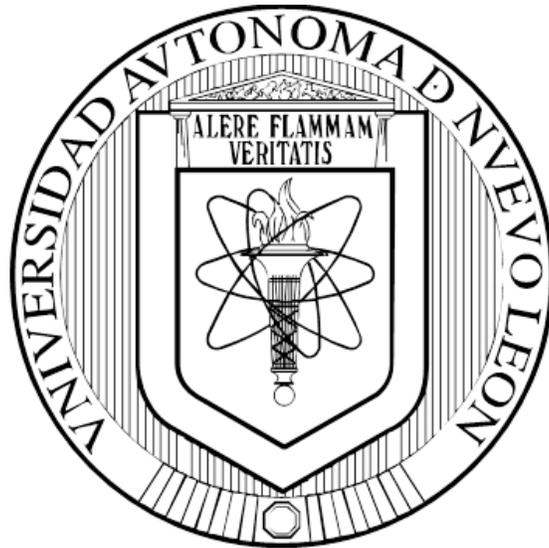


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS PARA LA  
SACARIFICACIÓN DEL GRANO GASTADO DE CERVECERÍA Y SU  
UTILIZACIÓN COMO ADJUNTO EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN  
DE CERVEZA TIPO LAGER**

**POR**

**M C. ARNULFO RICARDO GARCÍA ARELLANO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ALIMENTOS**

**MAYO, 2018**

EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS PARA LA SACARIFICACIÓN  
DEL GRANO GASTADO DE CERVECERÍA Y SU UTILIZACIÓN COMO  
ADJUNTO EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA TIPO LAGER

Comité de Tesis

---

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra  
Presidente

---

Dr. Juan Gabriel Báez González  
Secretario

---

Dr. Carlos Javier Aguilera González  
Vocal

---

Dra. Adriana Núñez González  
Vocal

---

Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández  
Vocal

EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS PARA LA SACARIFICACIÓN  
DEL GRANO GASTADO DE CERVECERÍA Y SU UTILIZACIÓN COMO  
ADJUNTO EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA TIPO LAGER

**Dirección de Tesis**

---

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra

Director

---

Dr. Sergio Román Othón Serna Saldívar

Director externo

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial al Departamento de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas, a mi director el Dr. Carlos Amaya Guerra y a la Dra. Guadalupe Alanís. Por haberme permitido realizar mis estudios de doctorado en esta institución.

Al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, especialmente al Dr. Sergio Serna quien me apoyo enormemente en la realización de este proyecto, así como a los Doctores Esther Pérez, y Silverio García por sus valiosas aportaciones a la realización de este trabajo.

A la Universidad Federico II de Nápoles, en especial a la Dra. Vincenza Faraco por compartir su experiencia y aportar conocimiento muy útil.

A la Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma Heineken México. En especial al Ing. Juan Pablo Bernal y a la Dra. Esmeralda Pérez por facilitarme las muestras utilizadas en el transcurso de la investigación.

Al CONACYT por haberme apoyado con la beca de manutención

A mis compañeros estudiantes, servicios sociales, y técnicos de laboratorio en las tres instituciones por su apoyo y enseñanza.

A mis amigos que estuvieron ahí para compartir tanto los fracasos como los logros.

A mis padres por siempre apoyarme.

# **DEDICATORIA**

**A mi familia**

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN. ....	1
ANTECEDENTES.....	3
Consumo mundial de cerveza. ....	3
Cerveza <i>lager</i> .....	3
Adjuntos cerveceros .....	4
Grits de maíz .....	4
Grits de arroz.....	5
Proceso industrial de producción de cerveza. ....	5
Malteo. ....	6
Maceración.....	7
Lavado.....	8
Cocimiento.....	9
Fermentación.....	9
Subproductos cerveceros.....	10
Grano gastado de cervecería (BSG).....	11
Composición de materiales lignocelulósicos. ....	11
Celulosa.....	12
Hemicelulosa.....	12
Lignina. ....	12
Degradación de material lignocelulósico. ....	12
Tratamientos biológicos.....	13
<i>Streptomyces setonni</i> .....	14
<i>Trichoderma harzianum</i> .....	14

<i>Pleurotus ostreatus</i> .....	15
<i>Aspergillus oryzae</i> .....	15
JUSTIFICACIÓN .....	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS .....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos. ....	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
Estrategia general.....	19
Evaluación de la actividad enzimática en medio sólido.....	20
Actividad endocelulolítica. ....	20
Actividad exocelulolítica. ....	20
Actividad celobiohidrolasa.....	20
Actividad xilanasa.....	21
Actividad pectinasa. ....	21
Caracterización química y física del grano gastado.....	21
Humedad. ....	21
Contenido de proteína. ....	21
Contenido de lípidos .....	22
Contenido de fibra.....	22
Contenido de almidón. ....	22
Contenido de ceniza. ....	22
Fermentación del grano gastado.....	23
Monitoreo de la producción de enzimas .....	23
$\alpha$ -amilasa. ....	23

β-amilasa .....	24
Amiloglucosidasa.....	24
Pululanasa. ....	24
Betaglucanasa.....	25
Celulasa. ....	25
Xilanasa.....	25
Producción del mosto a partir del grano gastado inoculado .....	25
Proceso de maceración.....	26
Etapa de conversión. ....	26
Lavado.....	26
Adición de Lúpulo.....	27
Caracterización de los mostos.....	27
Amino nitrógeno libre (FAN). ....	27
Carbohidratos fermentables. ....	27
Color.....	27
pH.....	27
Rendimiento.....	28
Fermentación del mosto a cerveza .....	28
Oxigenación. ....	28
Inoculación.....	28
Fermentación.....	28
Maduración. ....	28
Almacenamiento. ....	28
Análisis de la cerveza.....	29
Amino nitrógeno libre (FAN). ....	29

Densidad.....	29
pH.....	29
Carbohidratos fermentables. ....	29
Extracto. ....	29
Atenuación. ....	29
Contenido de etanol.....	30
Determinación de compuestos volátiles.....	30
Color.....	30
Análisis estadístico.....	30
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>31</b>
Evaluación del perfil enzimático.....	31
Caracterización del BSG. ....	35
Cinética de crecimiento de <i>A. oryzae</i> en BSG. ....	37
Producción de enzimas por <i>A. oryzae</i> en BSG.....	39
Producción y caracterización de mostos dulces. ....	49
Producción y caracterización de cervezas. ....	53
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>57</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>59</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Índices de actividad enzimática relativa. ....	32
<b>Tabla 2.</b> Composición proximal del BSG empleado.....	35
<b>Tabla 3.</b> Niveles de expresión máxima y tiempo de fermentación para cada enzima.....	46
<b>Tabla 4.</b> Comparativa de las características de los mostos. ....	50
<b>Tabla 5.</b> Comparativa de las características de las cervezas. ....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrategia general de trabajo.....	19
<b>Figura 2.</b> Cinética de crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> sobre BSG.....	37
<b>Figura 3.</b> Cinética de producción de $\alpha$ -amilasa por <i>A. oryzae</i> en BSG.....	39
<b>Figura 4.</b> Cinética de producción de $\beta$ -amilasa por <i>A. oryzae</i> en BSG.....	40
<b>Figura 5.</b> Cinética de producción de amiloglucosidasa por <i>A. oryzae</i> en BSG. ....	41
<b>Figura 6.</b> Cinética de producción de pululanasa por <i>A. oryzae</i> en BSG. ....	42
<b>Figura 7.</b> Cinética de producción de betaglucanasa por <i>A. oryzae</i> en BSG.....	43
<b>Figura 8.</b> Cinética de producción de celulasa por <i>A. oryzae</i> en BSG. ....	44
<b>Figura 9.</b> Cinética de producción de xilanasa por <i>A. oryzae</i> en BSG. ....	45

## ABREVIATURAS

**BSG...** Corresponde a las letras iniciales de la frase en inglés “Brewer’s spent grain”, denominación genérica del grano gastado de cervecería

**GRAS...** Corresponde a las letras iniciales de la frase en inglés “Generally Recognized As Safe”, Generalmente reconocido como seguro.

## RESUMEN.

El grano gastado de cervecería (BSG) se compone principalmente de las glumas o cáscaras y pericarpio de la cariósida revestida de la cebada. Es el principal subproducto de la industria cervecera. Representa alrededor del 85% del total de subproductos generados. Se producen alrededor de 20 kg de BSG húmedo por cada 100 litros de cerveza. La utilización de este material de desecho podría verse favorecida por las aplicaciones biotecnológicas. Para esto, se evaluaron *Streptomyces setonii*, *Aspergillus oryzae*, *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum*. Todas ellas probaron producir enzimas relacionadas con la degradación de materiales lignocelulósicos, como son: actividades endocelulasa, exocelulasa, celobiasa, xilanasas y pectinasa. Tomando en consideración la naturaleza del material del que partiríamos y el perfil enzimático expresado, se decidió continuar trabajando con *Aspergillus oryzae*. Este microorganismo se inoculó al 1% p/p de micelio fresco en grano gastado de cervecería y se evaluó su cinética de crecimiento, así como la producción de enzimas:  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, amiloglicosidasa, pululanasa, exoglucanasa, endoglucanasa, y xilanasas. La fermentación en sustrato sólido con *Aspergillus oryzae* proporciona la batería enzimática necesaria para sacarificar parcialmente el grano gastado de cervecería. Posteriormente, se recuperó el grano gastado hidrolizado y se utilizó como un adjunto cervecero incorporándolo como un sustituto del almidón de maíz a un nivel del 50%, en una mezcla de cocimiento en la que se emplearon 60% de malta de cebada, 20% de almidón de maíz y 20% de grits de maíz. Al comparar el mosto obtenido con el adjunto hidrolizado contra el mosto control se observa: un mosto con 6% menos rendimiento en volumen; un perfil de carbohidratos fermentables similar; un contenido de amino nitrógeno libre casi 9% más alto y notoriamente más oscuro; y que pudo fermentarse exitosamente bajo las mismas condiciones. Se produjo una cerveza con: mayor gravedad específica, menor atenuación, con 4% menos de concentración de etanol, producción similar de alcoholes superiores, un descenso en la producción de compuestos volátiles. Se concluye que este adjunto hidrolizado puede reemplazar parcialmente adjuntos amiláceos sin impactar fuertemente en los niveles de producción y contenido de alcohol de la cerveza obtenida. Por lo tanto, la implementación de esta tecnología sencilla y directa permitirá a los cerveceros la utilización de su subproducto.

## ABSTRACT.

Brewer's spent grain (BSG) is mainly composed of the husks and pericarp of the covered caryopsis of barley. It is the main byproduct of the brewing industry. It represents around 85% of total byproducts generated by this industry. For every 100 liters of beer 20kg of BSG are produced. Four different microorganisms were tested: *Streptomyces setonni*, *Aspergillus oryzae*, *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum*. All of them showed to produce enzymes related to lignocellulose degradation such as: endocellulase, exocellulase, celobiohidrolase, xylanase and pectinase. Considering the expressed enzymatic profile, it was decided to continue working with *Aspergillus oryzae*. The fresh mycelium of the microorganism was inoculated at 1% w/w in BSG. Growth kinetics was evaluated, as well as enzymes production of:  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, amyloglucosidase, pullulanase, exoglucanase, endoglucanase, and xylanase. Solid state fermentation with *Aspergillus oryzae* provides the enzymatic battery needed to partially saccharify the BSG. Subsequently, the hydrolyzed BSG was recovered and used as a beer adjunct. It was incorporated in a mixture of 60% barley malt, 10% corn starch, 20% corn grits and 10% hydrolyzed BSG. Comparing the must obtained with the hydrolyzed adjunct against the control wort, it was observed: 6% less yield; similar fermentable carbohydrate profile; free amino nitrogen content almost 9% higher and darker color; and it could be fermented successfully under the same conditions. The produced beer had: higher specific gravity, lower attenuation, with 4% less concentration of ethanol, similar production of higher alcohols, and a decreased volatile compounds production. It is concluded that this hydrolyzed adjunct can partially replace amylaceous adjuncts without strongly impacting the yield and alcohol content of the obtained beer. Therefore, the implementation of this simple technology will allow brewers to use this byproduct.

## INTRODUCCIÓN.

Durante la elaboración de la cerveza el principal subproducto en función al volumen de generación es el denominado grano gastado de cervecería (BSG). Éste corresponde a la fracción de sólidos insolubles que se generan después del filtrado del mosto dulce una vez que los procesos de cocimiento se llevaron a cabo. Es un material lignocelulósico con un alto contenido de proteína y una humedad muy alta, lo que lo vuelve inestable durante el almacenamiento. La producción mundial anual promedio se estima en 39 millones de toneladas, con alrededor de 3,4 millones de toneladas producidas en la Unión Europea, de las cuales 2 millones se producen en Alemania solamente (FAO 2016). Se producen alrededor de 20 kg de BSG en húmedo por cada 100 litros de cerveza elaborada (Musatto 2014). Se espera que esta industria continúe creciendo, lo que por consiguiente provocará la generación de mayores cantidades de este subproducto. Las plantas de elaboración de la cerveza en todo el mundo generan gran cantidad de subproductos sólidos en forma de salvado de malta y levadura. Actualmente, la mayoría del grano usado producido se utiliza como alimento para animales de bajo valor, con un valor de mercado de alrededor de € 35 por tonelada (Buffington 2014). También son utilizados como fertilizantes o como materia prima para algunos aditivos. Estos subproductos están disponibles en grandes cantidades, por lo que la combinación de su gran suministro continuo, costo relativamente bajo y potencial valor agregado, lo vuelven un objetivo ideal para futuras aplicaciones industriales. La disposición inadecuada de estos residuos produce contaminación ambiental y la pérdida de útiles recursos biológicos como carbohidratos, proteínas y lípidos. La utilización del material de desecho podría verse favorecida por las aplicaciones biotecnológicas originalmente ideadas para solucionar otras problemáticas como la obtención de energéticos. Un ejemplo de esto es el caso del bioetanol de segunda generación, que busca la obtención de etanol a partir de material lignocelulósico de forrajes o desechos agroindustriales. En esta línea de pensamiento, el grano gastado de cervecería proviene de una matriz alimentaria, por lo que reincorporarlo a su proceso una vez sacarificado es factible siempre y cuando sean utilizadas cepas GRAS (generalmente reconocido como seguro) durante su tratamiento biológico. Este estudio se centra en la evaluación de tratamientos

biológicos para la sacarificación del grano gastado de cervecería y busca seleccionar e integrar metodologías que permitan su utilización como adjunto en el proceso de elaboración de cerveza tipo lager.

