los días 3 6 y 10.

Herramienta	Modos activados	Modos desactivados	Observaciones
Selección Elíptica	Guías	Fijo Alisado Difuminado Encoger selección automáticamente Expandir desde el centro Muestra combinada	Se utilizó para elegir el área de la imagen (agar en placa) a ser analizada.
Seleccionar regiones continuas ("varita mágica")	Vecinos Diagonales Rango de 36 Eligiendo por composición	Alisado Difuminado Elegir áreas transparentes Muestra combinada	Se utiliza para elegir regiones de micelio y halo de coloración para contar la cantidad de pixeles que estos abarcan.
Seleccionar por colores	Promedio de muestra: Radio 40 pixeles	Alisado Difuminado Elegir áreas transparentes	Se utilizó para determinar un color de referencia para determinar el umbral del halo.

Para el análisis de las imágenes digitales se utilizó el frente de la placa y superficie de crecimiento para determinar el tamaño del micelio mientras que la imagen del reverso para determinar el tamaño del halo de coloración. El histograma se usó como herramienta de conteo pixeles, de áreas seleccionada o porciones de la imagen. Debido a que el halo de coloración tiene un gradiente hacia los bordes se generó un pixel con coloración de referencia para cada moho estudiado, así fue posible distinguir el umbral del halo de forma reproducible. Se determinó el color del pixel de referencia de coloración a partir de un promedio de 18 muestras del área umbral.

4.6. Determinación de la actividad enzimática por el Método ABTS

Consistió en la medición de la cinética de formación de un complejo coloreado verde producto de la actividad enzimática del sustrato y el ABTS. Se observó un aumento en la absorbancia a 405 nm debido a la formación del producto de oxidación del ABTS, que posee una coloración verde. La formación de este compuesto es un indicador de la acción oxidoreductiva de la enzima lacasa (Rodríguez-Couto, 2004).

Una unidad de actividad enzima (U) equivale a la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 umol de ABTS en 1 minuto. La actividad enzimática lacasa se expresa en

micromoles de producto formado por minuto por litro de extracto ($\mu\text{mol/L}$). Para obtener los parámetros se midió el incremento de A_{418} por tres minutos (Zhu, Bao, & Huang, 2016; Alcalde & Butler 2003).

4.6.1. Estandarización del método analítico seleccionado

Para la estandarización, se utilizó un estándar de lacasa proveniente del moho de pudrición blanca *Trametes versicolor* (Sigma Aldrich, CAS: 80498-15-3). Se siguió el método propuesto por Alcalde y Bulter (2003), realizando modificaciones al buffer universal descrito. Este utiliza una mezcla de ácidos 0,1 M (bórico, acético y fosfórico) a la que se le adiciona hidróxido 0,5 M de sodio para llevar a un pH de 6. Para cuantificar actividad enzimática proveniente de una FMS se evaluó la robustez del método a dos pH diferentes valores de pH, un pH 3 (Karp *et al.*, 2015) y un pH 4,5 (Forootanfar *et al.*, 2011).

Las determinaciones iniciales de los cambios realizados al método se hicieron en un espectrofotómetro UV-VIS (UV-1700 PharmaSpec); determinando el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (Bustamante & Carrascal, 2010) de las lecturas a 418 nm. Cada valor de pH (3, 4,5 y 6) fue evaluado por triplicado y utilizando una misma disolución de lacasa.

Los resultados fueron analizados estadísticamente. Se analizaron estos con el programa JMP® 9.0.2. Se realizó una prueba “t” de Student de dos colas empleando un nivel de confianza del 95%, para determinar si existen diferencias significativas entre los valores de pH.

4.6.2. Optimización del análisis de actividad enzimática en el lector de microplacas Bio-TEK® Synergy™ HT.

Se optimizó el análisis de las muestras trasladando las mejores condiciones estandarizadas en el espectrofotómetro UV/Vis a un lector de microplacas Bio-TEK® Synergy™ HT. Este equipo procesa múltiples muestras simultáneamente con un volumen de

trabajo menor por lo que se logró reducir el uso de reactivos y tiempo de análisis aumentando la eficiencia del análisis.

Se realizó un análisis de varianza sobre el promedio de la actividad enzimática del estándar de lacasa procesada por triplicado en ambos instrumentos para asegurar que no existe diferencia significativa al trabajar con volúmenes reducidos en el lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm (Siguemoto & Gut, 2017). Se empleó el programa estadístico JMP® 9.0.2 para llevar a cabo la prueba “t” de Student, de dos colas, sobre los datos empleando un nivel de confianza del 95%.

Los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad del método se estimaron calculando el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (Bustamante & Carrascal, 2010) de una muestra analizada por triplicado tanto en el UV como en el lector de placas. Las determinaciones de repetibilidad se llevaron a cabo el mismo día mientras que la reproducibilidad se evaluó en dos días diferentes.

Las determinaciones analíticas finales (cinéticas y análisis de muestras) se realizaron en el lector de microplacas multi-detector Bio-TEK. La velocidad de lectura de las placas de 96 pozos, es de 14 segundos. El equipo cuenta con un sistema de control de temperatura por convección (que lo hace apropiado para ensayos cinéticos), los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente 23 °C y el equipo se controló a través del software de análisis de datos Gen5™.

4.6.3. Condiciones estandarizadas de fermentación

Las fermentaciones se llevaron a cabo utilizando una mezcla homogénea compuesta por los lotes de sustratos analizados previamente, con el fin de minimizar la variabilidad debida al sustrato. Luego de autoclavarse durante una hora a 121 °C las fracciones más interesantes de BGC se mezclaron en un beaker de 500 ml con medio humectante en condiciones asépticas para reducir la posibilidad de contaminación.

El medio humectante consistió en agua destilada con sulfato de cobre (Barba *et al.*, 2016). El medio humectante se agregó para lograr una humedad mínima del 65% en el

sustrato (Yazid *et al.*, 2017). La humedad inicial de la fermentación se confirmó antes de comenzar los experimentos en aproximadamente 1 gramo del sustrato humectado (por quintuplicado) con una balanza de humedad.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en contenedores acrílicos rectangulares, compuestos por una base y una tapa (Figura 5) de 4,0 cm x 5,0 cm x 2,8 cm (largo, alto y ancho). Se llenaron las secciones inferiores de la cápsula (36 cc) con aproximadamente 10 gramos de sustrato para realizar la fermentación. Se aseguró un ambiente aerobio para la fermentación manteniendo un espacio de cabeza (20 cc) dentro de la cápsula al colocar una cuña que evitó que las cápsulas se cerraran completamente.



Figura 5. Contenedores acrílicos utilizados como unidades de fermentación.

El sustrato humectado se inoculó con una porción de 25 mm² del extremo de colonias del moho en crecimiento que presentan una morfología rizomorfa (Stamets & Chilton, 1983). El peso del micelio inoculado no superó un 10% del peso del sustrato (Barba *et al.*, 2016).

4.6.4. Fermentación en medio sólido (FMS)

El sustrato humectado e inoculado se fermentó a una temperatura controlada de 23 °C por doce días. Se retiraron unidades de fermentación para cuantificar la actividad de enzima lacasa a partir del tercer día. Este experimento se llevó a cabo por triplicado, para cada tiempo de muestreo. Adicionalmente se analizó un control negativo por cada tiempo de fermentación, que consistió en analizar el sustrato en una caja de fermentación sin inocular, mantenida en las mismas condiciones de incubación que las muestras inoculadas.

Para llevar a cabo la FMS en un ambiente húmedo se repartieron las carátulas de forma aleatoria en 4 contenedores plásticos. En cada caja se colocó un beaker de 50 ml lleno

de agua destilada para mantener una alta humedad relativa, estos contenedores se taparon con papel aluminio al que se le hicieron orificios. Se aseguró que la FMS se llevase a cabo en condiciones de una humedad superior al 70% midiendo la humedad relativa periódicamente con un psicrómetro digital Extech RH3000.

4.6.4.1. Cuantificación de actividad enzimática lacasa

Se realizó una extracción líquida de cada cápsula de fermentación adicionando al sustrato fermentado, 25 mL de buffer de análisis (seleccionado previamente a partir de los resultados del apartado 5,3) (Singh, Kaur, Kaur y Verma, 2012). La mezcla se homogeneizó por 5 min en vortex, antes de centrifugarse a 7500 g a 4 °C por 20 min (Karp, *et al.*, 2015). Los sobrenadantes no analizados inmediatamente se mantuvieron en congelación (-20 °C) (Ang, Ngoh, Seak, & Chua, 2013) por no más de dos semanas (Eichlerová *et al.*, 2015).

Se determinó la actividad de la enzima lacasa por sextuplicado para cada extracto de FMS y un blanco siguiendo el método propuesto por Alcalde y Bulter (2003) con las condiciones estandarizadas anteriormente (apartado 5,3). El contenido de nitrógeno de los extractos se cuantificó utilizando el analizador de nitrógeno marca Elementar, modelo Rapid N Exceed utilizando la técnica Dumas (E. Rodríguez *et al.*, 2017).

5. Resultados y Discusión

5.1. Evaluación de bagazo de granos cerveceros para su utilización como sustrato en una operación FMS

Sobre la evaluación de BGC para su utilización como sustrato en FMS, existen indicaciones generales de las características deseables en los sustratos empleados. A pesar de esto es necesario resaltar que su desempeño debe ser evaluado para cada combinación de enzima meta y microorganismo productor (Rodríguez-Couto, 2016). La cantidad y disponibilidad del agua para el microorganismo fermentador es un parámetro crítico para el éxito de la fermentación (Soccol *et al.*, 2017); la CRA y el PCH son indicadores de la cantidad y forma en que los residuos agroindustriales retienen agua. Ambos indicadores,

junto con la presencia de nutrientes para el microorganismo, son esenciales para lograr una FMS exitosa (Flores *et. al*, 2014).

Las propiedades funcionales de BGC se muestran en el Cuadro V. Los valores de PCH indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las fracciones de residuo analizadas ($p= 0,08$), mientras la CRA, presenta una diferencia significativa ($p= 0,02$); se encontró que la fracción retenida en el tamiz N° 16 presenta una CRA mayor a la fracción retenida en el tamiz N° 8 ($p= 0,02$).

Cuadro V. Promedio e intervalo de confianza de la CRA y PCH de diferentes fracciones de BGC proveniente de la producción de una pale ale artesanal.

Retenido en tamiz (US. Standard)	PCH (%) ¹	CRA (g gel/ g de masa seca) ²	Rango de tamaño de partículas en fracción (mm)
20	18,71 ± 1,20	4,13 ± 0,24 ^{ab}	0,850-1,204
16	21,13 ± 1,72	4,36 ± 0,32 ^a	1,204-2,411
8	17,76 ± 0,54	3,63 ± 0,39 ^b	2,411 <

¹Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=9

²Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=3

Letras distintas (superíndice) indican diferencias significativas entre los parámetros analizados

La reducción del tamaño de partícula incrementa la superficie del sustrato, lo que podría explicar la razón por la que la fracción retenida en el tamiz N°16 presenta una CRA significativamente mayor que la fracción retenida en el tamiz N°8. Mladenović *et al.*, (2018), reportaron una CRA de 5 g de gel/g de masa seca para BGC molido a un tamaño de partícula promedio de 0,500 mm, menor a cualquiera estudiada en esta investigación. Se ha determinado que la reducción del tamaño de fibras vegetales resultante por la molienda también puede influenciar de manera importante el perfil de actividad enzimática detectado en una FMS ya que hace más abundante la presencia de lignina en la superficie del sustrato (Membrillo *et al.*, 2008). Este efecto se puede apreciar en las fracciones estudiadas en el Cuadro XI, sección de anexos.

En términos generales el rango de CRA aceptable se encuentra entre 3,0 y 12,0 (Flores *et al*, 2014), al comparar las CRA del BGC (Cuadro V) con los reportados para otros residuos se puede determinar que el BGC es adecuado para su uso en procesos de FMS;

principalmente porque los sustratos con un valor alto de CRA permite la modificación del contenido de humedad del medio más fácilmente. Los valores obtenidos en este estudio se encuentran por debajo del valor de sustratos como el bagazo de caña (9,46) burusca de coco (12,09), (J. Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014) fibras de agave (6,6) o sotol (5,2) (Flores-Maltos *et al.*, 2014). Sin embargo, son superiores a los reportados para residuos como mazorca de maíz procesada (2,97) y tallos de candelilla (3,14) que aún se consideran aceptables para un proceso de FMS (J. Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014). La CRA del bagazo de granos cerveceros se asemeja más a residuos de higos (3,74) (J. J. Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2017) pulpa de manzana o residuos de frijol, (cercanos a 4,0) (Orzua *et al.*, 2009).

Los valores de PCH para el BGC (Cuadro V) son menores que los reportados para las fibras de sotol (26%), mazorcas de maíz (27%) y tallos de candelilla (30%) (Flores-Maltos *et al.*, 2014). Esto se considera positivo si se considera que en muchos procesos de FMS valores altos de PCH son indeseables. Residuos que muestran un PCH por encima del 40%, como la nuez de pecana o pistacho y salvado de trigo, no son recomendables para una operación de FMS utilizando *A. niger* (Orzua *et al.*, 2009). El PCH para el BGC se asemeja más al de cáscaras de coco (16%), un sustrato que se considera de gran potencial para emplearse en FMS (Flores-Maltos *et al.*, 2014).

El BGC es un sustrato altamente nutritivo para desarrollar una operación de FMS. La glucosa ($1,32 \pm 1,15$ g/100g) y maltosa ($13,2 \pm 3,15$ g/100g) presentes en el sustrato son azúcares relativamente bioaccesibles y metabolizados por mayoría de mohos filamentosos (Walker & White, 2018). Su presencia es deseable ya que la producción eficiente de biomasa se ha relacionado con la presencia de azúcares monoméricos y polisacáridos (J. Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014). La ausencia de la sacarosa ($<0,25$ g/100g) y fructosa ($<0,23$ g/100g) era esperada al no ser estos componentes normales en los granos de cerveza. Se determinó que las muestras de BSG tenían un $2,33 \pm 0,12\%$ de lignina, este contenido resultó muy por debajo de lo que indica la literatura para este tipo de sustrato 10-28% (Lynch *et al.*, 2016; Mussatto *et al.*, 2006). Esto podría estar relacionado al método empleado (AOAC 973,18); este utiliza una digestión ácida, la cual se ha documentado que puede registrar hasta 5 veces menos lignina que otros métodos como el de Klason, se recomienda modificar este método

con un filtro de microfibras de vidrio, con lo cual se aumentaría la retención de lignina dando como resultado una mejor aproximación del contenido de esta (Raffrenato y Van Amburgh, 2011).

La relación C/N y la proteína cruda son indicadores generales que se utilizan para caracterizar sustratos empleables en una FMS. El perfil nutricional de granos cerveceros varía de manera importante al producir estilos distintos de cerveza. En cervezas “lager” se ha reportado un 22,3% de proteína mientras que los provenientes de cervezas tipo “ale” presentaron un 14,9% (Robertson *et al.*, 2010). El BGC analizado mostró un promedio de proteína cruda de $16,23 \pm 0,72$. Este se considera un valor normal de acuerdo a los rangos establecidos en la literatura (Robertson *et al.*, 2010). Debido a la naturaleza heterogénea del sustrato, el muestreo del residuo analizado se hizo sólo de la capa intermedia (de las tres posibles capas obtenidas después de la operación de “lautering” o filtrado), proveniente de una cerveza tipo ale, producida con granos de menor contenido proteico (Kunze & Manger, 2004; Viëtor, Voragen, & Angelino, 1993).

La relación C/N es una característica del sustrato ampliamente estudiada y manipulada para la colonización de mohos. Este factor tiene una influencia crítica en el desarrollo del micelio y posterior fructificación. Diferentes mohos muestran preferencia por composición de sustrato y proporción de C/N para su desarrollo (Kumla *et al.*, 2020). La relación C/N de $17,6 \pm 0,9$ obtenida es deseable para la expresión de lacasas. Membrillo *et al.*, (2008) modificaron un sustrato (bagazo de caña con C/N=142) agregando sulfato de amonio para reducirlo a 20, logrando una sobreexpresión de enzima lacasa para una de las cepas de *Pleurotus* empleada. Gregori *et al.*, (2008) observaron que al agregar BGC a la formulación para lograr una C/N menor a 20, se modificaban los tipos de enzimas ligninolíticas expresadas: favoreciendo la expresión de lacasa sobre peroxidasas dependientes de manganeso. Además, relaciones de C/N de 18,3, resultaron en una mayor expresión de lacasa en el moho de pudrición blanca *Abortiporus biennis* (He, Pan, He, & Xu, 2014). Otros autores también han reportado el aumento de expresión de lacasa sobre peroxidasa al suplementarse el medio de crecimiento con nitrógeno, tanto orgánico como inorgánico (Kachlishvili, Penninckx, Tsiklauri, & Elisashvili, 2006).

El uso de este sustrato para otros propósitos podría no resultar adecuado al considerar que su relación C/N se califica como una proporción baja. Por ejemplo relaciones C/N altas (55-150 dependiendo de las especies) son valores normales utilizados para la producción agroindustrial de hongos comestibles (Kumla *et al.*, 2020). Para la eficiencia de expresión de metabolitos como la enzima lacasa, se registra una mayor cantidad de las enzimas ligninolíticas cuando se reduce la proporción de C/N con aditivos altos en nitrógeno (Kurt & Buyukalaca, 2010). Es valioso rescatar que el nitrógeno encontrado ($2,6 \pm 0,12\%$), se considera una fuente natural de proteína orgánica y que al igual que los hidrolizados de cianobacterias (Mishra & Kumar, 2007) o levaduras (Karp *et al.*, 2015) resultan más eficaces que fuentes de nitrógeno inorgánico en la promoción de expresión de metabolitos (Helina Patel & Gupte, 2016).

El contenido de macro y micronutrientes BSG se presentan en el Cuadro VI, las cantidades determinadas superan las concentraciones mínimas sugeridas por la literatura (Walker & White, 2018). Se ha probado que la composición presente en hidrolizados de este tipo de residuos, son más eficientes en propiciar la producción de biomasa que una preparaciones de azúcares y nitrógeno inorgánico equivalentes, debido a la presencia de sus micronutrientes (Helina Patel & Gupte, 2016). Sin embargo se debe tomar en cuenta la biodisponibilidad y bioaccessibilidad de los mismos en un sistema de FMS, razón por la cual en fermentaciones líquidas se utilizan hidrolizados de BGC para promover la producción de metabolitos (A. Patel, Mikes, Bühler, & Matsakas, 2018). A pesar de que los microorganismos saprófitos cuentan con las herramientas enzimáticas para poder acceder a la totalidad de los micronutrientes del sustrato, es conveniente suplementar el medio para la producción eficiente de biomasa y metabolitos de interés, principalmente con iones de potasio y magnesio biodisponible (Karp *et al.*, 2015).

Cuadro VI. Macro y micronutrientes presentes en BGC generado en la producción artesanal de cerveza estilo “pale ale” y concentración mínima para el crecimiento y desarrollo metabólico de mohos.