## ANTECEDENTES

### **Consumo mundial de cerveza.**

La cerveza es la principal bebida alcohólica consumida en todo el mundo y se ha disfrutado por más de 8,000 años. En 2013, alrededor de 1,900 millones de hectolitros se fabricaron en todo el mundo, lo que representa un aumento del 35% del consumo desde 2003. El valor global de la cerveza y las ventas por volumen crecieron un 7% y un 2%, respectivamente, en 2010. Se espera que continúe creciendo alrededor del 1.2% en los próximos años. El consumo de cerveza representa el 1.5% del consumo total de calorías en todo el mundo (FAO 2016). El uso de cereales como materia prima por la industria cervecera se puede dividir en dos principales categorías: malta y adjuntos. La malta se produce generalmente a partir de cebada debido a su alta actividad diastásica o producción de actividad de la amilasa, así como las ventajas tecnológicas que ofrece durante los pasos del lavado del grano. Los adjuntos de elaboración de la cerveza se producen a partir de la mayoría de los cereales y generalmente consisten en almidones de refinados que en fracción o maceración molidas se hidrolizan en dextrinas y carbohidratos fermentables. La primera imparte el cuerpo de la cerveza típica y la segunda azúcares que se transforman durante la fermentación de la levadura en etanol y otros compuestos de aroma y sabor característicos.

### **Cerveza *lager***

La palabra *lager* viene del verbo alemán *lagern*, que significa reposar o almacenar. Para producir cerveza tipo *lager*, la cerveza verde se almacena una vez que la fermentación ha sido concluida para permitir la maduración del sabor, separación de la levadura y otros cambios que mejoran la calidad de la cerveza (Hardwick 1995). En México, casi la totalidad de las cervezas producidas son del tipo *lager* (López et al. 2002). Las cervezas tipo *lager* se llaman cervezas de “fermentación baja” debido al comportamiento de la levadura, la cual se asienta al fondo del fermentador conforme se alenta la fermentación y la evolución del CO<sub>2</sub> no provee suficiente agitación para mantenerla a flote (Hardwick

1995). Las levaduras empleadas para elaborar este tipo de cerveza son *S. carlsbergensis* y *S. uvarum* (Iserentant 1994). Las cervezas tipo lager se elaboran con maltas secadas a menores temperaturas, en comparación con las ales. El carácter lupulado se favorece por la aromatización tardía, etapa en la cual se adiciona más lúpulo una vez concluida la fase de calentamiento en ebullición con esta planta, lo cual permite que una cantidad adecuada de aceites permanezcan en el mosto (Bamforth 2000).

### **Adjuntos cerveceros**

Los adjuntos cerveceros son cualquier fuente de almidón o azúcares fermentables que se adicionan al mosto; generalmente son granos sin germinar como cebada, trigo (*Triticum aestivum*), centeno (*Secale cereale*) y triticale (*Triticum secale*), al igual que la papa (*Solanum tuberosum*) y tapioca (*Manihot suculenta*) (Briggs et al. 1981; López et al. 2002). También se utilizan derivados de cereales como sémola, harina, granos precocidos y jarabes (Briggs et al. 1981). Su adición aumenta el rendimiento de alcohol en la fermentación, disminuye el costo de producción y contribuye en el color, sabor, aroma, contenido de proteína y retención de espuma de la cerveza (Owuama 1997; López et al. 2002). Los grits refinados son preferidos como adjuntos cerveceros debido a que contienen más carbohidratos convertibles, menos pigmentos, menos aceite y mejor color. Las cervezas resultantes son menos propensas a oxidación y tienen mejor sabor y color (Serna-Saldívar 2010). En Estados Unidos, el uso de adjuntos promedia 38% del total de materiales usados excluyendo el lúpulo. Los adjuntos más utilizados en este país son grits de maíz (46.5%), seguido por el arroz (31.4%), cebada (0.7%) y jarabes (Serna-Saldívar 1996).

### **Grits de maíz**

Los grits de maíz se producen por molienda seca de maíz amarillo, proceso con el que se remueve el pericarpio y germen dejando únicamente fragmentos de endospermo (Briggs et al. 1981). Estos fragmentos son molidos y clasificados. La temperatura de gelatinización del almidón de maíz se encuentra entre 62 a 74°C, y es ligeramente menor

al asociado a los grits de arroz que va de 64 a 78°C. La sustitución por un 30% de grits de maíz, produce compuestos aromáticos similares a los de cerveza elaborada únicamente con malta. Sin embargo, los grits de maíz tienen una extracción ligeramente menor en comparación a otros adjuntos sin procesar, además de tener una mayor cantidad de proteína y grasa (Hardwick 1995).

### **Grits de arroz**

Los grits de arroz son producto de la molienda seca de arroz, en la cual se eliminan las glumas, pericarpio, capas de aleurona y germen. Tras estas operaciones, el arroz es clasificado por tamaño. Aproximadamente un 30% de los granos son fracturados durante la molienda, produciendo fracciones pequeñas de endospermo, las cuales son posteriormente reducidos en tamaño y clasificadas para la producción de grits cerveceros. El arroz es preferido por algunos productores de cerveza debido a que contiene una menor cantidad de aceite comparado con los grits de maíz. El arroz además tiene un aroma y sabor neutral y no influye en el color de la cerveza por lo que son preferidos en la producción de cervezas claras. La desventaja del arroz es su alta temperatura de gelatinización y que es extremadamente viscoso antes de la licuefacción en el cocimiento de los adjuntos. Además, los adjuntos de arroz son aproximadamente 25% más caros que los grits de maíz (Hardwick1995).

### **Proceso industrial de producción de cerveza.**

Las cervezas regulares se producen típicamente a partir de cinco ingredientes principales: agua, malta de la cebada, adjuntos, lúpulo y levadura. El procesamiento es complejo e incluye diversas operaciones unitarias como son: malteo, maceración, lavado, cocimiento y fermentación (Serna-Saldivar 2010).

## **Malteo.**

El objetivo del malteo es lograr el máximo porcentaje de germinación y actividad diastática de la cebada y concluir el proceso con la menor pérdida posible de materia seca. El malteo se divide en tres operaciones secundarias: remojo, germinación y secado. El objetivo del remojo es hidratar el grano en condiciones aeróbicas para activar la síntesis de ácido giberélico que controlará todo el proceso de germinación. Generalmente, la operación se realiza simplemente sumergiendo o asperjando agua sobre los granos durante 24 a 80 horas para aumentar la humedad del grano hasta 42 a 48%. La mayoría de las operaciones tienen lugar en tanques verticales con una base cónica o cilindros verticales. Estos recipientes tienen tuberías perforadas para inyectar aire. La temperatura del agua juega un papel crítico porque afecta la tasa de hidratación y la estabilidad microbiológica del grano. En general, la cebada se hidrata y germina a 15 °C. Una vez alcanzada la humedad deseada se procede a germinar, este proceso se lleva a cabo habitualmente en camas colocadas dentro de habitaciones especiales con controles estrictos de temperatura y humedad relativa. Este proceso dura de 4 a 6 días. Los procesos se ajustan para lograr la actividad diastática deseada, la división celular y con la menor pérdida de materia seca. El secado detiene el proceso de malteado y el crecimiento. Las condiciones de secado son críticas para producir diferentes tipos de maltas con diferentes actividades enzimáticas, colores y sabores. Las maltas destinadas a cervezas tipo Lager son tratadas con menos color y producen mostos de color ámbar pálido o paja. Una alta temperatura de secado produce melanoidinas a partir de azúcares solubles y aminoácidos, y compuestos complejos que eventualmente afectan el sabor, el color y el aroma del mosto y la cerveza. Generalmente estas maltas se destinan a la producción de cerveza tipo Ale. Las maltas se deshidratan generalmente hasta un contenido de humedad final de aproximadamente 5%. Después del secado, la malta se enfría con aire fresco y las raíces y tallos son desprendidas. Los brotes se separan porque imparten sabores amargos, contienen alta concentración de compuestos nitrogenados, tales como las nitrosaminas (Serna-Saldivar 2010). Los dispositivos utilizados para remover los brotes, constan normalmente de una pantalla cilíndrica de rotación lenta equipada con un conjunto de batidores que separan los brotes de la malta o equipos

neumáticos que impactan la malta para liberar las raicillas que se levantan por aspiración de aire (Briggs 1998).

### **Maceración.**

La cebada es ampliamente usada para producir cerveza y en algunos países como Alemania es, por ley, empleada como única fuente de carbohidratos fermentables. Se han utilizado otras fuentes de carbohidratos principalmente por su bajo costo y en otros casos por ventajas como la producción de mayor delicadeza en el sabor, color más claro y mayor uniformidad (López et al. 2002). Algunas cervecerías agregan grits o almidón de algún cereal no malteado y gelatinizado como el maíz, arroz o sorgo (Hallgren 1995). La mayoría de las cervezas tipo Lager elaboradas en el continente americano se producen por el procedimiento de doble maceración porque las formulaciones de grano suelen contener una gran cantidad de aditivos amiláceos, como grits de maíz, almidón de maíz o harina de arroz. Estos materiales almidonados requieren cocción para conseguir la gelatinización completa del almidón. La maceración consiste en dos etapas separadas. En la primera, comúnmente conocida como maceración de adjuntos, los adjuntos almidonosos y una fracción pequeña de la malta de cebada se mezclan con agua y se calientan a 35 °C. Después de 30 a 60 minutos, se calienta primero a 70 °C durante aproximadamente 30 minutos y luego a 100 °C durante 30 a 45 min y se deja enfriar hasta los 65 °C. El objetivo es hidratar primero los adjuntos y la malta y después promueve la gelatinización y conversión del almidón ya que la mayoría de los almidones de cereal se gelatinizan a temperaturas superiores a 65 °C. La ebullición se requiere para desnaturalizar las proteínas y para inactivar todos los microorganismos y enzimas. Una vez que la maceración de los adjuntos está en curso, el segundo macerado se prepara mezclando y calentando a 35 °C la mayor parte de la malta y el agua. A continuación, se mezclan los contenidos de los dos recipientes. El objetivo de la segunda etapa de maceración es convertir el almidón y las proteínas en carbohidratos más simples y proteínas o péptidos solubles. Esto se consigue óptimamente programando un aumento gradual de temperatura que comienza a 35 °C durante aproximadamente 30 min. La temperatura sigue generalmente una rampa de 10 a 15 °C hasta lograr 70 °C. El aumento

secuencial de la temperatura favorece las enzimas proteolíticas, seguido de  $\beta$ -amilasa que tiene una temperatura óptima de 60 °C, y  $\alpha$ -amilasa que tiene una temperatura óptima de 70 °C. La alta temperatura de la última etapa de maceración detiene la mayor parte de la actividad enzimática, reduce la viscosidad y mejora la fluidez y la capacidad de filtración del mosto resultante. Durante esta operación, se agita para conseguir una mejor solubilización de la malta y para mejorar la exposición de los adjuntos a la hidrólisis enzimática. También es frecuente añadir enzimas extrínsecas tales como amilasas, amiloglucosidasas y proteasas para mejorar la extracción y reducir los tiempos de trituración. Los diferentes tipos de enzimas requieren diferentes temperaturas óptimas para que el programa de temperatura se deba ajustar en consecuencia (Serna-Saldivar 2010).

### **Lavado.**

Después de terminar el macerado, el mosto es transferido al túnel del lavado, donde el mosto dulce se separa de los granos gastados de cervecería. El túnel del lavado es un aparato relativamente poco profundo con un piso de malla doble que está equipado con rastrillos que aflojan la estructura del lecho filtrante minimizando la compactación. Se deja que los contenidos de masa se precipiten durante 30 minutos para mejorar la formación del lecho de filtración natural rico en cáscaras. El mosto dulce se separa por filtración a través del suelo de malla doble. En general, en la primera etapa de tratamiento, el mosto se recircula a través del lecho de granos gastados con el fin de disminuir la turbidez del mosto. El filtrado se lleva a cabo generalmente a temperaturas de 65 a 70 °C y los granos gastados se rocían con agua caliente de entre 75 a 80 °C. La temperatura alta del agua usada para rociar es útil para arrastrar más eficientemente los sólidos. El objetivo del lavado es obtener tanto del mosto dulce o extracto con la mínima contaminación insoluble. La operación del lavado es considerada el cuello de botella del proceso de elaboración de la cerveza. Cuanto más rápidamente se filtre, más cerveza se pueden producir diariamente (Serna-Saldivar 2010).