Ión metálico	Valor determinado en BGC¹	Concentración Mínima²	Funciones celulares principales²
P	(0,34 ± 0,02) g/100gr	n.e	Ácidos nucleicos, ATP,
K	(3,67 ± 1,15) mmol/100 gr	2-4 mmol/L	Osmorregulación, actividad enzimática
Mg	(5,35 ± 4,41) mmol/100 gr	2-4mmol/L	Actividad enzimática, división celular
S	(3,67 ± 1,15) mmol/100 gr	n.e	Síntesis de aminoácidos y vitaminas
Mn	(49,8 ± 5.6,6) umol/100 gr	2-4 umol/L	Cofactor enzimático
Ca	(1912,9 ± 144.1,1) umol/100 gr	< 1umol/L	Mensajero secundario
Cu	(9,4 ± 0,0) umol/100 gr	1-5 umol/L	Reacciones Redox
Fe	(123,6 ± 5.4,4) umol/100 gr	1-3 umol/L	Proteínas, citocromos
Zn	(56,6 ± 4,0) umol/100 gr	2-8 umol/L	Actividad enzimática, estructura proteica
Ni	n.d	10 umol/L	Actividad ureasa
Mo	n.d	1,5 umol/L	Metabolismo de Nitratos, Vitamina B12
Co	n.d	0,1 umol/L	Cobalamina, coenzima

¹ Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=3 (CIA-UCR).

² Relacionadas a levadura (*S.cereviceae*), son dependientes de especie/cepa condiciones de crecimiento, pero son aplicables para condiciones generales de crecimiento de mohos. Traducido de (Walker & White, 2018).

n.e-No especificado

n.d- No determinado

5,2 Selección de moho eficiente en la expresión de enzima lacasa.

Se encontró que durante la selección del moho más eficiente en la expresión de enzima lacasa, los cinco mohos evaluados mediante el índice de potencia indujeron un cambio en la coloración del medio. La generación del color verde oscuro resulta de la oxidación del ABTS (Mali, Kuuskeri, Shah, & Lundell, 2017), por lo que se confirma que todas las cepas evaluadas produjeron lacasas. Las cepas *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* y *L. edodes* mostraron actividad desde el momento en que se inocularon. Esto no se considera dentro del experimento, sin embargo evidenciaron que son capaces de expresar la enzima de interés en medios de crecimiento como agar papa dextrosa acidificado en este caso (Pointing, 1999).

Se encontró que el efecto de la cepa de moho utilizado fue el único factor significativo sobre el desarrollo de índice de potencia, ($F(30) = 9,76$, $p < 0,0001$) y que los dos factores “día” y la interacción entre “cepa de moho” y “día” no fueron estadísticamente significativos ($p=0,5826$ y $p=0,2964$, respectivamente). Esto permite identificar a las cepas de género *Pleurotus sp.* como la más adecuadas a partir de su desempeño (Cuadro VII).

Cuadro VII. Índice de potencia promedio para las diferentes cepas de los mohos.

Cepa de moho	Promedio de índice de Potencia
<i>Pleurotus ostreatus (comercial)</i>	3,1 ± 0,7 ^a
<i>Pleurotus populinum</i>	2,7 ± 0,9 ^a
<i>Lentiula edodes</i>	1,4 ± 1,1 ^b
B1 ²	0,4 ± 1,5 ^{bc}
B4 ²	0,3 ± 1,5 ^c

¹Datos expresados como promedio con su desviación estándar. Letras distintas (superíndice) indican una diferencia significativa al analizarse contra una distribución de t de student, n=6

²Códigos de identificación de los mohos silvestres provenientes del proyecto 735-B7-059

Estos valores concuerdan con los reportados para *P. sajor-cajú*, que mostraron índices de potencia de 2,74 en el día 4 y 2,65 en el día 6 (Teck Nam *et al.* 2010), y con *P. ostreatus* quién expresó la lacasa de forma mayor y más expedita que *L. edodes* (Montoya & Levin, 2015).

La selección de la subespecie de *Pleurotus* a utilizarse puede considerarse como parámetro la producción de biomasa, ya que en una FMS es necesario separar el metabolito

de interés de la biomasa desarrollada. Por esta razón, una mayor cantidad de biomasa complica la separación y purificación de la enzima (Teck Nam *et al.*, 2010). Hay evidencia de que varias cepas de la especie *P. populinum* desarrollan una mayor cantidad de biomasa respecto a *P. ostreatus* (Ruiz-Rodríguez, Polonia, Soler-Rivas, & Wichers, 2011; Sobal, Martínez-Carrera, Moreales, & Rousos, 2007). Con base en los resultados del Índice de potencia y generación de biomasa se elige la cepa comercial del mohó *P. ostreatus* sobre la cepa de referencia *P. populinum*. Se pueden observar diferencias en la densidad y tipo de crecimiento de los mohos en el Cuadro XII de la sección de anexos.

5,3 Implementación de método analítico para cuantificar actividad enzimática de lacasa

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre todas las actividades de lacasa comercial al evaluarse en buffers con diferentes valores de pH; existe una relación inversa entre pH y la actividad enzimática registrada (Cuadro VIII). Los resultados obtenidos concuerdan con Koschorreck *et al.*, (2008), quienes registraron cuatro diferentes isoenzimas de *Trametes versicolor* (*lcca*, *lccβ*, *lccγ* y *lccδ*.) que presentaron una actividad máxima a pH entre 1,9 y 3,1. Madzak *et al.*, (2006) también encontró que al utilizar ABTS como un sustrato para diferentes lacasas estas muestran una mayor actividad conforme se reduce el pH del medio de reacción.

El coeficiente de variación también es menor al reducirse el pH (Cuadro IX). Este comportamiento inverso se explica al promoverse la protonación de aminoácidos particulares dentro del sitio activo de la lacasa conforme se disminuye el pH. Estas cargas negativas ayudan a atraer y contener el ABTS (positivamente cargado) en sitios activos de las lacasas fúngicas (Christensen & Kepp, 2014).

Cuadro VIII. Actividad enzimática de lacasa comercial (proveniente de *Trametes versicolor*).

pH	Actividad promedio (U)	Desviación estándar (σ)	Coefficiente de variación (%)
6,0	2,247 ^a	0,455	20,26
4,5	17,747 ^b	0,890	5,02
3,0	26,003 ^c	0,646	2,48

Letras distintas (superíndice) indican diferencias significativas entre los parámetros analizados
 Nota: los promedios se presentan con un superíndice que indica una diferencia significativa al analizarse contra una distribución de t de student de dos colas, n=3 y un nivel de significancia de 0,05

En diversos estudios se emplea un pH de 5 para la determinación de la actividad enzimática de las lacasas (empleando ABTS como agente cromóforo); posiblemente este valor de pH es elegido por las condiciones experimentales posteriores en los que se evaluó la lacasa obtenida. A pH 5, Koschorreck *et al.*, (2008) registran una mayor estabilidad para las isoenzimas estudiadas y también se han realizado ensayos posteriores de degradación de colorantes (Basto, Silva, Gübitz, & Cavaco-Paulo, 2007; Dhillon, Kaur, & Brar, 2012). Por otra parte se ha observado que a pH 4 se da una mayor decolorización de varios colorantes por parte de ciertas lacasa analizadas (Rodríguez, Rosales, Gudímn y Sanromán, 2004).

Debido a esto, debe considerarse la aplicación de la enzima en la elección de condiciones de pH, por ejemplo, en procesos de elaboración de cerveza. Adicionalmente, debe considerarse que las lacasas presentan un pH óptimo distinto entre el ABTS y compuestos fenólicos (Madzak *et al.*, 2006; Christensen & Kepp, 2014). Los compuestos fenólicos, naturalmente presentes en la cerveza, al ser aportados por los granos y lúpulos empleados en el proceso (Callemien & Collin, 2010) serían los sustratos presentes en el medio donde finalmente se propone aplicar la lacasa. Debido a que la cerveza suele presentar un rango de pH entre 3,8-4,8 (Kaneda, Takashio, Tamaki, & Osawa, 1997; Vriesekoop, Krahl, Hucker, & Menz, 2012) se seleccionó un buffer ajustado a un pH de 4,5 para cuantificar la actividad enzimática en este estudio, que además presenta un bajo coeficiente de variación.

Las actividades de validación de las longitudes de onda registradas a 418 nm y 405 nm no fueron estadísticamente diferentes ($t(3,8)=2,11$ $p=0,10$), por lo que las lecturas

posteriores fueron realizadas a 405 nm. Se requirió determinar la distancia de lectura para la actividad enzimática en el Bio-TEK; esto debido a que una cubeta utilizada para medir en un espectrofotómetro UV/Vis tiene una profundidad de 1 cm, distinto a las microplacas de 96 pocillos empleadas en el Bio-TEK, donde la medición espectrofotométrica se realiza verticalmente y la geometría del pozo y la composición del líquido medido puede tener impactos considerables en el cálculo. Por ejemplo, en la determinación de la concentración de material genético, altas concentraciones ($>20 \text{ ug/ml}$) pueden reducir la distancia de lectura hasta en un 15% al afectar el menisco de la solución analizada en el pocillo (Lampinen *et al.*, 2012). La figura 6 ilustra este efecto, en el que 300 μl de muestra resulta en medidas de distancia distintas. La mezcla analizada resultó ser menos que el centímetro de alto de la microplaca, ($x=0,830 \text{ cm}$, $\sigma = 0,020$), distancia medida a través de la función ofrecida por el Bio-TEK. Se espera que la distancia de lectura de los extractos de FMS sea ligeramente menor ya que puede presentar una mayor cantidad de solutos.

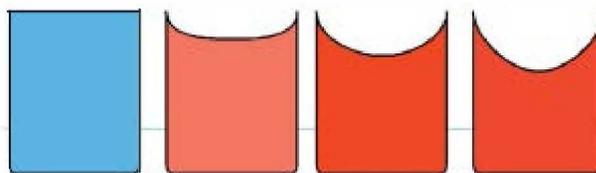


Figura 6. Efecto de la composición del buffer en el menisco formado dentro de un pozo de una microplaca de lectura de espectrofotómetros. De izquierda a derecha: agua, buffer TE, buffer Tris de alta concentración y buffer de acetato. (Lampinen *et al.*, 2012)

Las actividades enzimáticas medidas en ambos equipos a 405 nm no fueron significativamente distintas ($p=0,92$). Respecto a los parámetros de precisión (Cuadro IX), la repetibilidad presenta una menor variabilidad con el Bio-TEK que con el UV/Vis. Los coeficientes de variación para la reproducibilidad y repetibilidad del Bio-TEK se consideran aceptables (Bustamante & Carrascal, 2010). Esto implica que es adecuado y deseable utilizar el lector de microplacas para cuantificar la actividad enzimática de lacasa al obtenerse resultados más precisos empleando una menor cantidad de reactivos, tiempo y con la posibilidad de aumentar la cantidad de réplicas, logrando un método más robusto.