## **Cocimiento.**

El proceso de cocimiento implica la adición de lúpulo a las cervezas. El lúpulo se añade al mosto dulce con el fin de impartir el sabor y el olor característico. El tipo y la cantidad utilizada afectarán de forma importante el sabor, aroma y sensación en boca final de la cerveza. El proceso consiste simplemente en agregar el lúpulo al mosto para promover la extracción de solubles por ebullición y lixiviación durante 1.5 a 2.5 horas. Por lo general, de la mitad a dos tercios del lúpulo se añaden al comienzo del cocimiento y el resto al final del proceso con el objetivo de mantener compuestos volátiles clave que realzan el sabor y el aroma de la cerveza. Durante la ebullición, las enzimas se inactivan, el mosto se vuelve más oscuro debido a compuestos de mosto intrínsecos y reacciones de caramelización y el mosto se vuelve estéril. Durante este tratamiento térmico de 4 a 12% de agua se pierde debido a la evaporación. Además, algunas proteínas solubles se unen a los taninos y precipitan mejorando la claridad. Los lúpulos gastados se eliminan del mosto usando el principio de hidromasaje. El mosto de ebullición se hace pasar tangencialmente en una gran bañera de hidromasaje equipada con un colector cónico situado en la parte central de la base del aparato. El mosto se enfría en un intercambiador de calor a aproximadamente 6 °C para cervezas Lager tradicionales. El mosto también es aireado con aire estéril con el fin de aumentar su contenido de oxígeno, que es de importancia crítica para el crecimiento de la levadura, especialmente durante la fase temprana de la fermentación. Durante el enfriamiento, más proteínas se vuelven insolubles y se eliminan por centrifugación (Serna-Saldivar 2010).

## **Fermentación.**

El mosto es fermentado en tanques especiales o reactores equipados con serpentines de refrigeración o chaquetas. El mosto es inoculado con 1.5 a 2.5 g de levadura seca/L. Durante la primera etapa de fermentación, la levadura se reproduce asexualmente por gemación aumentando la biomasa de 4 a 5 veces y utilizando el oxígeno disponible. Así, las condiciones cambian gradualmente de aeróbico a anaeróbico. Se considera que después de 12 a 24 horas de fermentación las condiciones del reactor son anaeróbicas. Durante esta fase, la levadura metaboliza los carbohidratos fermentables y el aminoácido

libre para producir etanol y alcoholes de fusel, respectivamente. Los alcoholes de fusel principales son isopropanol, amílico, isoamílico y butanol. Durante esta etapa, también se produce dióxido de carbono y productos orgánicos intermedios que ayudan a impartir el sabor característico de la cerveza (Priest y Stewart 2006). El proceso de fermentación se lleva a cabo a baja temperatura de 7 a 15 °C durante 8 a 10 días para cervezas tipo Lager. Durante la fermentación, las células de levadura transforman la maltosa y la maltotriosa en glucosa que se metaboliza adicionalmente en dióxido de carbono, energía, etanol y otros metabolitos orgánicos tales como ácidos orgánicos y compuestos volátiles. Aproximadamente un tercio de los azúcares fermentables se transforman en dióxido de carbono. En el progreso de la fermentación se suele seguir usando un refractómetro que mide la densidad de la cerveza. La densidad inicial del mosto es de aproximadamente 1,040 y el producto acabado entre 1,008 y 1,010 g/cm<sup>3</sup>. La producción de ácido orgánico disminuye el pH a un nivel de 4.2. El cambio en la acidez coagula algunas proteínas y disminuye aún más la solubilidad de algunas resinas ácidas del lúpulo. También durante la fermentación cantidades importantes de nitrógeno soluble se metabolizan en alcoholes de fusel que afectan las propiedades organolépticas de la cerveza. Además, la dulzura de las cervezas se debe a los azúcares residuales que no se han fermentado a alcohol. La mayoría de las cervezas se mantienen en tanques cerrados a una temperatura de 0 °C durante 4 a 6 semanas adicionales con el fin de reducir aún más el oxígeno a un nivel de menos de 0.2 ppm y mejorar el aroma, debido a cambios químicos tales como la generación de diacetilo, dimetilsulfuro y sulfuro de hidrógeno (Bamforth 2003).

### **Subproductos cerveceros.**

Las plantas de elaboración de la cerveza en todo el mundo generan gran cantidad de subproductos sólidos en forma de salvado de malta generalmente llamado grano gastado de cervecería y pasta de levadura de desecho. Estos residuos son a menudo transformados en alimento para ganado o fertilizantes. Estos subproductos son generados en grandes cantidades por lo que la disposición inadecuada de estos residuos produce contaminación ambiental y la pérdida de útiles recursos biológicos.

### **Grano gastado de cervecería (BSG).**

Es el principal subproducto de la industria cervecera, que representa alrededor del 85% del total de subproductos generados. El BSG es generado durante el macerado dentro de la elaboración de cerveza, en este proceso ocurre una conversión enzimática que libera los azúcares disponibles en la malta a un líquido dulce conocido como mosto. La parte insoluble se deja sedimentar y se realizan repetidos lavados para terminar de extraer la totalidad de los azúcares fermentables en un proceso conocido como lavado, el mosto dulce es el sustrato para la elaboración de cerveza, mientras la fracción sólida residual corresponde al grano gastado de cervecería (Mussatto et al. 2008). El grano gastado de cervecería se compone principalmente de la cáscara, pericarpio y cubiertas de la semilla de la cebada. Dependiendo del tipo de cerveza del que procede el grano gastado de cervecería puede contener residuos de malta de cebada y adjuntos, es decir, fuentes de azúcares fermentables que no corresponden a la malta, como pueden ser trigo, arroz o maíz (Mussatto et al. 2008). Dependiendo de la uniformidad del malteado, pueden quedar en mayor o menor cantidad restos de almidón en el endospermo y restos de pared celular. Aun así, el contenido de almidón es insignificante comparado a los compuestos de las paredes celulares de la cáscara, pericarpio y cubiertas de la semilla, las cuales son abundantes en polisacáridos de celulosa y no-celulosa, lignina, algunas proteínas y lípidos. La cáscara a su vez presenta altos contenidos de silicio y polifenoles (Mussatto et al. 2006). La composición química del BSG varía dependiendo del tipo de malta, tiempo de cosecha, condiciones de malteo y macerado, además del tipo y cantidad de adjuntos adicionados para la elaboración del mosto (Santos et al. 2003). Pero de manera general el BSG es considerado un material lignocelulósico rico en proteína y fibra, que puede alcanzar un 20 y un 70% de estos compuestos respectivamente (Huige 1994; Santos et al. 2003).

### **Composición de materiales lignocelulósicos.**

Compuestos principalmente de tres tipos diferentes de polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina (Fengel y Wegener 1984), envueltos en una compleja estructura. Este tipo de materiales son los más abundantes en la naturaleza.

### **Celulosa.**

Está conformada por subunidades de D-glucosa, unidas por b-1,4 glicosídicos (Fengel y Wegener 1984), monosacárido de gran importancia en la fermentación. La celulosa posee dos estructuras una cristalina (organizada) y otra amorfa. Las cepas de celulosa son “empaquetados” denominados fibrillas de celulosa. Estas fibrillas de celulosa son en su mayoría independientes y débilmente vinculados a través de uniones de hidrógeno (Laureano-Pérez et al. 2005).

### **Hemicelulosa.**

Carbohidrato complejo y heterogéneo ya que su estructura posee diferentes polímeros como pentosas: xilosa y arabinosa; hexosas: como manosa, glucosa y galactosa; y ácidos entrelazados entre sí glucosídicamente. Muchas de ellas, en la degradación hidrolítica dan, junto a glucosa, manosa, galactosa, etc (Palacio 1956). La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y da toda la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina (Laureano-Pérez et al. 2005).

### **Lignina.**

Heteropolímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (pcoumaril, coniferil y sinapil alcohol) que se mantienen unidos por diferentes enlaces. El heteropolímero amorfo no es soluble en agua y es ópticamente inactivo; todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy complicada (Fengel y Wegener 1984).

### **Degradación de material lignocelulósico.**

Su objetivo es maximizar el potencial de uso de subproductos agroindustriales, cuya disposición final es un gran problema ambiental. La biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa se encuentra entre 75-80%, los cuales, pese a su dificultosa degradación, es posible desdoblarlos a azúcares monosacáridos mediante

procesos químicos, físicos y biológicos para su posterior conversión a etanol. La hidrólisis enzimática de los carbohidratos complejos se considera como la tecnología más ecológicamente amigable para el tratamiento de esta biomasa. Desde el punto de vista microbiano, la biomasa lignocelulósica representa un ecosistema complejo en el que las condiciones afectan el desarrollo de la microbiota y favorece el crecimiento de aquellos microorganismos que posean las enzimas capaces de degradar moléculas complejas como la celulosa y la hemicelulosa presente en esta biomasa y que podría ser utilizada como fuente de carbohidratos fermentable para la obtención de alcohol (Soares et al. 2012). Generalmente, a nivel industrial, la bioconversión del material celulósico a azúcares fermentables se realiza utilizando un mix de reacción complejo compuesto de múltiples enzimas que puedan realizar la hidrólisis completa. El coste de la producción de dichos mixes sigue siendo elevado debido a las múltiples operaciones unitarias, de aireación, bombeo, agitación, neutralización y purificación (Maki, et al. 2009). Diversos organismos capaces de producir enzimas hemicelulolíticas capaces de realizar la hidrólisis total de los diferentes biopolímeros se han podido aislar de diferentes fuentes ambientales naturales, como el compost (Amore et al. 2013; Sizova, et al. 2011). Pertenecen a grupo de microorganismos específicos capaces de sintetizar celulasas, xilanasas y otros biocatalizadores necesarios para la completa hidrólisis de los componentes recalcitrantes de la biomasa lignocelulósica (Tahezadeh y Karimi 2007). Los microorganismos celulolíticos pueden sintetizar diversas enzimas como endoglucanasas, exoglucanasas, incluyendo D-celodextrinasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glicosidasas, las cuales cooperan en la degradación de la celulosa. De hecho, los microorganismos hemicelulolíticos producen xilanasas para degradar xilano en xilosa, entre estas enzimas están las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas y  $\beta$ -xilosidasas así como otras enzimas auxiliares como las  $\alpha$ -glucuronidasas,  $\alpha$ -arabinofuranosidasas, acetilesterasas y acetil-xilan-esterasas (Saini y Tewari 2012.).

### **Tratamientos biológicos.**

En este tratamiento el material lignocelulósico se somete a la acción de determinadas enzimas o microorganismos, como los hongos de la podredumbre blanca, marrón o

blanda. El objetivo es degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático, por lo que generalmente se hace necesario hacer primero un tratamiento con hongos y posteriormente con las enzimas. Tratamiento con hongos: Utiliza microorganismos como hongos de podredumbre marrón, blanco y suave se para degradar lignina y hemicelulosa en los materiales de desecho. La podredumbre marrón ataca la celulosa, mientras que la podredumbre blanca y suave ataca tanto la celulosa como la lignina. Hongos de pudrición blanca (basidiomicetos) son los más eficaces para el pretratamiento biológico de materiales lignocelulósicos. Los hongos usados fueron *Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *Pleurotus ostreatus*, y *Coriolus versicolor* (Fan et al. 1987).

#### ***Streptomyces setoni.***

Las actinobacterias, principalmente *Streptomyces*, son conocidas como los principales microbios que degradan la biomasa vegetal en los bosques pantanosos, están involucrados en la degradación de glucósidos complejos como la quitina y la celulosa y son fundamentales en la degradación de lignina y polifenólicos (Castillo et al. 2013). La degradación de la biomasa en el proceso de compostaje, incluida la deconstrucción de la lignocelulosa recalcitrante, se realiza completamente mediante enzimas bacterianas. (Martins et al. 2013).

#### ***Trichoderma harzianum.***

Este es un hongo filamentos, amorfo y asexual, comúnmente recolectado en suelos de todas las latitudes, en la rizosfera y en materia orgánica herbácea en descomposición. *Trichoderma sp* secreta enzimas que son capaces de degradar polisacáridos como quitina, celulosa y hemicelulosa. Las enzimas secretadas por este hongo han sido bien caracterizadas por diversos grupos y han sido utilizadas durante las últimas seis décadas en diferentes aplicaciones en las industrias textiles, de papel, de alimentos y bebidas. Su gran potencial para la degradación le han hecho acreedor de aplicaciones como la

conversión de biomasa de plantas a azúcares fermentables para la producción de bioetanol de segunda generación (Cologna et al. 2018).

### ***Pleurotus ostreatus.***

*Pleurotus spp.*, comúnmente conocido como hongo de la ostra, es un descomponedor primario común de madera y vegetal residuos (Zadrazil y Kurtzman 1981). Puede ser naturalmente encontrado en selvas tropicales y subtropicales, y puede ser cultivado artificialmente (Maziero et al. 1992). Apreciado por su delicioso sabor, este hongo tiene altas cantidades de proteínas, carbohidratos y minerales como calcio, fósforo y hierro. También posee vitaminas como tiamina, riboflavina y niacina, así como baja grasa (Sturion y Oetterer 1995). Por muchas razones, los hongos del género *Pleurotus* se han estudiado intensamente en muchas partes diferentes en el mundo: tienen un alto valor gastronómico, son capaz de colonizar y degradar una gran variedad de residuos lignocelulósicos, requieren un tiempo de crecimiento más corto cuando se los compara con otros hongos comestibles, demandan pocos controles ambientales, sus cuerpos fructíferos no son muy a menudo atacados por enfermedades y plagas y se pueden cultivar de una manera simple y barata (Patrabansh y Madan 1997).

### ***Aspergillus oryzae.***

*Aspergillus oryzae*, comúnmente conocido como koji, ha sido utilizado históricamente en fermentaciones alimentarias asiáticas como la salsa de soja, miso, sake y otros productos japoneses tradicionales. Naturalmente produce enzimas amilolíticas y proteolíticas (Machida et al 2008). A pesar de estar relacionado con *Aspergillus flavus* productor de aflatoxina, *Aspergillus oryzae* se clasifica como GRAS a pesar de contener homólogos de varios genes de la ruta de biosíntesis de las aflatoxinas no las produce debido a mutaciones en su genoma como deleciones y otros defectos genéticos que han llevado a silenciar la vía de la aflatoxina en *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus sojae* (Kiyota et al 2011).

## JUSTIFICACIÓN.

La producción mundial anual promedio de cerveza se estima en 39 millones de toneladas. Al finalizar el proceso de producción de cerveza, el principal subproducto, que representa alrededor del 85% del total de subproductos generados, es el denominado grano gastado de cervecería, del cual se producen alrededor de 20 kg por cada 100 litros de cerveza elaborada. Este subproducto es generado en gran cantidad por lo que su disposición inadecuada produce contaminación ambiental y pérdida de recursos biológicos.

Se espera que la industria cervecera continúe creciendo, lo que por consiguiente provocará la generación de mayores cantidades de BSG. Este subproducto ha sido pobremente explotado, a menudo transformado en alimento para ganado o fertilizantes. Se busca maximizar su potencial de uso, al tratarse de un material rico en carbohidratos complejos que podrían ser utilizados en la obtención de productos de valor agregado si son tratados de la forma adecuada. La utilización de este material de desecho podría verse favorecida por las aplicaciones biotecnológicas.

Este estudio se centra en la evaluación de tratamientos biológicos, como es la fermentación en sustrato sólido utilizando diversos microorganismos con actividades lignocelulolíticas previamente reportadas para la sacarificación del grano gastado de cervecería (*Streptomyces setonni*, *Aspergillus oryzae*, *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum*). Además, busca seleccionar e integrar metodologías que permitan la utilización del BSG como adjunto en el proceso de elaboración de cerveza tipo lager. Este proyecto determinará cuál de los tratamientos a probar es el más efectivo, recolectando datos que sirvan de evidencia para la posterior introducción de un proceso a industrias cerveceras locales, mejorando la producción, ahorrando costos y reduciendo la contaminación ambiental y desperdicio de recursos naturales basados en un esquema de economía verde.

## **HIPÓTESIS.**

El tratamiento del grano gastado de cervecería mediante un proceso de fermentación en sustrato sólido con un microorganismo, permite obtener un producto que funcione como fuente de carbohidratos fermentables y enzimas exógenas para un proceso de elaboración de cerveza tipo Lager.

## OBJETIVOS

### Objetivo general.

Generar un adjunto cervecero a partir de grano gastado de cervecería, mediante tratamientos biológicos de fermentación en sustrato sólido, que sea una fuente de azúcares fermentables y enzimas exógenas para la producción de una cerveza tipo lager de buena calidad.

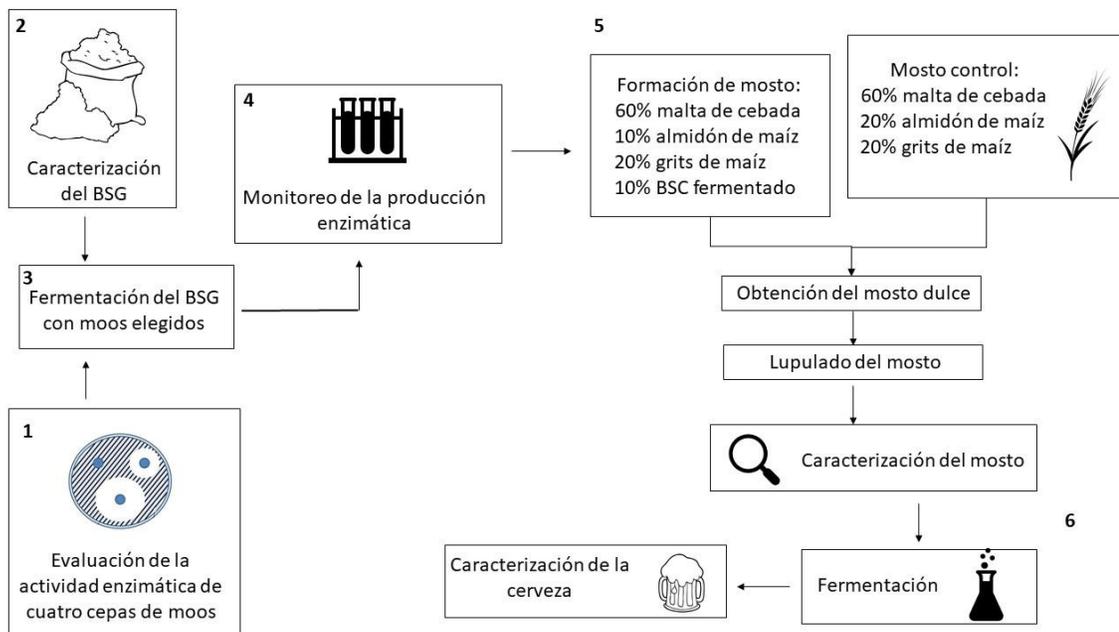
### Objetivos específicos.

1. Seleccionar el microorganismo que tenga un perfil de producción enzimática más adecuado para la hidrólisis de material lignocelulósico a partir de los microorganismos *Streptomyces setonni*, *Aspergillus oryzae*, *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum*.
2. Evaluar la cinética de crecimiento del microorganismo elegido, así como la producción de enzimas ( $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, amiloglucosidasa, pululanasa, exo-glucanasa, endo-glucanasa, y xilanasas) durante la fermentación en sustrato sólido sobre el grano gastado de cervecería.
3. Obtener y caracterizar fisicoquímicamente mostos dulces utilizando el adjunto hidrolizado.
4. Obtener, caracterizar y comparar las propiedades de cerveza lager con adjunto hidrolizado contra una cerveza lager regular.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### Estrategia general.

La metodología se puede dividir en seis pasos principales: A) la selección de una cepa microbiana que sea capaz de generar enzimas que degraden el material lignocelulósico B) la caracterización del grano gastado de cervecería, C) la deslignificación del grano mediante fermentación sustrato sólido, D) la caracterización del producto hidrolizado E) la producción del mosto dulce y F) la fermentación del mosto lupulado a cerveza. El esquema general se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Estrategia general de trabajo. 1) Selección de una cepa microbiana que sea capaz de generar enzimas que degraden el material lignocelulósico. 2) Caracterización del grano gastado de cervecería, 3) Deslignificación del grano mediante fermentación sustrato sólido, 4) Caracterización del producto hidrolizado 5) Producción del mosto lupulado y 6) Fermentación del mosto lupulado a cerveza.

### **Evaluación de la actividad enzimática en medio sólido.**

Se evaluaron cuatro cepas de diferentes microorganismos: *Streptomyces setonni*, *Trichoderma reesi*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus oryzae*. Después de ajustar la turbidez de la suspensión de microorganismos a 0.5 unidades de McFarland, los microorganismos se inocularon en los agares recomendados para cada cepa. Todas las cepas fueron analizadas para actividades endocelulasa, exocelulasa, celobiasa, xilanasas y pectinasas. La actividad fue registrada como Índice de actividad enzimática relativa (Saini y Tewari 2012.):

$$I_{enzima} = \text{diámetro del halo} / \text{diámetro de la colonia}$$

### **Actividad endocelulolítica.**

Se evaluó de forma semi cuantitativa por método de difusión en agar CMC. El contenido del agar fue: 5 g de carboximetilcelulosa [Sigma–Aldrich], 1 g (NH<sub>4</sub>)NO<sub>3</sub>, 1 g de extracto de levadura, 50 ml de solución estándar de sales, 1 ml de solución de elementos trazas y 950 ml de agua destilada. Después de 4 días de incubación a 28°C las placas fueron teñidas con una solución de Rojo de Congo al 0.1% por 30 minutos, seguido de un lavado con solución de NaCl 5M (Pepe et al. 2013).

### **Actividad exocelulolítica.**

Fue estimada al inocular las bacterias en agar Avicel, es decir utilizando celulosa microcristalina como única fuente de carbono. El contenido del agar fue: 5 g de Avicel [Sigma–Aldrich], 1 g (NH<sub>4</sub>)NO<sub>3</sub>, 1 g de extracto de levadura, 50 ml de solución estándar de sales, 1 ml de solución de elementos trazas y 950 ml de agua destilada. Se midió el crecimiento de las colonias después de 4 días a 28°C (Pepe et al. 2013).

### **Actividad celobiohidrolasa.**

Se realizó en agar celobiosa. El contenido del agar fue: 10 g de peptona, 15 g de agar [Oxoid], 7.5 g de celobiosa, 0.06 g de azul de bromotimol [Sigma-Aldrich] y 950 ml de agua destilada. Después de la incubación a 28°C por 3 días, la actividad enzimática fue determinada por la medición de halos amarillos alrededor de la colonia (Ventorino et al. 2015).

### **Actividad xilanasa.**

Se realizó en agar LB [Oxoid] adicionando con 0.05% de remazol azul brillante y 0.5% de xilano [Sigma-Aldrich]. Después de 4 días de incubación a 28°C se determinó la hidrólisis del xilano al observar el halo claro alrededor de las colonias (Ko et al. 2012).

### **Actividad pectinasa.**

Se midió en agar cuyo contenido fue: 2 g de pectina [Sigma–Aldrich], 1 g de extracto de levadura, 50 ml de solución estándar de sales, 1 ml de solución de elementos trazas, 5 g de CaCO<sub>3</sub> y 950 ml de agua destilada. Después de 4 días a 28 °C las placas fueron reveladas con una solución al 1% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Después de 30 min, se midió el halo decolorado alrededor de las colonias (Pepe et al. 2013).

### **Caracterización química y física del grano gastado.**

El grano gastado fue proporcionado por la cervecería Cuauhtémoc Moctezuma/Heineken (Monterrey, México).

### **Humedad.**

Fue analizada por un método de ensayo gravimétrico 44-15 (AACC 2000) donde las muestras se secaban en un horno a 100 ° C. Las muestras fueron molidas usando un molino ciclón UDY.

### **Contenido de proteína.**

Fue obtenido mediante la determinación del contenido de nitrógeno total por el procedimiento Kjeldhal basado en método 46-13.01 (AACC 2000). Brevemente, las muestras fueron digeridas con ácido sulfúrico y catalizadores. Luego, el hidrolizado fue destilado con exceso de álcali (NaOH) para convertir NH<sub>4</sub> a NH<sub>3</sub>. El NH<sub>3</sub> fue recuperado por destilación del producto reacción. Posterior titulación con una solución de ácido clorhídrico normal cuantificando la cantidad de amoníaco en la solución receptora con un cambio de color. El nitrógeno fue convertido a proteína multiplicando por el factor de 6.25.

### **Contenido de lípidos**

Fue determinado mediante el método Goldfish de extracción continua con solvente. La muestra pulverizada se colocó en un dedal filtrante cerámico y se mantuvo por 4 horas en el equipo utilizando éter etílico anhidro como solvente, el cual fue retirado y la grasa fue determinada gravimétricamente (Nielsen S. 2003).

### **Contenido de fibra**

Fue obtenido mediante la determinación del contenido de fibra dietética total correspondiente a las determinaciones conjuntas de fibra dietética soluble e insoluble. Se determinó utilizando un kit de Megazyme® Total dietary fiber, K-TDFR-100. AOAC. Método 985.29. En material desgrasado (contenido de grasa > 10%). Las muestras se trataron a ~ 100 ° C con  $\alpha$ -amilasa termoestable para gelatinizar, hidrolizar y despolimerizar el almidón; seguido de incubación a 60 ° C con proteasa (para solubilizar y despolimerizar proteínas) y amiloglucosidasa (para hidrolizar fragmentos de almidón a glucosa); y tratado con cuatro volúmenes de etanol para precipitar la fibra soluble y eliminar proteína y glucosa (de almidón). El residuo fue filtrado; lavado con etanol al 78%, etanol al 95% y acetona; secado y pesado. Un duplicado se analizó en busca de proteínas y el otro se calcinó a 525 °C para determinar la ceniza. El contenido de fibra dietaria total es el peso del filtrado y residuo seco menos el peso de la proteína y la ceniza (AOAC 2007)

### **Contenido de almidón.**

El procedimiento se llevó a cabo con el kit de Megazyme que utiliza  $\alpha$  amilasa termoestable y amiloglucosidasa para convertir almidón en glucosa. La glucosa se cuantificó después de la reacción de oxidasa de glucosa en un espectrofotómetro a 510 nm (AOAC 1980).

### **Contenido de ceniza.**

El contenido de cenizas se determinó utilizando el método gravimétrico en el que las muestras son incineradas en un horno de mufla a 550°C. El procedimiento utilizado se basó en el método 08-01 (AACC 2000).

## **Fermentación del grano gastado**

Se cultivó en placas de agar papa dextrosa a 30 °C durante cinco días. Entonces se recogieron las esporas y se contaron en una cámara de Neubauer y se inocularon en caldo de papa dextrosa y se dejaron crecer durante cinco días adicionales en una incubadora con agitación a 30 °C y 200 rpm. El medio se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos en tubos estériles para concentrar micelio. Se inoculó el grano gastado de cervecería con el micelio fresco de *Aspergillus oryzae* equivalente al 1% del peso del grano gastado. La cinética de crecimiento se realizó monitoreando el crecimiento del hongo en el grano gastado de cervecería con el fin de determinar la viabilidad y el crecimiento de *Aspergillus oryzae* durante todo el proceso. Las muestras se tomaron todos los días. La preparación de la muestra fue de acuerdo con las disposiciones del método 995.21 para cuenta de hongos y levaduras en alimentos (AOAC 1980). La muestra fue diluida en tampón salino fosfato primario para obtener una distribución uniforme. La dilución luego se inoculó en medio PDA acidificado a un 3.5 pH usando ácido tartárico de 1%. Después de incubación a 25 °C, las colonias fueron contadas después de 72 horas mediante un contador de colonias manual. El peso de los matraces junto con la matriz era medido diariamente a partir de 0 días (inmediatamente después de la inoculación) durante un período de 12 días. Diferencia en el peso de planos en intervalo diario y el tiempo de 0 días indica la pérdida de agua y fue reemplazado asepticamente con adición de agua estéril para mantenimiento del 50% de contenido de humedad.