Cuadro IX. Parámetros de precisión para el método de determinación actividad enzimática de Lacasa comercial (*Trametes versicolor*) en el equipo Bio-TEK® Synergy™ HT.

Equipo	Espectrofotómetro UV-Vis	Bio- TEK Synergy	
Parámetro	Repetibilidad	Repetibilidad	Reproducibilidad
Promedio	7,29	7,82	7,97
Desviación Estándar	0,530	0,225	0,242
Coefficiente de Variación (%)	7,27	2,88	3,03

5,4 Cuantificación de la actividad enzimática durante FMS sobre BGC

Respecto a la fermentación de residuos de BGC, la selección de la cepa comercial *P. ostreatus* permitió definir las condiciones de trabajo como el tiempo de fermentación y la cantidad de sulfato de cobre a adicionar (0,28 mM en el medio humectante) (Patel, 2009; Barba *et al.*, 2016). Los valores promedio de actividad enzimática de la lacasa para este experimento se presentan en la figura 7. Durante su crecimiento vegetativo, normalmente antes del día 18, se ha registrado la mayor actividad enzimática de la lacasa; varios estudios han encontrado la producción máxima entre 7 y 10 días de fermentación, utilizando diversos sustratos (Bánfi *et al.*, 2015; Kurt & Buyukalaca, 2010, Fen *et al.* 2019). Por lo tanto se esperaba registrar la producción máxima de las lacasas dentro de los primeros 12 días de fermentación investigados.

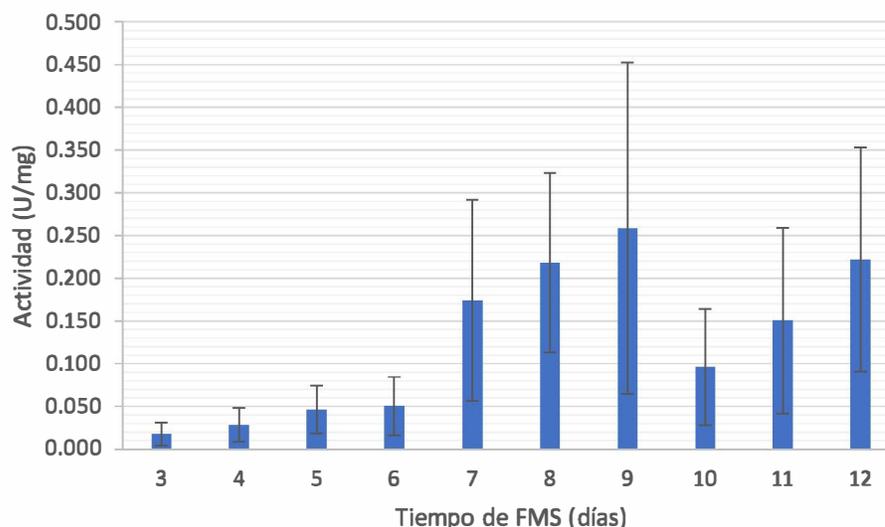


Figura 7. Actividad de enzima lacasa (U/mg), durante doce días de fermentación sobre residuos de granos de cerveza.

La actividad de enzima lacasa se presentó a partir del séptimo día de fermentación. Se registró un máximo de actividad promedio de $0,258 \pm 0,28$ U/mg de BGC seco en el noveno día de FMS. Durante la fermentación el crecimiento de micelio fue casi nulo y para el final de los 12 días de FMS ninguna de las unidades de fermentación analizadas había sido colonizada completamente por el micelio inoculado y en algunas carátulas no se observó crecimiento. La inhibición completa del crecimiento observada en algunas unidades de fermentación es inesperada, ya que el BGC se ha empleado como sustrato único para el crecimiento de variedades de *Pleurotus* sp. (D. Wang, Sakoda, & Suzuki, 2001). Sin embargo, en una de las nueve réplicas fue posible obtener resultados cercanos a los esperados; esta se presentará y discutirá de manera diferenciada más adelante.

En términos generales, el desarrollo del micelio y la actividad de la enzima lacasa registrada en los extractos de las carátulas durante la FMS fueron menores a la esperada. El contenido de nitrógeno de los extractos no muestra una diferencia notoria con respecto a los controles en diferentes días (Figura 9, sección de anexos). La actividad observada parece indicar que se dio un efecto inhibitorio debido al sustrato de crecimiento, se sospecha de la presencia de ácido fosfórico y compuestos fenólicos como posibles causas de la inhibición observada. Se ha determinado que concentraciones de 1g/kg de ácido fosfórico en agar APD

tienen un efecto inhibitorio en el desarrollo del micelio de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* spp. (Lin & Chen, 1995); sin embargo no se han encontrado reportes similares para el género *Pleurotus*. El ácido fosfórico es adicionado al agua de proceso para regular la acidez de la operación de macerado, de esta manera se pudo haber incorporado en el BGC empleado como sustrato para esta investigación. De acuerdo con el proceso ejecutado por la cervecería que facilitó el BGC, se estima que el ácido fosfórico pudo estar presente en una cantidad de hasta 1,14 g/kg de sustrato en cualquiera o todos los lotes estudiados.

Por otra parte, el BGC es una fuente interesante de compuestos fenólicos (Callemien & Collin, 2010). Los ácidos hidroxicinámicos provienen de la pared celular vegetal del BGC, el ácido ferúlico y p-coumárico son los más abundantes, seguidos por los ácidos sinápico, caféico y siríngico (Fărcaş *et al.*, 2016). A pesar de que estos compuestos fenólicos inducen la expresión de la lacasa, se ha reportado que dependiendo de su concentración estos pueden inhibir el desarrollo micelial de *P. pulmonarius*, particularmente el ácido ferúlico, la vainillina y ácido gálico. El tamaño de colonias desarrolladas sobre APD con 0,25 mM de ácido ferúlico (48 mg/ml), ácido p-coumárico (41 mg/ml), ácido caféico (45 mg/ml), o ácido siríngico (50 mg/ml), por 6 días resultó en colonias 36%, 16%, 5% y 7% más pequeñas, respectivamente (De Souza, Tychanowicz, De Souza, & Peralta, 2004). A la fecha se han reportado contenidos entre 2,4-0,3 mg/g de ácido ferúlico y 1,21-0,68 mg/g de ácido p-coumárico en residuos de BGC (Skendi *et al.*, 2018), la no cuantificación de estos compuestos para el BGC empleado en este experimento limita el análisis para determinar si son una fuente de inhibición.

La figura 8 muestra los valores promedio de actividad enzimática de la lacasa presentes en la réplica que aparentemente no sufrió inhibición del sustrato.

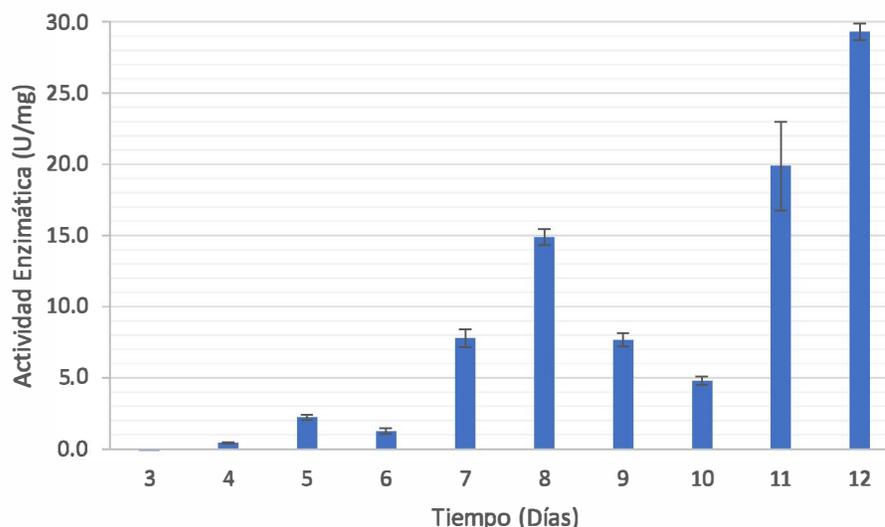


Figura 8. Actividad de enzima lacasa (U/mg) de réplica atípica durante doce días de fermentación sobre residuos de granos de cerveza. Los valores corresponden al promedio de 6 determinaciones para cada punto de muestreo.

Se registró un máximo de actividad promedio de $29,305 \pm 0,732$ U/mg de BGC seco en el doceavo día de FMS. El comportamiento del crecimiento del micelio fue similar a las muestras que presentaron baja actividad, mostrando un ligero aumento para el día 12 de fermentación.

La tendencia observada en la figura 8 es esperada ya que al aumentar la biomasa dentro de las unidades de fermentación se registró una mayor actividad enzimática de la lacasa, varios autores ubican el máximo de actividad lacasa durante el crecimiento vegetativo, entre los días 7 y 10 (Bánfi *et al.*, 2015; Kurt & Buyukalaca, 2010; Savoie, Salmones, & Mata, 2007); Dhillon, Kaur, y Brar (2012) también encontraron en el día 12 los valores de actividad lacasa más altos para una FMS de BGC empleando *Trametes versicolor*. A pesar de ser solamente una de las réplicas, esto permitió evaluar el análisis de cuantificación de la actividad enzimática evidenciando que es lo suficientemente robusto para descartar la posibilidad de que estos resultados sobresalientes se puedan atribuir a un error del muestreo o análisis de los datos.

Estos resultados son interesantes ya que evidencian una expresión alta de la lacasa aún y cuando no se han optimizado los parámetros de fermentación para la expresión de la enzima.