## **Monitoreo de la producción de enzimas**

### **$\alpha$ -amilasa.**

La actividad enzimática de  $\alpha$  amilasas en el BSG tratado con *A. oryzae*, se determinó utilizando un kit de Megazyme® Ceralpha, K-Cera 02/17, basado en colorimetría utilizando como sustrato, el oligosacárido "P-nitrofenil maltoheptaósido bloqueado en el extremo no reductor" (BPNPG7) en presencia de niveles excesivos de una  $\alpha$  glucosidasa termoestable. En la hidrólisis del oligosacárido por acción de las  $\alpha$ -amilasa, la  $\alpha$ -glucosidasa presentes en la mezcla da hidrólisis instantánea y cuantitativa del sustrato a glucosa y p-nitrofenol libre. La reacción finaliza y los iones fenolato se desarrollan

mediante la adición de álcali diluido. La absorbancia se lee a 400 nm y el valor obtenido se correlaciona directamente con la actividad  $\alpha$ -amilasa.

### **$\beta$ -amilasa.**

La actividad enzimática de  $\beta$  amilasas en el BSG tratado con *A. oryzae*, se determinó utilizando un kit de Megazyme Betamyl-3, K-Beta3 10/10, basado en colorimetría utilizando como sustrato el oligosacárido p-nitrofenil- $\beta$ -D-maltotriosida (PNP $\beta$ -G3). En la hidrólisis del PNP $\beta$ -G3 a maltosa y p-nitrofenil- $\beta$ -Dglucosa por  $\beta$ -amilasa, la p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucosa es inmediatamente escindido a D-glucosa y p-nitrofenol libre por la  $\beta$ -glucosidasa presente en la mezcla de reacción. La reacción finaliza y los iones fenolato se desarrollan mediante la adición de álcali diluido. La absorbancia se lee a 400 nm y el valor obtenido se correlaciona directamente con la actividad  $\beta$ -amilasa (Santos y Riss 1996)

### **Amiloglucosidasa.**

La actividad enzimática de amiloglucosidasa en el BSG tratado con *Aspergillus oryzae* se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Megazyme R-AMGR3. El método utiliza el p-nitrofenil  $\beta$ -D-maltosido,  $\beta$ -glucosidasa que en presencia de amiloglucosidasa permiten la degradación hasta D-glucosa y p-nitrofenol libre. La reacción finaliza y los iones fenolato se desarrollan mediante la adición de álcali diluido. La absorbancia se lee a 400 nm y el valor obtenido se correlaciona directamente con actividad amiloglucosidasa (McCleary et al. 1991).

### **Pululanasa.**

La actividad enzimática de pululanasa en el BSG tratado con *A. oryzae*, se determinó utilizando un kit de Megazyme PullG6, K-PullG6 06/17, basado en colorimetría utilizando como sustrato el 4,6-O-bencilideno-4-nitrofenil-6- $\alpha$ -D-maltotriosil-maltotriosa (BPNPG3G3), junto con las enzimas auxiliares  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa. Tras la hidrólisis del sustrato en el enlace 1,6- $\alpha$  mediante pululanasa, el 4-nitrofenil- $\beta$ -maltotriosido liberado se hidroliza inmediatamente a glucosa y 4-nitrofenol por la acción de la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa de la mezcla de reactivos. La reacción finaliza y los iones fenolato se desarrollan mediante la adición de álcali diluido. La

absorbancia se lee a 400 nm y el valor obtenido se correlaciona directamente con la actividad pululanasa (Mangan et al. 2015).

### **Betaglucanasa.**

La actividad enzimática de betaglucanasa en el BSG tratado con *A. oryzae*, se determinó utilizando un kit de Megazyme Azo-Barley Glucan Method, K-MBGL 03/11. El método utiliza el sustrato de Azo- glucano de malta, el cual se despolimeriza mediante  $\beta$ -glucanasa a fragmentos que son solubles en presencia de una solución precipitante. Se centrifuga la mezcla de reacción, y se mide la absorbancia a 590 nm del sobrenadante, la cual está directamente relacionada con el nivel de betaglucanasa (Rotter et al. 1990).

### **Celulasa.**

La actividad enzimática de celulasa en el BSG tratado con *A. oryzae*, se determinó utilizando un kit de Megazyme AZO-CM-Cellulose. S-ACMCL 09/12. El método utiliza el sustrato AZO-CMC, el polisacárido se tiñe con azul brillante Remazol hasta una extensión de aproximadamente una molécula de colorante por cada 20 residuos de azúcares, el cual es despolimerizado para producir fragmentos de bajo peso molecular teñidos que permanecen en solución al agregarse una solución precipitante a la mezcla de reacción. El material de alto peso molecular se elimina por centrifugación y el color del sobrenadante se mide y se compara a una curva estándar.

### **Xilanasa.**

La actividad enzimática de xilanasa en el BSG tratado con *A. oryzae*, se determinó utilizando un kit de Megazyme AZO-WAX. K-AZOWAX 09/04. El método utiliza el sustrato de Azo- arabinosilano de trigo el cual se despolimeriza mediante xilanasa a fragmentos que son solubles en presencia de una solución precipitante. Se centrifuga la mezcla de reacción, y se mide la absorbancia a 590 nm del sobrenadante, la cual está directamente relacionada con el nivel de xilanasa (McCleary, 1999).

### **Producción del mosto a partir del grano gastado inoculado**

Para la producción del mosto se utilizó una mezcla de 60% malta de cebada, 10% de almidón de maíz, 20% de grits de maíz y 10% de grano gastado inoculado con

*Aspergillus oryzae*. Como mosto control se utilizó una mezcla de 60% malta de cebada, 20% almidón de maíz y 20% grits de maíz. La malta de cebada utilizada fue malta de cebada diastática y desglumada deshidratada fue proporcionada por la cervecería Cuauhtémoc Moctezuma/Heineken (Monterrey, México). El almidón nativo de maíz se obtuvo de Industrias Mexstarch SAPI de CV (Monterrey, México). Se obtuvieron los grits de maíz amarillo de Agroindustrias Integradas del Norte SA de CV (Guadalupe, México) con un tamaño de partícula de malla de 40-60.

### **Proceso de maceración.**

Los adjuntos se mezclaron con 10% de la cantidad total de malta, luego se mezcló con agua desionizada en una relación 1: 2,3 y se calentó primero a 50°C durante 30 minutos y luego se aumentó la temperatura hasta la ebullición. Después de alcanzar de ebullición, el calor se interrumpió y el contenido se dejó enfriar a 67 °C.

### **Etapas de conversión.**

El resto de la malta se mezcló con agua desionizada en una relación 1: 2.7 y se calentó a 45 °C. A continuación, el contenido del puré de malta adjunto se mezcló con la suspensión y se incubaron a una temperatura de 55 °C durante 30 minutos. Después, la temperatura de la mezcla se elevó a 76 °C y se mantuvo durante 30 minutos para el control de malta de cebada 45 min para el tratamiento. Posteriormente, la temperatura se aumentó hasta la ebullición y el contenido se dejó enfriar.

### **Lavado.**

El puré se filtró primero a través de un tamiz de malla 20 que retiene las partículas gruesas. El filtrado resultante se hizo pasar además a través de una malla 60 para eliminar las partículas finas insolubles. Los granos cerveceros gastados se rociaron tres veces con agua caliente a 80 °C para maximizar la recuperación de compuestos solubles. Los grados Plato y el volumen del mosto resultante se midieron con el fin de calcular la cantidad de agua necesaria para ajustar el mosto a 15 °P. el grado plato fue medido con un refractómetro manual con 0 a 30° escala de Plato. El volumen final ajustado se registró como rendimiento de mosto.

### **Adición de Lúpulo.**

Los lúpulos fueron donados por la cervecería de Cuauhtémoc Moctezuma/Heineken (Monterrey, México). La variedad utilizada fue cascada en forma de pellets y con 15 unidades de amargor. Esta variedad de lúpulo contiene 5.5 a 9% de ácido alfa y 6-7.5% de ácido beta. El contenido de aceite esencial total es de 0.8-2.5 mL/100 g. Los gránulos de lúpulo Cascade se añadieron al mosto dulce ajustado a 15° Plato en una relación de 0.35 g / 50. En un recipiente, el 90% del lúpulo se añadieron al mosto dulce antes de calentar a ebullición durante 50 minutos. Los restantes 10% lúpulo se añadieron 10 minutos antes de suspender calor. El mosto lupulado se centrifugó a 1,800 x G durante 10 minutos a fin de eliminar los lúpulos gastados y los sólidos Trub por decantación, y luego se ajustó con agua estéril a 15 °P.

### **Caracterización de los mostos.**

#### **Amino nitrógeno libre (FAN).**

Se determinó por un método de espectrofotometría mediante colorimetría después de la reacción de la ninhidrina. El procedimiento de mostos se basaba en el método 8.10 (EBC 2008) da una estimación de los aminoácidos, amoníaco y además, los grupos del nitrógeno amino alfa terminal de péptidos y proteínas.

#### **Carbohidratos fermentables.**

El contenido de fructosa, glucosa y azúcares con 2 y 3 grado de polimerización se determinaron mediante cromatografía líquida alta en rendimiento (HPLC) con detector de índice de refracción. Se utilizó el método 8.7 (EBC 2008).

#### **Color.**

Este fue determinado por espectrofotometría (IM) y se midió a 430 nm. El método utilizado fue el 8.5 (EBC 2008).

#### **pH.**

Se midió con un potenciómetro previamente calibrado con tampones de pH 4.0 y 7.0.

### **Rendimiento.**

El rendimiento ajustado se midió volumétricamente; mientras que el grano gastado y los sólidos perdidos por centrifugación se analizaron gravimétricamente.

### **Fermentación del mosto a cerveza**

#### **Oxigenación.**

El mosto que se transporta en jarras de litro esterilizado se vierte en un matraz de 6 litros dentro de una campana microbiológica equipada con un mechero de Bunsen alimentadas a gas para evitar la contaminación cruzada. Un oxigenador previamente esterilizado fue introducido en el mosto, a través de un tubo esterilizado con una válvula. El tiempo de oxigenación se estableció en 5 minutos. Dentro del área estéril, el mosto oxigenado fue trasladado al reactor de fermentación

#### **Inoculación.**

Una vez que el mosto llegó a la temperatura de 12 °C, se agregó levadura en un equivalente a  $6 \times 10^6$  células/ml. Se utilizó levadura tipo lager fresca de *Saccharomyces spp.* Esta fue proporcionada por la cervecería de Cuauhtémoc Moctezuma/Heineken (Monterrey, México).

#### **Fermentación.**

La fermentación lager duró 120 horas. Las primeras 24 horas fueron fijadas en 12 °C y luego a 15 °C para las restantes 96 horas. Se tomaron muestras a las 0 y 120 horas para los análisis de mosto y cerveza.

#### **Maduración.**

Después de 120 horas de fermentación, el procedimiento de maduración tuvo lugar. La temperatura de los tanques de fermentación se fijó en 2 °C durante 24 horas. Concluido el proceso de maduración, el sedimento de levadura fue removido.

#### **Almacenamiento.**

La cerveza se almacenó en jarras de vidrio estéril a 2°C hasta su posterior análisis. Las jarras fueron cubiertas con papel de aluminio y una cantidad mínima de espacio fue dejada para prevenir oxidación y deterioro.

### **Análisis de la cerveza.**

El análisis de la cerveza se basa en el European Brewing Convention (EBC 2008) y la sociedad americana de químicos en elaboración de la cerveza (ASBC 1994).

### **Amino nitrógeno libre (FAN).**

Se determinó por un método de Espectrofotometría mediante colorimetría después de la reacción de la ninhidrina. El procedimiento en cervezas se basaba método 9.10 (EBC 2008). Da una estimación de los aminoácidos, amoníaco y además, los grupos del nitrógeno amino alfa terminal de péptidos y proteínas.

### **Densidad.**

Los valores de gravedad específica densidad de la cerveza fueron obtenidos usando metros de densidad digital del tipo de oscilación. En cervezas el método utilizado fue 9.43.2 (EBC 2008).

### **pH.**

El pH de la cerveza se determinó utilizando un sensor potenciómetro instalado en el tanque de fermentación. Las mediciones se realizaron cada minuto durante las 120 horas de la fermentación.

### **Carbohidratos fermentables.**

El contenido de fructosa, glucosa y azúcares con 2 y 3 grado de polimerización se determinaron mediante cromatografía líquida alta en rendimiento (HPLC) con detector de índice de refracción. En cervezas el método empleado fue el 9.27 (EBC 2008).

### **Extracto.**

En cervezas, se calcularon el extracto real y aparente, y su gravedad original (EBC 2008).

### **Atenuación.**

La atenuación aparente es el porcentaje de azúcar que se convierte en alcohol y CO<sub>2</sub> por levadura. La atenuación aparente se obtiene de la gravedad específica convertida al

extracto original como se muestra en la ecuación. Mediante la obtención de extracto real, atenuación real puede calcularse con la siguiente ecuación:

$$\text{Atenuación aparente} = (\text{Extracto original} - \text{Extracto aparente}) / (\text{Extracto original} * 100)$$

$$\text{Atenuación real} = (\text{Extracto original} - \text{Extracto real}) / (\text{Extracto original} * 100)$$

### **Contenido de etanol.**

El etanol en la cerveza se determinó por espectroscopia de infrarrojo. El método EBC 9.2.6 consiste en la determinación rápida del contenido de alcohol, utilizando un instrumento automatizado basado en NIR.