Kurt y Buyukalaca (2010), por ejemplo, encontraron que la actividad máxima de la enzima lacasa expresada durante un proceso comercial, sobre sustrato de paja de trigo enriquecida con urea y pasteurizada, presentó una actividad máxima de 5,48 U/mg en el día 8 de FMS. A pesar de llevarse a cabo en condiciones de fermentación comerciales, el ensayo para cuantificar la actividad enzimática de la lacasa permite comparar las actividades obtenidas empleando diferentes sustratos agroindustriales. Al emplear BGC como sustrato, Dhillon, Kaur y Brar (2012) registraron un máximo de $13,506 \pm 0,138$ U/mg de BGC seco en el día 12 y Tišma *et al.* (2017) registró un máximo de 5,6 U/g de muestra de FMS en el día 7 de fermentación empleando *Trametes versicolor*. Es importante señalar que las determinaciones de estas actividades se realizaron a pH de 3,5 y 3,0 respectivamente, por lo que se está sobrestimando la actividad que tendrían las lacasas en un medio como la cerveza. Estos resultados indican que el uso de BGC como sustrato de crecimiento para *P. ostreatus* si resultó en la expresión de una cantidad de interesante de la enzima lacasa a pesar de no haberse optimizado las condiciones de crecimiento y presentar un menor desarrollo micelial.

Los controles negativos de fermentación y blancos no registraron actividad enzimática de la lacasa, en algunos controles inclusive se presentaron lecturas ligeramente negativas, lo que se puede atribuir a la cantidad de compuestos antioxidantes naturalmente presentes en los granos de cerveza, como por ejemplo flavonoides y ácidos fenólicos. Se han reportado contenidos de flavonoides entre (0,02-13,16) mg QE (equivalente de quercetina)/ 100 gramos de material (Skendi *et al.*, 2018).

6. Conclusiones

- Las fracciones de BGC son un sustrato adecuado para su uso en procesos de FMS, las cuales presentan características físicas y químicas deseables para la obtención de lacasas.
- Existe una diferencia significativa en la CRA de las fracciones de BGC retenidas en el tamiz U.S Standard N° 8 y N°16; la de menor tamaño presenta una CRA mayor.
- Mediante el uso de imágenes digitales, se puede analizar la expresión de la lacasa en agar LBM enriquecido con ABTS.
- El pH del medio de análisis ejerce una influencia significativa y dramática sobre la actividad enzimática determinada de una lacasa comercial, empleando ABTS como agente cromóforo.
- Fue posible validar el análisis actividad de la lacasa en un equipo de microplacas y en 2 longitudes de onda de lectura, obteniendo adecuados parámetros de trabajo (coeficientes de variación para la reproducibilidad y repetibilidad).
- *P. ostreatus* presentó dificultades para desarrollarse (a 23°C, 80%< de HR), por 12 días sobre el sustrato empleado de BGC.
- Fue posible obtener un extracto con la enzima lacasa a partir de un proceso fermentativo con residuos de BGC utilizando un moho comercial bajo condiciones estandarizadas sin optimización.

7. Recomendaciones

- Evaluar el impacto que tiene un pretratamiento de lavado de BGC con agua sobre el desarrollo de micelio y expresión de la enzima lacasa ya que se ha observado que el lavado de BGC ha resultado en una mejor eficiencia biológica (D. Wang *et al.*, 2001)
- Incluir un AID del desarrollo micelial de mohos directamente sobre el sustrato estudiado como criterio de selección para evaluar su posible desempeño en una FMS o, como mínimo, realizar pruebas de crecimiento sobre placas cuyo agar haya sido enriquecido con el sustrato, liofilizado y molido, en cuestión.
- Modificar la cámara de captura de imágenes digitales pintándola con blanco opaco, esto podría resultar en la toma de imágenes con iluminación más uniforme.
- Repetir la determinación de lignina en BSG aplicando las mejoras propuestas al método AOAC por Raffrenato y Van Amburgh (2011).
- Realizar un experimento para dimensionar la posible inhibición del desarrollo micelial de *P. ostreatus*, como lo cuantifica De Souza *et al.*, (2004), debido a presencia de ácido fosfórico en un rango de 0 a 1,5 mg/kg, en placa y sobre BGC.
- Realizar una cuantificación de compuestos fenólicos para determinar si son una posible fuente de inhibición de desarrollo micelial.
- Realizar un análisis de capacidad antioxidante del medio de fermentación para evaluar si es necesario ajustar el cálculo de la actividad enzimática lacasa contemplando el posible error negativo asociado a la acción de los antioxidantes sobre el analito (ABTS) cuantificado espectrofotométricamente en el extracto analizado.
- Debido a que modificaciones sobre la proporción C/N y el tamaño de partícula del sustrato pueden propiciar una expresión diferenciada de la enzima lacasa al utilizar *P. ostreatus* (Membrillo *et al.*, 2008), se recomienda evaluar los siguientes factores:
 - Utilizar las fracciones retenidas en los tamices N°16 y N°20.
 - Adicionar un sustrato inerte, como paja de trigo o zacate estrella, para aumentar la proporción C/N siempre y cuando no se reduzca la concentración de BSG por debajo de 30% (Gregori *et al.*, 2008).

8. Bibliografia

- Abdul, M., & Webb, C. (2017). Estimation of growth in solid state fermentation : A review. *Malaysian Journal of Science*, 14(01), 61–69. <https://doi.org/10.21161/mjm.96616>
- Ademakinwa, A. N., & Agboola, F. K. (2016). Biochemical characterization and kinetic studies on a purified yellow laccase from newly isolated *Aureobasidium pullulans* NAC8 obtained from soil containing decayed plant matter. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.05.004>
- Agarwal, V., Kumar, D., Varadwaj, P., & Tiwari, A. (2020). Water activity and biomass estimation using digital image processing in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 308(March), 123277. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123277>
- Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2018). Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0190-z>
- Alcalde, M., & Bulter, T. (2003). Colorimetric assays for screening laccases. In F. H. Arnold & G. Georgiou (Eds.), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 230, pp. 193–201). New Jersey: Humana Press Inv. <https://doi.org/10.1385/1-59259-396-8:193>
- Aleksejeva, O., Mateljak, I., Ludwig, R., Alcalde, M., & Shleev, S. (2019). Electrochemistry of a high redox potential laccase obtained by computer-guided mutagenesis combined with directed evolution. *Electrochemistry Communications*, 106(August), 106511. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.106511>
- Ander, P., & Messner, K. (1998). Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase. *Biotechnology Techniques*, 12(3), 191–195. <https://doi.org/10.1023/A:1008813206178>
- Ang, T. N., Ngoh, G. C., Seak, A., & Chua, M. (2013). Development of a novel inoculum preparation method for solid-state fermentation — Cellophane film culture (CFC) technique. *Industrial Crops & Products*, 43, 774–777. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.022>
- Arboleda, C., Mejía, A. I., Franco-Molano, A. E., Jiménez, G. A., & Penninckx, M. J. (2008). Autochthonous white rot fungi from the tropical forest of Colombia for dye decolourisation and ligninolytic enzymes production. *Sydowia*, 60(2), 165–180.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera De Los Santos, M., ... Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>

- Bánfi, R., Pohner, Z., Kovács, J., Luzics, S., Nagy, A., Dudás, M., ... Vajna, B. (2015). Characterisation of the large-scale production process of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with the analysis of succession and spatial heterogeneity of lignocellulolytic enzyme activities. *Fungal Biology*, *119*(12), 1354–1363.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.003>
- Barba, M., Assumpc, F., Silveira, P., & Ju, A. M. (2016). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp . *Saudi Journal of Biological Sciences*.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>
- Barry, D. J., & Williams, G. A. (2011). Microscopic characterisation of filamentous microbes: Towards fully automated morphological quantification through image analysis. *Journal of Microscopy*, *244*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03506.x>
- Basto, C., Silva, C. J., Gübitz, G., & Cavaco-Paulo, A. (2007). Stability and decolorization ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields. *Ultrasonics Sonochemistry*, *14*(3), 355–362.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.07.005>
- Bavaro, S. L., Susca, A., Frisvad, J. C., Tufariello, M., Chytiri, A., Perrone, G., ... Blevé, G. (2017). Isolation, characterization, and selection of molds associated to fermented black table olives. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUL).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01356>
- Belšak-Šel, N., Gregori, A., Leitgeb, M., Klinara, D., & Čelan, Š. (2015). Effect of Solid State Fermentation Medium Optimization on *Pleurotus ostreatus* Laccase Production. *Acta Chimica Slovenica*, 932–939. <https://doi.org/10.17344/acsi.2015.1764>
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., & Verma, P. (2019). Bioconversion of rice straw by synergistic effect of in-house produced ligno-hemicellulolytic enzymes for enhanced bioethanol production. *Bioresource Technology Reports*, *10*(October 2019), 100352.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100352>
- Botella, C., Hernandez, J. E., & Webb, C. (2019). Dry weight model, capacitance and metabolic data as indicators of fungal biomass growth in solid state fermentation. *Food and Bioproducts Processing*, *114*, 144–153.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.12.002>
- Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, A., Sepúlveda, L., De La Cruz, R., Prado-Barragán, A., Aguilar-González, M. A., ... Aguilar, C. N. (2014). Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation. *Food and Bioproducts Processing*, *92*(4), 376–382.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.010>

- Buenrostro-Figueroa, J. J., Velázquez, M., Flores-Ortega, O., Ascacio-Valdés, J. A., Huerta-Ochoa, S., Aguilar, C. N., & Prado-Barragán, L. A. (2017). Solid state fermentation of fig (*Ficus carica* L.) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. *Process Biochemistry*, *62*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.016>
- Buffington, J. (2014). The Economic Potential of Brewer ' s Spent Grain (BSG) as a Biomass Feedstock. *Advances in Chemical Engineering and Science*, (July), 308–318. <https://doi.org/10.4236/aces.2014.43034>
- Bustamante, J., & Carrascal, L. (2010). *Estandarización de la Técnica Espectrofotométrica (UV-vis) para la Cuantificación de Antraquinonas Presentes en productos a Base de Aloe vera*. Universidad Tecnológica de Pereira. Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1800/54308520218B982.pdf;sequence=1>
- Callemien, D., & Collin, S. (2010). Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer-A review. *Food Reviews International*, *26*(1), 1–84. <https://doi.org/10.1080/87559120903157954>
- Chenthamarakshan, A., Parambayil, N., Miziriya, N., Soumya, P. S., Lakshmi, M. S. K., Ramgopal, A., ... Nambisan, P. (2017). Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. *BMC Biotechnology*, *17*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0333-x>
- Chikthimmah, N., & Karavally, J. (2010). Miso Fermentation. *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*, (October), 431–433. <https://doi.org/10.1081/E-EBAF-120045414>
- Christensen, N. J., & Kepp, K. P. (2014). Setting the stage for electron transfer: Molecular basis of ABTS-binding to four laccases from *Trametes versicolor* at variable pH and protein oxidation state. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *100*, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.11.017>
- De Oliveira Rodrigues, P., Gurgel, L. V. A., Pasquini, D., Badotti, F., Góes-Neto, A., & Baffi, M. A. (2020). Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. *Renewable Energy*, *145*, 2683–2693. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>
- De Souza, C. G. M., Tychanowicz, G. K., De Souza, D. F., & Peralta, R. M. (2004). Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology*, *44*(2), 129–136. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310365>
- Dhillon, G. S., Kaur, S., & Brar, S. K. (2012). In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *72*, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.012>

- Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K., & Verma, M. (2012). Flocculation and haze removal from crude beer using in-house produced laccase from *Trametes versicolor* cultured on brewers spent grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(32), 7895–7904. <https://doi.org/10.1021/jf301747z>
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., & Kumar, A. (2011). Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *68*(2), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- Eichlerová, I., Homolka, L., Sovsk, M. T. O. M., & Bidartondo, M. I. (2015). Long term storage of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* isolates using different cryopreservation techniques and its impact on laccase activity. *Fungal Biology*, *119*(12). <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.004>
- Eichlerová, I., Homolka, L., Žifčáková, L., Lisá, L., Dobiášová, P., & Baldrian, P. (2015). Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. *Fungal Ecology*, *13*, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.002>
- Euromonitor International. (2019). *Beer in Costa Rica - Analysis*. Retrieved from <http://www.portal.euromonitor.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/portal/analysis/tab>
- Fărcaș, A. C., Ancuța, S., Mudura, E., Vasile, F., Vodnar, D. C., Tofană, M., & Claudia, L. (2016). Exploitation of Brewing Industry Wastes to Produce Functional Ingredients. In *Intech* (Vol. i, p. 13). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Farnet, A. M., Ferre, E., Gil, G., & Gastaldi, S. (2010). A new substrate to measure laccase activities in complex environments: Application to litters. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(6), 1001–1005. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.005>
- Fernandes, H., Salgado, J., Peres, H., Teles, A. O., & Belo, I. (2019). Extraction of antioxidant compounds from enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain after solid-state fermentation. *Journal of Biotechnology*, *305*(November), S18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.075>
- Flores-Maltos, D. A., Mussatto, S. I., Esquivel, J. C. C., Buenrostro, J. J., Rodríguez, R., Teixeira, J. A., & Aguilr, C. N. (2014). Typical mexican agroindustrial residues as supports for solid-state fermentation. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, *9*(3), 289–293. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2014.289.293>
- Forootanfar, H., & Faramarzi, M. A. (2015). Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. *Biotechnology Progress*, *31*(6), 1443–1463. <https://doi.org/10.1002/btpr.2173>
- Forootanfar, H., Faramarzi, M. A., Shahverdi, A. R., & Yazdi, M. T. (2011). Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Bioresource Technology*, *102*(2), 1808–1814. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.043>

- Frasconi, M., Favero, G., Boer, H., Koivula, A., & Mazzei, F. (2010). Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(4), 899–908. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.018>
- García, G., Stone, J., & Rahimifard, S. (2019). Opportunities for waste valorisation in the food industry- a case study with four UK food manufacturers. *Journal of Cleaner Production*, 211, 11339–11356. <https://doi.org/10.1037//0033-2909.I26.1.78>
- Glazunova, O. A., Trushkin, N. A., Moiseenko, K. V., Filimonov, I. S., & Fedorova, T. V. (2018). Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: Redox potential versus substrate-binding pocket structure. *Catalysts*, 8(4), 1–9. <https://doi.org/10.3390/catal8040152>
- Gomes, E., Silva, R., Pereira, J. D. C., & Ladino-orjuela, G. (2016). *Fungal Growth on Solid Substrates : A Physiological Overview* (1st ed.). (C. Larroche, M. Sanroman, G. Du, & A. Pandey, Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00003-7>
- Gopalan, N., & Nampoothiri, K. M. (2016). *Biotechnological Production of Enzymes Using Agro-Industrial Wastes: Economic Considerations, Commercialization Potential, and Future Prospects. Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00014-9>
- Gramss, G. (2017). Reappraising a Controversy: Formation and Role of the Azodication (ABTS²⁺) in the Laccase-ABTS Catalyzed Breakdown of Lignin. *Fermentation*, 3(2), 27. <https://doi.org/10.3390/fermentation3020027>
- Gregori, A., Švagelj, M., Pahor, B., Berovič, M., & Pohleven, F. (2008). The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *New Biotechnology*, 25(2–3), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.08.003>
- Guowei, Z., Lili, W., Yufeng, L., & Hailei, W. (2019). Impact of the fermentation broth of *Ganoderma lucidum* on the quality of Chinese steamed bread. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0859-5>
- Hadibarata, T., & Yuniarto, A. (2020). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-laccase basidiomycetes fungi isolated from tropical forest of Borneo. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28(June), 101717. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101717>
- Hashemi, M., Razavi, S. H., Shojaosadati, S. A., & Mousavi, S. M. (2011). The potential of brewer's spent grain to improve the production of α -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system. *New Biotechnology*, 28(2), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.10.009>

- Hassan, S. S., Tiwari, B. K., Williams, G. A., & Jaiswal, A. K. (2020). Bioprocessing of brewers' spent grain for production of xylanopectinolytic enzymes by *Mucor* sp. *Bioresource Technology Reports*, 9(December 2019), 100371. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100371>
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016>
- He, P., Pan, L., He, X., & Xu, C. (2014). Optimization of culture conditions for laccase production from *Abortiporus biennis* in a pilot-scale bioreactor. *Archives of Biological Sciences*, 66(4), 1567–1574. <https://doi.org/10.2298/ABS1404567H>
- Hommes, G., Gasser, C. A., Ammann, E. M., & Corvini, P. F. X. (2013). Determination of oxidoreductase activity using a high-throughput microplate respiratory measurement. *Analytical Chemistry*, 85(1), 283–291. <https://doi.org/10.1021/ac302716j>
- Howe, S. (2020). Raw materials. In C. Smart (Ed.), *The Craft Brewing Handbook* (1st ed., Vol. 24, pp. 38–44). Duxford, United Kingdom: Woodhead Publishing.
- Huige, N. (2010). Brewery By-Products and Effluents. In F. Priest & G. Steward (Eds.), *Handbook of Brewing* (2nd ed., pp. 655–713). Boca Raton, FL: Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9781420015171.ch18>
- Ikram, S., Huang, L. Y., Zhang, H., Wang, J., & Yin, M. (2017). Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science*, 82(10), 2232–2242. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794>
- Ilyasov, I. R., Beloborodov, V. L., Selivanova, I. A., & Terekhov, R. P. (2020). ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031131>
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Johannes, C., & Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 78(2), 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00208-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00208-X)
- Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N., & Elisashvili, V. (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 391–397. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9046-8>
- Kaneda, H., Takashio, M., Tamaki, T., & Osawa, T. (1997). Influence of pH on flavour staling during beer storage. *Journal of the Institute of Brewing*, 103(1), 21–23. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1997.tb00932.x>

- Karimi, A., Shojaosadati, S. A., Hejazi, P., Vasheghani-farahani, E., & Hashemi, M. (2014). Journal of Industrial and Engineering Chemistry Porosity changes during packed bed solid-state fermentation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(6), 4022–4027. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.01.001>
- Karp, S. G., Faraco, V., Amore, A., Letti, L. A. J., Thomaz Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by *Pleurotus ostreatus* in solid-state fermentation. *BioMed Research International*, 2015(September). <https://doi.org/10.1155/2015/181204>
- Kerby, C., & Viresekoop, F. (2017). An Overview of the Utilisation of Brewery By-Products as Generated by British Craft Breweries. *Beverages*, 3(4), 24. <https://doi.org/10.3390/beverages3020024>
- Khidzir, K. M., Abdullah, N., & Agamuthu, P. (2010). Brewery spent grain: Chemical characteristics and utilization as an enzyme substrate. *Malaysian Journal of Science*, 29(1), 41–51.
- Kolomytseva, M., Myasoedova, N., Samoilova, A., Podieablonskaia, E., Chernykh, A., Classen, T., ... Golovleva, L. (2017). Rapid identification of fungal laccases/oxidases with different pH-optimum. *Process Biochemistry*, 62(July), 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.027>
- Koschorreck, K., Richter, S. M., Swierczek, A., Beifuss, U., Schmid, R. D., & Urlacher, V. B. (2008). Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474(1), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.009>
- Kosseva, M. R. (2013). Recovery of Commodities from Food Wastes Using Solid-State Fermentation. In M. R. Kosseva & C. Webb (Eds.), *Food Industry Wastes* (First Edit, pp. 77–102). London: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391921-2.00005-6>
- Kumar, R., Kaur, J., Jain, S., & Kumar, A. (2016). Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.05.006>
- Kumla, J., Suwannarach, N., Sujarit, K., Penkhrue, W., Kakumyan, P., Jatuwong, K., ... Lumyong, S. (2020). Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste. *Molecules*, 25(12), 1–41. <https://doi.org/10.3390/molecules25122811>
- Kurt, S., & Buyukalaca, S. (2010). Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 101(9), 3164–3169. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.011>