### **Determinación de compuestos volátiles.**

La determinación de compuestos volátiles de bajo punto de ebullición en la cerveza (alcoholes, ésteres, acetaldehído y dimetil sulfuro) fue medida por cromatografía de gases headspace automático. El método 9.39 (EBC 2008) se basa en estándares internacionales, una columna capilar de sílice fundida químicamente consolidado y detección de ionización de llama.

### **Color.**

Este fue determinado por espectrofotometría (IM) y se midió a 430 nm. El método 8.5 (EBC 2008) utilizado por hierba y método de cerveza 9.6 (EBC 2008).

### **Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico de las pruebas realizadas, se evaluaron las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos por medio de un Modelo Lineal General (Minitab 16 2010), cuando los resultados fueron significativos ( $\alpha$  0.05), la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey (Montgomery 2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación del perfil enzimático.

El uso de recursos renovables para diferentes aplicaciones biotecnológicas, como la producción de biocombustibles de segunda generación o la obtención de otros productos de alto valor agregado, ha estimulado la investigación en el descubrimiento de nuevos biocatalizadores para la conversión eficiente de biomasa lignocelulósica. Esto debido a que esta biomasa representa ecosistemas complejos en los que las condiciones influyen en los microorganismos vivos. Como consecuencia, solo las comunidades microbianas con capacidad de producir enzimas implicadas en la degradación de celulosas y hemicelulosas pueden prevalecer sobre otros microorganismos en este entorno (Ventorino et al. 2016).

Se evaluaron cepas de *Streptomyces setonni*, *Trichoderma reesei*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus oryzae*. Para todas ellas se analizaron las actividades endocelulasa, exocelulasa, celobiasa, xilanasas y pectinasa. Los microorganismos se inocularon en los diferentes agares en los cuales se utilizó su sustrato específico como única fuente de carbono. La actividad fue registrada como índice de actividad enzimática relativa. En la tabla 1, se pueden apreciar los diferentes índices de producción de las principales enzimas encargadas de la degradación del material lignocelulósico. Cada microorganismo posee un perfil diferente que se puede entender por su ecología, ya que cada microorganismo cumple una función biológica diversa en su estado silvestre.

En la Tabla 1, se muestran los resultados obtenidos correspondientes a los índices de actividad enzimática relativa para cada una de las enzimas analizadas producidas por cada uno de los microorganismos estudiados, se marcan las diferencias significativas con letra, podemos apreciar que de forma general *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus oryzae* presentan los índices de actividad enzimática más altos y más variados, teniendo buena actividad para las cinco enzimas analizadas, no siendo así con *Streptomyces setonni* que presenta actividades principalmente relacionadas con la degradación de la celulosa pero no del xilano, y siendo el caso inverso el de *Pleurotus ostreatus*.

**Tabla 1.** Índices de actividad enzimática relativa. \*

	Endoglucanasa	Exoglucanasa	Celobiasa	Xilanasas	Pectinasa
<i>Streptomyces setonii.</i>	1.61 ± 0.3 b	1.32 ± 0.11b	1.18 ± 0.18 b	0.02 ± 0.02 c	0.1 ± 0.1 b
<i>Trichoderma harzianum.</i>	2.11 ± 0.14 a	2.03 ± 0.09 a	1.82 ± 0.3 a	0.55 ± 0.16 b	0.68 ± 0.2 a
<i>Pleurotus ostreatus.</i>	0.38 ± 0.2 c	0.49 ± 0.16 c	0.19 ± 0.1 c	1.13 ± 0.2 a	0.55 ± 0.19 a
<i>Aspergillus oryzae.</i>	1.31 ± 0.22 b	1.48 ± 0.06 b	1.59 ± 0.2 a	0.69 ± 0.1 b	0.49 ± 0.3 a

\*Promedios ± error estándar (EE). Promedios por columnas con letras diferentes muestran diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Trabajos anteriores han informado sobre la producción de enzimas en diferentes Actinobacterias, como *Cellulomonas*, *Thermobifida* y *Microbispora*, aisladas de diferentes residuos agroindustriales (Saini et al. 2015). Diversos estudios se han centrado en el género *Streptomyces* buscando detectar celulasas tanto endoglucanasas, exoglucanasas, como celobiosas (Alani et al. 2008; Hsu et al. 2011; Amore et al. 2012), aunque en la mayoría de los estudios *Streptomyces* ha sido reconocida por su capacidad de producción de hemicelulasa (Beg et al. 2000). Recientemente, se descubrió que un gen de *Streptomyces coelicolor* recombinantemente expresado en *Streptomyces lividans* TK24, codifica una proteína con una fuerte actividad hidrolizante hacia Avicel y papel de filtro, produciendo celobiosa como producto final y con actividad moderada hacia la carboximetilcelulosa (Lim et al. 2016). El- El-Naggar et al. (2014) probaron el sobrenadante del cultivo de la fermentación sumergida de *Streptomyces albogriseolus* subsp. *cellulolyticus* en condiciones optimizadas para la capacidad de producir endoglucanasa y liberar azúcares reductores de residuos agroindustriales como sustratos. Franco-Cirigliano y colaboradores (2013) seleccionaron la cepa PESB-25 de *Streptomyces misionensis* por su capacidad para secretar celulasas. Se observó un pico de acumulación de endoglucanasa en condiciones de fermentación optimizadas en presencia de  $MnSO_4$ . Además, Amore y colaboradores (2012) identificaron, expresaron de forma recombinante en *Escherichia coli* y caracterizaron la endocelulasa CelStrep de la cepa celulolítica *Streptomyces* sp. *G12* aislado del compost. Se han desarrollado

varias estrategias para mejorar la producción de celulasa de *Streptomyces*. La integración de las estrategias de control constante de cambio de pH y oxígeno disuelto aumentó la producción de celulasa y xilanasas de la cepa *Streptomyces griseorubens* JSD-1 (Zhang et al. 2016). Se utilizó un diseño compuesto central de superficie de respuesta para optimizar la producción de endoglucanasa de la cepa *Stotherptomyces* DSK59 acidotermófila aislada del suelo, adherida a la corteza del árbol en descomposición (Budihal et al. 2016).

El hongo *Pleurotus ostreatus* ha sido ampliamente estudiado por su actividad ligninolítica debido a la expresión de una familia de multigenes codificantes para lacasa (Pezzella et al. 2009). Recientemente, su capacidad hemicelulolítica ha sido reportada con detección de actividad de xilanasas durante la fermentación en estado sólido en bagazo de tomate. La correlación observada entre los tiempos de producción de las actividades de xilanasas y lacasa sugieren una acción sinérgica en la transformación de residuos (Iandolo et al. 2011). En estudios anteriores se ha apreciado que no se alcanzaron niveles detectables de celulasa. En lo que respecta a la producción de actividad de xilanasas, se alcanzó una actividad máxima de alrededor de 9 U g<sup>-1</sup> en el segundo día de fermentación de *Pleurotus ostreatus* en sustrato sólido en bagazo de tomate. *Pleurotus ostreatus* parece no ser capaz de metabolizar los monosacáridos presentes en los desechos. La ausencia de azúcares que puedan ser directamente metabolizados podría desencadenar en el hongo la producción de xilanasas en un tiempo más corto. (Iandolo et al. 2011) La correlación entre los tiempos de producción de lacasa y xilanasas sugieren su acción sinérgica en la transformación de desechos. La producción de enzimas ligninocelulíticas por *Pleurotus ostreatus* se ve afectada principalmente por la cepa, composición del sustrato y condiciones de cultivo (Ćilerdžić et al 2017). Kerem y colaboradores (1992) informaron una producción máxima de actividad lacasa de 0.03 U g<sup>-1</sup> a el sexto día de fermentación en sustrato sólido en tallos de algodón, y valores de 0.040 U g<sup>-1</sup> han sido logrados por Membrillo et al. (2008) al octavo día de fermentación en sustrato en bagazo de caña de azúcar.

Los sistemas completos de enzimas celulasa pueden ser producidos por una gran diversidad de microorganismos. Entre los mejor caracterizados y el más ampliamente estudiado de estos sistemas son las celulasas inducibles del hongo filamentoso *Trichoderma reesei* (Dos-Santos et al. 2014). Las celulasas producidas por este hongo filamentoso tienen un alto interés industrial. Son ampliamente utilizados en las industrias de alimentos. Recientemente, también han sido utilizados en las industrias textiles y de pulpa de papel (Do Vale et al. 2012) Su sistema de celulasa consiste en tres clases generales de enzimas: celobiohidrolasas, endo-1,4-b-D-glucanasas y 1,4-bD-glucosidasa (Rocha et al. 2016).

En términos de condiciones de crecimiento, *Aspergillus oryzae* tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones de humedad y temperatura. Se ha informado de que una alta producción de  $\alpha$ -amilasa se encuentra cuando la humedad supera el 35% (Narahara et al. 1984). En el caso de la inoculación del arroz para la producción de sake, las condiciones de incubación se fijan regularmente a 27 °C y de 35 a 40% de humedad (Battaglino et al. 1991). Sin embargo, tiene una producción favorable de enzimas cuando la temperatura supera los 38°C (Kitano et al. 2002). Además de la producción de  $\alpha$ -amilasa y proteasa, *Aspergillus oryzae* tiene la capacidad de sintetizar  $\alpha$ -glucosidasas y amiloglucosidasas (Hata et al. 1997; Sugimoto y Shoji 2012). La producción de enzimas se ve afectada por la naturaleza del sustrato debido a la presencia de dextrinas no digeribles que reducen el crecimiento de la biomasa.

Basados en los resultados de la capacidad de expresión de enzimas implicadas en la degradación del material lignocelulósico, aunado a la categoría GRAS con las que cuenta la cepa de *Aspergillus oryzae*, se decidió seleccionar esta cepa para realizar el resto de las pruebas de fermentación en sustrato sólido sobre grano gastado de cervecería.

## Caracterización del BSG.

Como parte de la estrategia para dar cumplimiento a este objetivo se realizó la caracterización fisicoquímica del grano gastado de cervecería para entender mejor el desarrollo del microorganismo en este. En reportes anteriores se pueden observar comportamientos variables dependiendo de factores como son el tipo de cerveza producida y los adjuntos utilizados. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos experimentalmente sobre la composición proximal del grano gastado de cervecería con el que se trabajó para la realización de este proyecto.

**Tabla 2.** Composición proximal del BSG empleado.

	Porcentaje
Proteínas **	15.3 ± 0.8
Lípidos **	6.2 ± 0.6
Cenizas **	3.6 ± 0.3
Fibra dietaria soluble **	13.73 ± 1.2
Fibra dietaria insoluble **	48.63 ± 0.7
Almidón **	1.8 ± 0.1

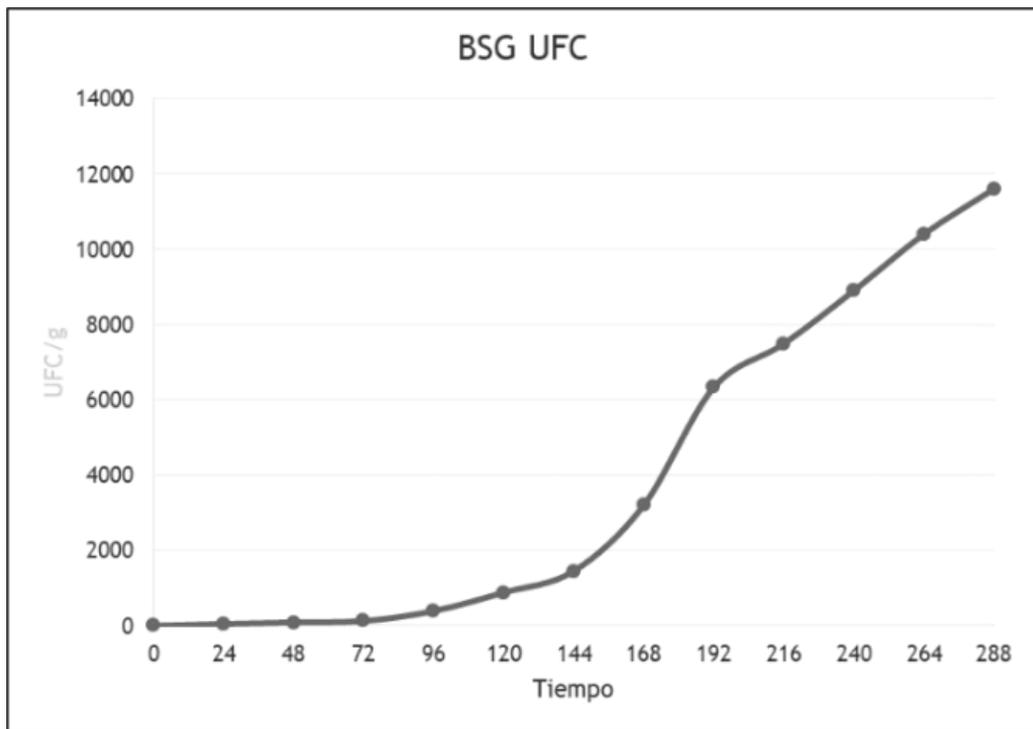
\*Promedios ± error estándar (EE). \*\* Datos expresados en base seca