- Lampinen, J., Raitio, M., Perälä, A., Oranen, H., & Harinen, R. (2012). *Correction Method for Photometric DNA Quantification Assay*. *Thermo Fisher Scientific Application Notes*. Retrieved from <https://static.thermoscientific.com/images/D20827~.pdf>
- Linnakoski, R., Reshamwala, D., Veteli, P., Cortina-Escribano, M., Vanhanen, H., & Marjomäki, V. (2018). Antiviral agents from fungi: Diversity, mechanisms and potential applications. *Frontiers in Microbiology*, *9*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02325>
- Londoño, L., Ruiz, H., Ascacio, A., Rodríguez, R., Aguilera, A., Tubio, G., ... Aguilar, C. (2020). Advantages and Progress Innovations of Solid-State Fermentation to Produce Industrial Enzymes. In N. Kumar (Ed.), *Microbial Enzymes : Roles and Applications in Industries* (Vol. 11, pp. 41–62). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5>
- López-Gómez, J. P., Pérez-Rivero, C., & Webb, C. (2019). Investigating a non-destructive alternative for a preliminary evaluation of fungal growth in solid state fermentations. *Journal of Microbiological Methods*, *160*(March), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.021>
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, *122*(4), 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- Madzak, C., Mimmi, M. C., Caminade, E., Brault, A., Baumberger, S., Briozzo, P., ... Jolival, C. (2006). Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein Engineering, Design and Selection*, *19*(2), 77–84. <https://doi.org/10.1093/protein/gzj004>
- Mali, T., Kuuskeri, J., Shah, F., & Lundell, T. K. (2017). Interactions affect hyphal growth and enzyme profiles in combinations of coniferous wood-decaying fungi of Agaricomycetes. *PLoS ONE*, *12*(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185171>
- Manan, M. A., & Webb, C. (2018). Evaluation of standard procedures for inoculum transfer for homogeneous distribution during the start-up of a fungal solid state fermentation process Evaluation of standard procedures for inoculum transfer for homogeneous distribution during the start-up. *Journal of Biotech Research*, *9*(August), 48–57.
- Mannan, M. A., & Webb, C. (2017). Estimation of growth in solid state fermentation : A review. *Malaysian Journal of Science*, *14*(01), 61–69. <https://doi.org/10.21161/mjm.96616>
- Mate, D., & Alcalde, M. (2016). Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, *10*(6), 1457–1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>

- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, *99*(16), 7842–7847. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.083>
- Miele, A., Giardina, P., Sannia, G., & Faraco, V. (2010). Random mutants of a *Pleurotus ostreatus* laccase as new biocatalysts for industrial effluents bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(3), 998–1006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04505.x>
- Mikolasch, A., & Schauer, F. (2009). Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*(4), 605–624. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1869-z>
- Mishra, A., & Kumar, S. (2007). Cyanobacterial biomass as N-supplement to agro-waste for hyper-production of laccase from *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation, *42*, 681–685. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.022>
- Mladenović, D., Pejin, J., Kocić-Tanackov, S., Radovanović, Ž., Djukić-Vuković, A., & Mojović, L. (2018). Lactic acid production on molasses enriched potato stillage by *Lactobacillus paracasei* immobilized onto agro-industrial waste supports. *Industrial Crops and Products*, *124*(February), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.081>
- Montoya, S., & Levin, L. (2015). Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling. *African Journal of Biotechnology*, *14*(15), 1304–1317. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14331>
- More, S. S., Renuka, P. S., Pruthvi, K., Swetha, M., Malini, S., & Veena, S. M. (2011). Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Research*, *2011*(1), 1–7. <https://doi.org/10.4061/2011/248735>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, *43*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Muthusamy, N. (2014). Chemical Composition of Brewers Spent Grain – a Review. *International Journal of Science, Environment and Technology*, *3*(6), 2109–2112.
- Ning, Y. J., Wang, S. S., Chen, Q. J., Ling, Z. R., Wang, S. N., Wang, W. P., ... Zhu, M. J. (2016). An extracellular yellow laccase with potent dye decolorizing ability from the fungus *Leucoagaricus naucinus* LAC-04. *International Journal of Biological Macromolecules*, *93*, 837–842. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.046>
- Nunes, C. S., & Kunamneni, A. (2018). *Laccases-properties and applications. Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00007-1>

- Orzua, M. C., Mussatto, S. I., Contreras-Esquivel, J. C., Rodriguez, R., de la Garza, H., Teixeira, J. A., & Aguilar, C. N. (2009). Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.02.001>
- Osma, J. F., Moilanen, U., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2011). Morphology and laccase production of white-rot fungi grown on wheat bran flakes under semi-solid-state fermentation conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 318(1), 27–34. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02234.x>
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2011). Cost analysis in laccase production. *Journal of Environmental Management*, 92(11), 2907–2912. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.052>
- Pandey, a, Soccol, C., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation. I Processes and products. *Process Biochem*, 35, 1153–1169.
- Panesar, P. S., Kaur, R., Singla, G., & Sangwan, R. S. (2016). Bio-processing of Agro-industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes: Progress and Prospects. *Applied Food Biotechnology*, 3(4), 208–227. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i4.13458>
- Patel, A., Mikes, F., Bühler, S., & Matsakas, L. (2018). Valorization of brewers' spent grain for the production of lipids by oleaginous yeast. *Molecules*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123052>
- Patel, Hardik, Gupte, A., & Gupte, S. (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate pleurotus ostreatus HP-1 under solid state fermentation. *BioResources*, 4(1), 268–284. <https://doi.org/10.15376/biores.4.1.268-284>
- Patel, Helina, & Gupte, A. (2016). Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from *Tricholoma giganteum* AGHP. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0088-6>
- Paterson, R., & Lima, N. (2017). Bioprospecting: success, potential and constraints (Vol. 16, pp. 81–112). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47935-4>
- Peralta, R. M., da Silva, B. P., Gomes Côrrea, R. C., Kato, C. G., Vicente Seixas, F. A., & Bracht, A. (2017). Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. In G. Brahmachari (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications* (1st ed., pp. 119–149). London: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., & Faraco, V. (2011). Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. *Current Genomics*, 12(2), 104–112.

- Pointing, S. B. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*, 2(March), 17–33. <https://doi.org/10.1364/AO.49.002813>
- Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal*, 282(7), 1190–1213. <https://doi.org/10.1111/febs.13224>
- Pompeu, G. B., Pietrobon, V. C., Andreote, C. C. F., Ferreira, L. F. R., Aguiar, M., Sartori, S. B., ... Monteiro, R. T. R. (2018). Role of the antioxidant defense system during the production of lignocellulolytic enzymes by fungi. *International Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-00045-1>
- Raffrenato, E., & Van Amburgh, M. E. (2011). Technical note: Improved methodology for analyses of acid detergent fiber and acid detergent lignin. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3613–3617. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3701>
- Ribau Teixeira, M., Guarda, E. C., Freitas, E. B., Galinha, C. F., Duque, A. F., & Reis, M. A. M. (2020). Valorization of raw brewers' spent grain through the production of volatile fatty acids. *New Biotechnology*, 57(August 2019), 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.01.007>
- Robertson, J. A., I'Anson, K. J. A., Treimo, J., Faulds, C. B., Brocklehurst, T. F., Eijssink, V. G. H., & Waldron, K. W. (2010). Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 890–896. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.019>
- Rodríguez-Couto, S. (2016). Solid-State Fermentation for Laccases Production and Their Applications. In C. Larroche, M. Sanroman, G. Du, & A. Pandey (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (1st ed., pp. 211–234). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00011-6>
- Rodriguez, E., Jalbert, J., Duchesne, S., Arroyo, O. H., Rodriguez, L., Cross, J., & Lewand, L. (2017). On the experimental determination of the nitrogen content of thermally upgraded electrical papers. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 24(5), 3092–3098. <https://doi.org/10.1109/TDEI.2017.006792>
- Rodriguez, S., Rosales, W., Gudín, M., & Sanromán, M. (2004). Exploitation of a Waste from the Brewing Industry for Laccase Production by Two Trametes Species. *Journal of Food Engineering*, 64(October 2004), 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.11.009>
- Rosales, E., Pazos, M., & Sanromán, M. Á. (2018). Solid-State Fermentation for Food Applications. In A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (1st ed., pp. 319–355). Vigo: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00015-3>

- Ruiz-Rodríguez, A., Polonia, I., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2011). Ligninolytic enzymes activities of Oyster mushrooms cultivated on OMW (olive mill waste) supplemented media, spawn and substrates. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(2), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.014>
- Sánchez-López, M. I., Vanhulle, S. F., Mertens, V., Guerra, G., Figueroa, S. H., Decock, C., ... Penninckx, M. J. (2008). Autochthonous white rot fungi from the tropical forest: Potential of Cuban strains for dyes and textile industrial effluents decolourisation. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1983–1990. <https://doi.org/10.5897/ajb08.042>
- Sánchez, J. E., & Royese, D. (2001). *La Biología y el Cultivo de Pleurotus spp.* (1ra ed.). Chiapas: El Colegio de la Frontera Sur.
- Sarria-Alfonso, V., Sánchez-Sierra, J., Aguirre-Morales, M., Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Poutou-Piñales, R. A. (2013). Culture Media Statistical Optimization for Biomass Production of a Ligninolytic Fungus for Future Rice Straw Degradation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2), 199–207. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0358-3>
- Savoie, J.-M., Salmones, D., & Mata, G. (2007). Hydrogen peroxide concentration measures in cultivation substrates during growth and fruiting of the mushrooms *Agaricus Bisporus* and *Pleurotus Spp.* *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(April), 1337–1344. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Schalchli, H., Hormazábal, E., Rubilar, O., Briceño, G., Mutis, A., Zocolo, G. J., & Diez, M. C. (2017). Production of ligninolytic enzymes and some diffusible antifungal compounds by white-rot fungi using potato solid wastes as the sole nutrient source. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 886–895. <https://doi.org/10.1111/jam.13542>
- Scott, S. L., Chen, W. J., Bakac, A., & Espenson, J. H. (1993). Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. *Journal of Physical Chemistry*, 97(25), 6710–6714. <https://doi.org/10.1021/j100127a022>
- Sharma, A., Jain, K. K., Jain, A., Kidwai, M., & Kuhad, R. C. (2018). Bifunctional in vivo role of laccase exploited in multiple biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(24), 10327–10343. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9404-8>
- Siguemoto, É. S., & Gut, J. A. W. (2017). Validation of spectrophotometric microplate methods for polyphenol oxidase and peroxidase activities analysis in fruits and vegetables. *Food Science and Technology*, 37(suppl 1), 148–153. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.36216>
- Singh Arora, D., & Kumar Sharma, R. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(6), 1760–1788. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8676-y>

- Skendi, A., Harasym, J., & Galanakis, C. M. (2018). Recovery of high added value compounds from brewing and distillate processing by-products. In C. M. Galanakis (Ed.), *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products* (1st ed.). Duxsford: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/c2016-0-03883-4>
- Sobal, M., Martínez-Carrera, D., Moreales, P., & Rousos, S. (2007). Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of. *Micologia Aplicada Internacional*, 19(1), 15–23.
- Soccol, C. R., Costa, E. S. F. da, Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & Vandenberghe, L. P. de S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>
- Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V. M., González, I., & Viniegra-González, G. (2005). An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2.2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 579(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.01.025>
- Stamets, P., & Chilton, J. S. (1983). *The Mushroom Cultivator*. Agarikon Press. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200111>
- Stoffel, F., Santana, W. de O., Gregolon, J. G. N., Kist, T. B. L., Fontana, R. C., & Camassola, M. (2019). Production of edible mycoprotein using agroindustrial wastes: Influence on nutritional, chemical and biological properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 58(September). <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102227>
- Taidi, B., Khalil, H., & Kurek, B. (n.d.). Morphological growth pattern of *Phanerochaete chrysosporium* cultivated on different *Miscanthus x giganteus* biomass fractions, 1–32. Teck Nam, A., Gek Chen, N., & Adeline Seak, M. chua. (2010). A quantitative method for fungal ligninolytic enzyme screening studies. *Asian Pacific Journal of Chemical Engineering*, (6), 589–595. <https://doi.org/10.1002/apj.451>
- Terrón, M. C., López-Fernández, M., Carbajo, J. M., Junca, H., Téllez, A., Yagüe, S., ... González, A. E. (2004). Tannic acid interferes with the commonly used laccase-detection assay based on ABTS as the substrate. *Biochimie*, 86(8), 519–522. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.07.013>
- Tišma, M., Jurić, A., Bucić-Kojić, A., Panjičko, M., & Planinić, M. (2018). Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2), 182–186. <https://doi.org/10.1002/jib.479>
- Torres-Mancera, M. T., Figueroa-Montero, A., Favela-Torres, E., Rosales-Zamora, G., Nampoothiri, K. M., & Saucedo-Castañeda, G. (2018). Online Monitoring of Solid-State Fermentation Using Respirometry. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, (1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00006-2>

- Velázquez, L., Tellez-Téllez, M., Días, R., Bibbins-Martínes, M. D., Lorea, O., Sánchez, C., ... Díaz-Godínez, G. (2014). Laccase Isoenzymes of *Pleurotus ostreatus* Grown at Different pH in Solid-State Fermentation Using Polyurethane Foam as Support. *Annual Research & Review in Biology*, 4(16), 2566–2578. <https://doi.org/10.9734/arrb/2014/10016>
- Vicente, J., Teixeira de Souza, D., Celestino, Jessyca, O., & Walter, Simplicio de Souza, É. (2017). Bioprospecting with Brazilian Fungi. In R. Paterson & N. Lima (Eds.), *Bioprospecting, Topics in Biodiversity and Conservation* (1st ed., Vol. 16, pp. 81–112). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47935-4>
- Vieira, E., Teixeira, J., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2016). Valorization of brewers' spent grain and spent yeast through protein hydrolysates with antioxidant properties. *European Food Research and Technology*, 242(11), 1975–1984. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2696-y>
- Viëtor, R. J., Voragen, A. G. J., & Angelino, S. A. G. F. (1993). Composition of Non-Starch Polysaccharides in Wort and Spent Grain From Brewing Trials With Malt From a Good Malting Quality Barley and a Feed Barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 99(3), 243–248. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1993.tb01167.x>
- Vriesekoop, F., Krahl, M., Hucker, B., & Menz, G. (2012). 125th Anniversary review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(4), 335–345. <https://doi.org/10.1002/jib.49>
- Walker, G. M., & White, N. A. (2018). Introduction to Fungal Physiology. In K. Kavanagh (Ed.), *Fungi: Biology and Applications* (3rd ed., pp. 1–34). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0470015330.ch1>
- Wan, Y., Du, Y., & Miyakoshi, T. (2008). Enzymatic catalysis of 2,6-dimethoxyphenol by laccases and products characterization in organic solutions. *Science in China, Series B: Chemistry*, 51(7), 669–676. <https://doi.org/10.1007/s11426-008-0071-y>
- Wang, D., Sakoda, A., & Suzuki, M. (2001). Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology*, 78(3), 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00002-5)
- Wang, L., Liu, Y., & Chen, H.-Z. (2018). Advances in Porous Characteristics of the Solid Matrix in Solid-State Fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 1, 19–29. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00002-5>
- Wang, T., Xiang, Y., Liu, X., Chen, W., & Hu, Y. (2017). A novel fluorimetric method for laccase activities measurement using Amplex Red as substrate. *Talanta*, 162(June 2016), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.006>
- Wolters, N., Schabronath, C., Schembecker, G., & Merz, J. (2016). Efficient conversion of pretreated brewer's spent grain and wheat bran by submerged cultivation of *Herichium erinaceus*. *Bioresource Technology*, 222, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.121>

- Wosten, H., Scholtmeijer, K., & Vries, R. (2007). Hyperproduction of enzymes by fungi. In J. Dijksterhuis & R. A. Samson (Eds.), *Food Mycology* (1st ed., pp. 183–196). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Xiros, C., Moukouli, M., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2009). Factors affecting ferulic acid release from Brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system. *Bioresource Technology*, *100*(23), 5917–5921.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.018>
- Yang, J., Li, W., Bun Ng, T., Deng, X., Lin, J., & Ye, X. (2017). Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Frontiers in Microbiology*, *8*(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832>
- Yazid, N. A., Barrena, R., Komilis, D., & Sánchez, A. (2017). Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization : A Review. *Sustainability*, *9*(2), 1–28. <https://doi.org/10.3390/su9020224>
- Zhu, C., Bao, G., & Huang, S. (2016). Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACCC 52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *30*(2), 270–276.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1135081>

9. Anexos

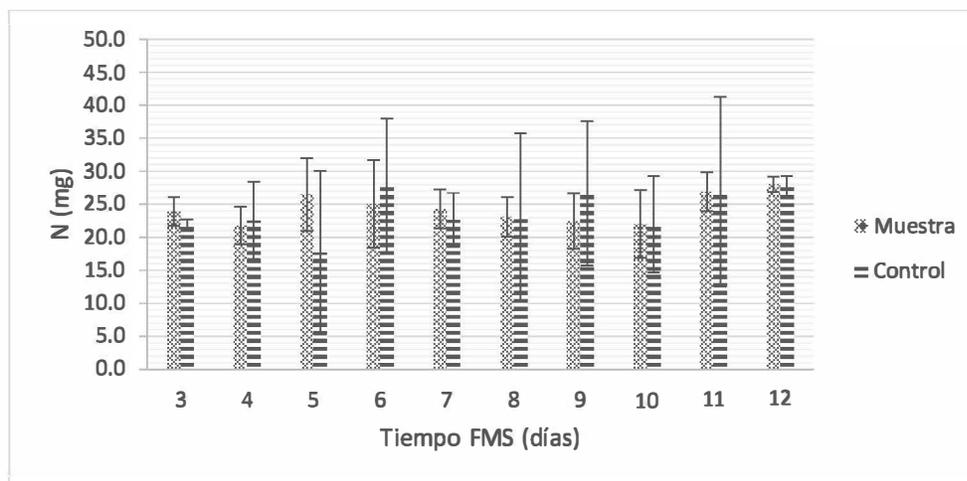


Figura 9. Contenido de nitrógeno de extractos de BGC obtenidos durante la fermentación en medio sólido con *Pleurotus ostreatus*, la cepa comercial.



Figura 10. Espacio de captura de imágenes (sin cobertor), con iluminación controlada para la toma de imágenes digitales (López-Gómez, Pérez-Rivero, & Webb, 2019)

Cuadro XI. Partículas del endospermo y pericarpio de diferentes fracciones de BGC sobre una línea de referencia de 0,2 mm de ancho.

Tipo de Partícula	N°8	N°16	N°20
Endospermo	 A large, irregular, yellowish-brown endosperm particle with a rough, fibrous texture, resting on a black reference line.	 A smaller, more compact, yellowish-brown endosperm particle with a rough texture, resting on a black reference line.	 A very small, cup-shaped, yellowish-brown endosperm particle with a smooth interior, resting on a black reference line.
Pericarpio	 A large, elongated, yellowish-brown pericarpium particle with a smooth, slightly curved surface, resting on a black reference line.	 A medium-sized, elongated, yellowish-brown pericarpium particle with a smooth surface, resting on a black reference line.	 A small, elongated, yellowish-brown pericarpium particle with a smooth surface, resting on a black reference line.

Cuadro XII. Micelios de mohos de interés creciendo sobre APD acidificado.

Moho	Centro	Frontera
B1		
<i>P. ostreatus</i>		
<i>P. populinum</i>		
<i>L. edodes</i>		
B4		