En la Tabla 2 se muestra la composición proximal obtenida experimentalmente del grano gastado de cervecería que se utilizó durante el presente estudio. Se observó un contenido de proteína relativamente bajo de 15.3 %, alto contenido de grasa 6.2% y fibra dietética total que ronda el 62 %, además de presentar un contenido relativamente elevado de almidón considerando que debió haber sido eliminado en su totalidad en su procesamiento. Se ha reportado anteriormente que se trata de un material lignocelulósico que contiene aproximadamente 17% de celulosa, 28% de polisacáridos no celulósicos, principalmente arabinosilanos y 28% de lignina (Mussatto et al. 2008). Análisis de BSG por Santos et al. (2003) reportaron valores 24.2%, de proteína 3.9%, de lípidos, 3.4% de ceniza en BSG secada al horno. Estos resultados difieren de los obtenidos experimentalmente principalmente en los parámetros de proteína y grasa, en contraste

con estudios de otros autores el contenido de proteína es inferior, mientras que el de lípidos se mantiene dentro de los rangos previamente reportados ya que Hyun-Wook K. et al. (2013) reportan contenidos de lípidos de  $13.37\pm 0.45$  y proteína de  $19.60\pm 0.15$ . Estudios en diferentes países se han realizado para promover el aprovechamiento de este subproducto y lograr obtener productos de valor agregado, observando datos muy diferentes entre sí. Estos varían en rangos muy amplios: en el parámetro del contenido de proteína 31%, 24% y 15.2%; Lignina 16%, 11.9% y 27.8%; Celulosa 9%, 25.4% y 16.8%; y ceniza 4%, 2.4% y 4.6% (Lynch. 2016). El almidón es considerado un residuo ya que de forma idónea debió haber sido totalmente extraído durante el proceso de maceración; sin embargo, estudios reportan contenidos que varían del 1%, 2.7%, 8% y hasta 10% (Celus et al. 2006; Jay et al. 2008; Robertson et al. 2010; Meneses et al. 2013). Es evidente que las condiciones de elaboración afectan la composición de grano gastado de cervecería, particularmente cuando se considera el tipo de malta de cebada, la adición de adjuntos, el esquema de cocimiento, la temporada de cosecha e incluso el origen geográfico de la muestra. En cuanto a la fibra dietaria total estudios realizados por Hyun-Wook K. et al. (2013) mencionan contenidos de fibra cruda que varían entre  $58.11\pm 0.07$  y  $68.57\pm 0.29$  dependiendo del tratamiento que ha tenido el material. Aquí se aprecian claramente las variaciones en la composición química de esta materia prima como consecuencia de los factores mencionados anteriormente. De forma general el alto contenido de fibra y proteína hace que BSG sea una materia prima interesante tanto para aplicaciones alimentarias como no alimentarias. Los monosacáridos más abundantes en el grano gastado de cervecería son xilosa, glucosa y arabinosa, mientras que también se han encontrado rastros de ramnosa y galactosa (Forssell et al. 2008) que bien podrían ser utilizados durante la fermentación.

### Cinética de crecimiento de *A. oryzae* en BSG.

Una vez caracterizado el substrato se realizó el inoculo y el seguimiento del crecimiento de *Aspergillus oryzae* en el grano gastado de cervecería, así como la producción de enzimas relacionadas con la hidrolisis del material almidonoso y celulósico. La cinética de crecimiento se comportó como se muestra en la Figura 2, donde se muestra el recuento total de UFC de hongos por gramo de grano gastado de cervecería con una medición cada 24 horas por un total de 12 días.



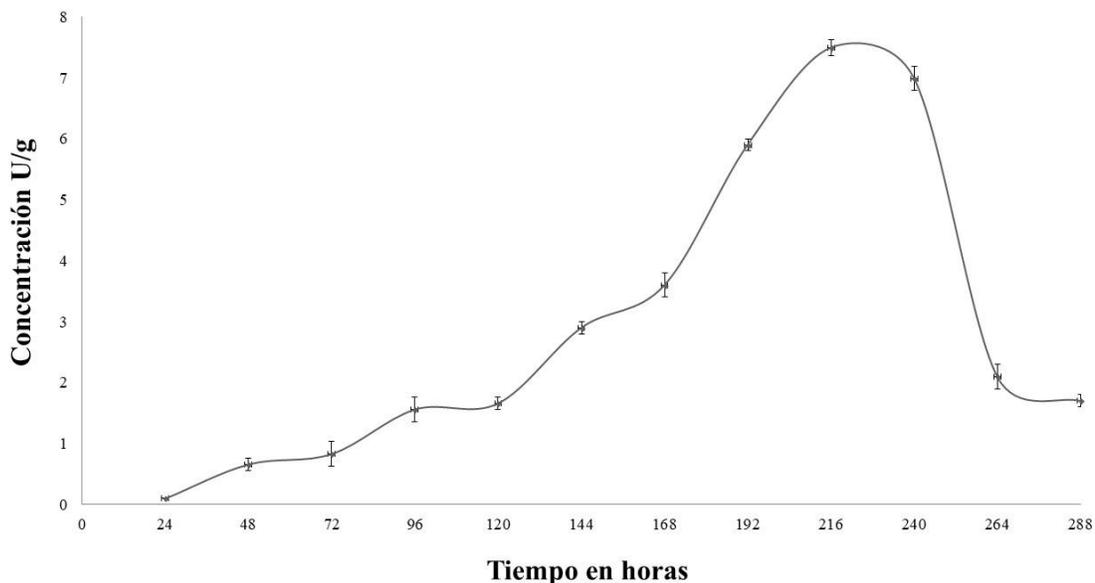
**Figura 2.** Cinética de crecimiento de *Aspergillus oryzae* sobre BSG.

El *Aspergillus oryzae* es un hongo filamentoso, que tiene la capacidad de secretar grandes cantidades de enzimas hidrolíticas. Las proteínas extracelulares de *Aspergillus oryzae* contienen diferentes perfiles de proteínas que incluyen proteasa neutra y alcalina, amilasa, glutaminasa y metalopeptidasa (Liang et al. 2009). La fermentación en estado sólido es adecuada para el crecimiento de hongos debido a su bajo contenido de humedad y a la penetración del micelio de los hongos a través de los sustratos sólidos. El micelio fúngico puede penetrar en el sustrato sólido como 4 capas de penetración de

micelio. La primera capa es de hifas areales, seguida de hifas húmedas aeróbicas e hifas húmedas anaeróbicas, la última capa es de hifas penetrantes (Biesebeke et al. 2002). La baja humedad en una fermentación en estado sólido hace que los microorganismos aumenten su capacidad de producir ciertas enzimas y metabolitos que generalmente no se producirían en una fermentación sumergida (Imanaka et al. 2010). El crecimiento del moho también mostró una relación de contraste con el contenido de humedad, la disminución del contenido de humedad se debe a la utilización de agua en el sustrato para generar micelios (Narahara et al. 1982). En comparativa, cuando se crece el hongo en una matriz con un alto contenido de almidón disponible, el crecimiento es notoriamente más rápido. En los resultados obtenidos se aprecia una típica cinética de crecimiento, con un crecimiento lento, probablemente debido al bajo contenido de azúcares fermentable libres, lo que provoca un retraso en el repunte del crecimiento.

### Producción de enzimas por *A. oryzae* en BSG.

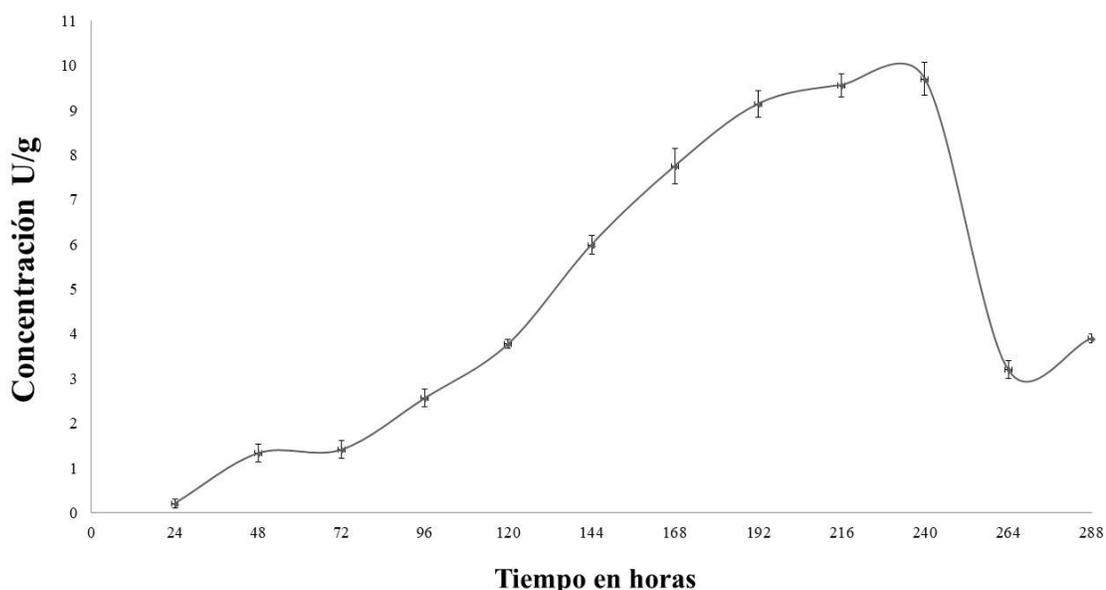
En esta sección se presentan las gráficas correspondientes a los resultados experimentales de las cinéticas de producción de cada una de las enzimas evaluadas a lo largo de doce días de fermentación en sustrato sólido.



**Figura 3.** Cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa por *A. oryzae* en BSG.

La Figura 3 muestra la producción de  $\alpha$ -amilasa, esta enzima actúa sobre almidón, glucógeno y otros oligosacáridos relacionados, son enzimas extracelulares que hidrolizan aleatoriamente enlaces  $\alpha$ - (1, 4) entre unidades de glucosa adyacentes y en última instancia generan oligosacáridos cortos y diferentes dextrinas de límite  $\alpha$  (Goesaert et al. 2009). Es una de las enzimas con más alta demanda de aplicaciones industriales. La despolimerización del almidón por las amilasas es la base de varios procesos, como la producción de jarabes de glucosa, la fabricación de pan y la elaboración de cerveza. También se utiliza como un aditivo en jabones, detergentes y alimentos para animales, y en el tratamiento de papel, textiles, etc. (Bhanja-Dey y Banerjee 2015). En estudios anteriores la amilasa secretada por *A. oryzae* ha demostrado que su actividad máxima es a 55 ° C y a pH 4,5. (Kariya et al. 2003). El grano usado de cervecería (Hashemi et al. 2011), el mijo perlado (Haq et al. 2005) y el desecho de naranjo en polvo son materiales valiosos para la producción de amilasa a bajo costo (Bennamoun L et al. 2004).

La Figura 4 muestra la producción de  $\beta$ -amilasa, esta enzima está igualmente relacionada con la hidrólisis de almidón y ha demostrado que su producción está fuertemente vinculada con la secreción de  $\alpha$ -amilasa, en el caso de *Aspergillus oryzae* EI212 se describe que dependiendo de la composición del medio y las condiciones de crecimiento el hongo secreta  $\alpha$ - o  $\beta$ -amilasa o ambas. (Kundu y Das 1970).

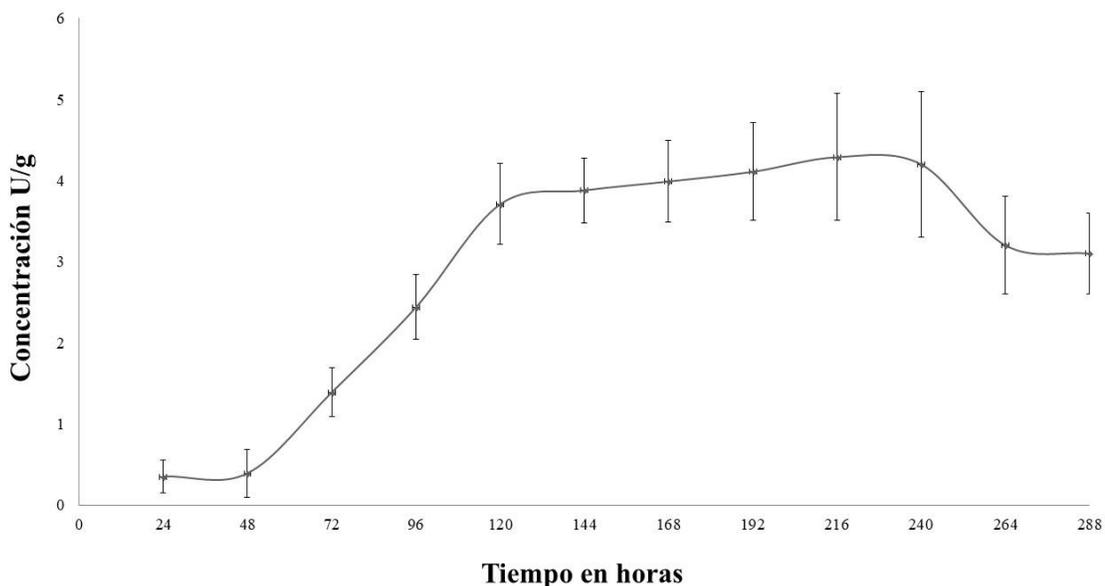


**Figura 4.** Cinética de producción de  $\beta$ -amilasa por *A. oryzae* en BSG.

En el presente estudio se presentó actividad de  $\beta$ -amilasa en concentraciones similares a las de  $\alpha$ -amilasa, además de que los picos de producción fueron coincidentes. Estudios anteriores han demostrado que la fermentación en sustrato sólido logra altos niveles de producción tanto en proteínas totales como en enzimas (alfa-amilasa, beta-amilasa y glucoamilasa) probablemente debido a las características estructurales del hongo y su respuesta fisiológica de los micelios fúngicos incrementando la producción de proteínas y enzimas (Sahnoun et al. 2015).

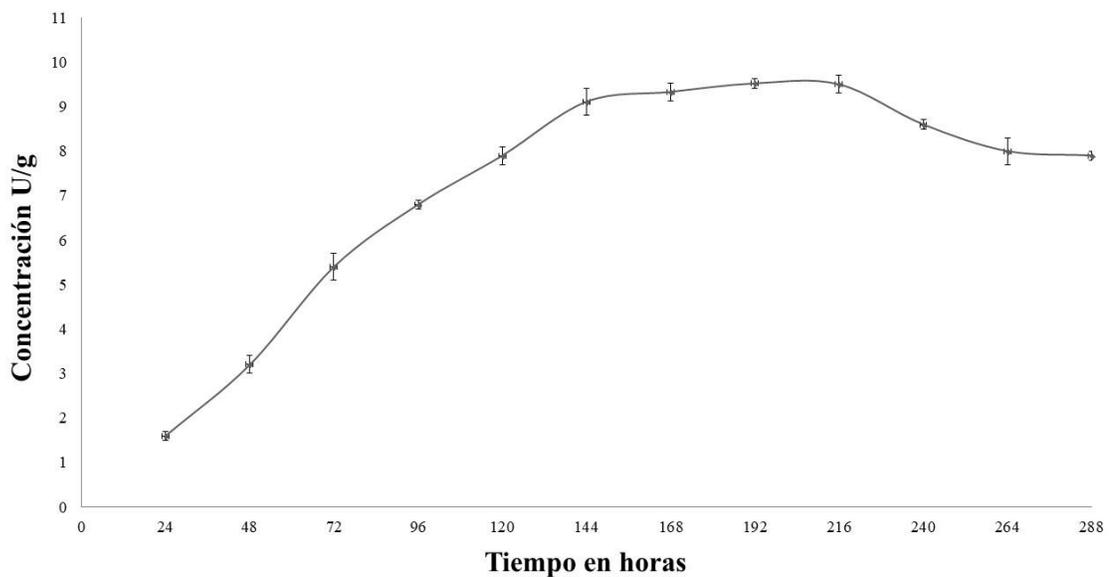
La Figura 5 muestra la producción de amiloglucosidasa, esta enzima es utilizada industrialmente en el procesamiento de los jarabes e hidrolizados de almidón para lograr la sacarificación de este, generalmente es aplicada después de un tratamiento térmico que permita la gelatinización de los almidones, estas enzimas han sido reportadas en diferentes hongos (Mamo y Gessesse 1999.) y bacteriana (Okalo et al 1996)

Las amiloglucosidasas hasta ahora se han producido utilizando fermentaciones sumergidas (Pandey1995) así como las fermentaciones en estado sólido (Pandey 1996) Sin embargo, se ha encontrado que el uso de fermentaciones en estado sólido es más ventajoso y permite la producción más barata de esta enzima (Pandey et al. 2000) La Figura 5, muestra que en el lapso entre el día 5 y el 10 de fermentación se producen los mayores niveles de amiloglucosidasa. Singh y Soni (2001) reportan el pico de producción de esta enzima a las 96 horas, y además reportan que su producción puede incrementarse de forma muy significativamente cuidando el balance de sales disponibles en el sustrato.



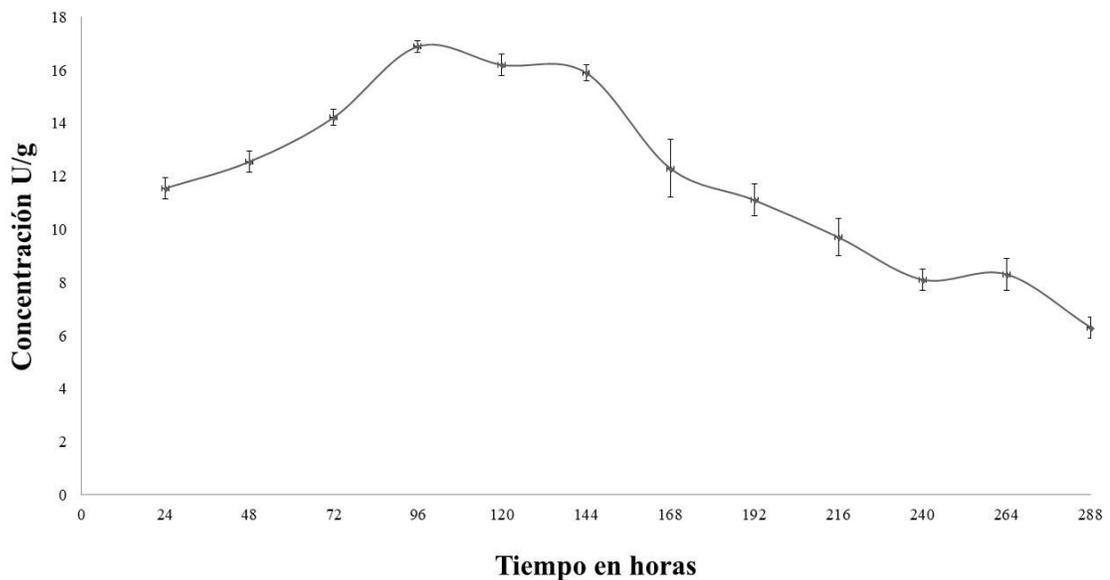
**Figura 5.** Cinética de producción de amiloglucosidasa por *A. oryzae* en BSG.

La Figura 6 muestra la producción de pululanasa, que es una enzima amilolítica también conocida como dextrinasa limitante, es una enzima desramificante que hidroliza específicamente enlaces  $\alpha$ -(1-6) en amilopectina o en dextrinas ramificadas derivadas por las acciones de  $\alpha$ - o  $\beta$ -amilasas. La acción hidrolítica de esta enzima da como resultado la formación de cadenas lineales enlazadas con  $\alpha$ -(1-4) que pueden despolimerizarse extensamente a glucosa y maltosa mediante las acciones combinadas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas. La cebada madura contiene bajos niveles de la enzima, pero durante la germinación, la actividad de la enzima aumenta debido a la síntesis de novo en la aleurona. Sin embargo, la cebada contiene una proteína termoestable que inhibe la enzima. Este inhibidor disminuye en cantidad durante el malteado, pero queda una cantidad suficiente en la malta para inhibir la mayor parte de la enzima (Izydorczyk, y Edney 2003.). En la industria cervecera se utiliza esta enzima sintetizada por diversas especies del género *Bacillus* para disminuir la turbidez producida por las dextrinas, así como aumentar el contenido de azúcares fermentables. (Huang y Tang 2007.)



**Figura 6.** Cinética de producción de pululanasa por *A. oryzae* en BSG.

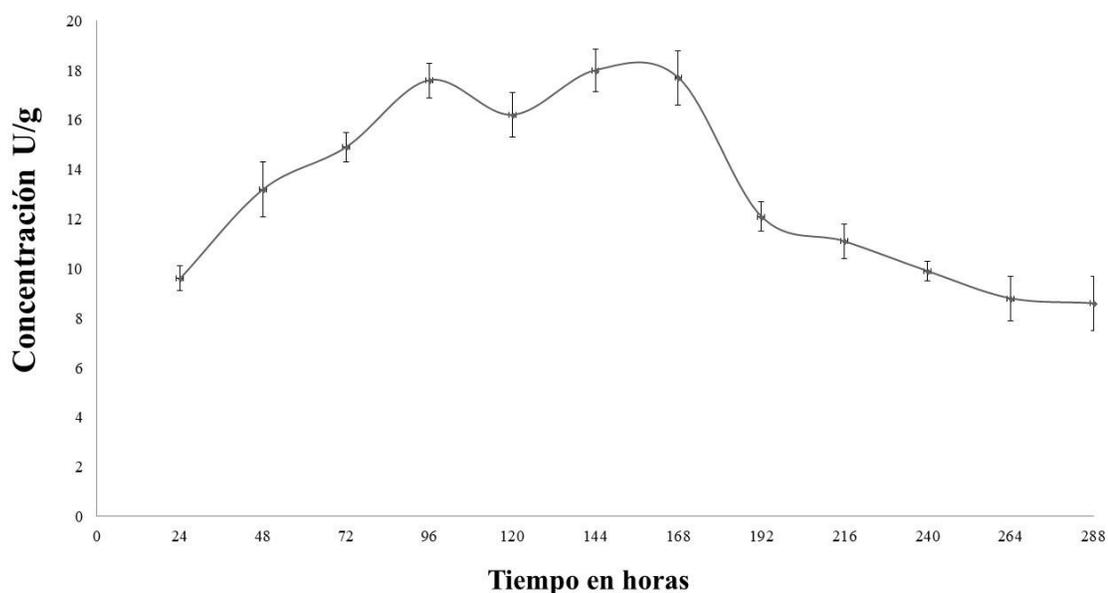
Las celulasas son un complejo de enzimas cuyos componentes tienen una acción sinérgica durante la degradación de las cadenas poliméricas de la celulosa. Dentro de estas enzimas encargadas de la degradación de la celulosa podemos marcar dos principales, la betaglucosidasa, la betaglucanasa y la endoglucanasa, genéricamente denominada celulasa (Pirota et al. 2016). La betaglucanasa de *Aspergillus oryzae* ha sido reportada por tener un buen perfil de tolerancia a temperatura y pH, sin embargo no es fácil la sobreproducción para su uso industrial, por lo que existen la mayoría de las preparaciones comerciales se generan por medios biotecnológicos, mediante la expresión de genes codificantes propios de *Aspergillus oryzae* en otros microorganismos como *Pichia pastoris* y *Saccharomyces*. (Gao et al 2008).



**Figura 7.** Cinética de producción de betaglucanasa por *A. oryzae* en BSG.

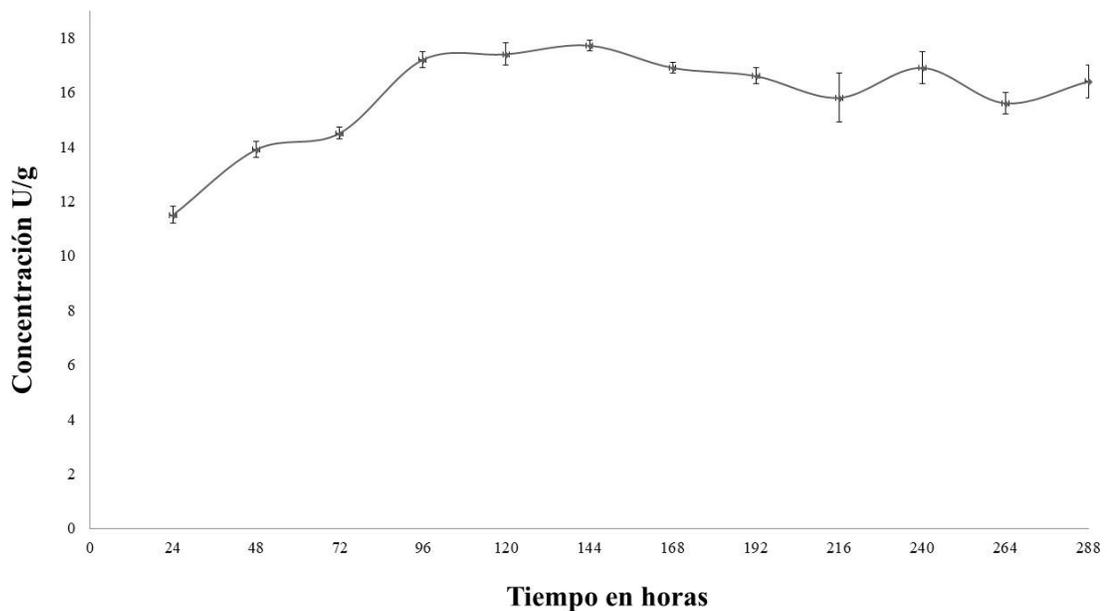
La Figura 7. Muestra la cinética de producción de betaglucanasa producida por *Aspergillus oryzae* creciendo sobre sobre grano gastado de cervecería, se observó una mayor producción de la enzima durante los primeros días de cultivo, siendo el pico máximo al cuarto día.

Los estudios de la producción de celulasa son de importancia crítica debido a la influencia de estas enzimas en la economía de bioconversión de biomasa en combustibles y otros productos químicos (Klein-Marcuschamer et al., 2012) La mayoría de las celulosas comerciales son producidas por hongos filamentosos de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* (Bhat, 2000; Gusakov, 2011). Entre los géneros de *Aspergillus*, *A. niger* junto con *A. oryzae* son los dos hongos más importantes a nivel mundial para aplicaciones biotecnológicas (Hu et al., 2011). Sin embargo, los hallazgos recientes sobre la genómica de *A. oryzae* han revelado que está altamente enriquecido con genes implicados en la degradación de la biomasa (Kobayashi et al., 2007). Además de las aplicaciones bien establecidas de *A. oryzae* en la industria alimentaria, este hongo tiene un gran potencial para la producción de enzimas industriales. Se han realizado unos pocos estudios sobre la producción de celulasa por *A. oryzae* desde el punto de vista del desarrollo de bioprocesos en fermentación en sustrato sólido (Lio y Wang, 2012; Sandhu et al., 2012). Demostrando que las mejores condiciones para su producción implican una producción de hasta  $123.64 \text{ U g}^{-1}$ , consiguiéndose a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , con una humedad del sustrato del 70%, con flujo de aire húmedo al 80%, en un flujo de  $20 \text{ mL min}^{-1}$ . (Pirota et al. 2016).



**Figura 8.** Cinética de producción de celulasa por *A. oryzae* en BSG.

Una de las aplicaciones biotecnológicas a gran escala más importantes de los últimos años es el uso de xilanasas como agentes blanqueadores en la industria de la pasta y el papel (Viikari et al. 1994). El uso de la fermentación en estado sólido como método de producción de xilanasa podría ofrecer ventajas económicas y de proceso, estudios anteriores evaluaron la producción de enzimas in situ en dos sustratos, eucalipto y bagazo de caña de azúcar, usando *Aspergillus oryzae* como el productor microbiano de xilanasa. Cuando el hongo se cultivó en medios optimizados, el pico en la producción de xilanasa en eucalipto y bagazo de caña de azúcar fue en el día 4. Las actividades de enzimas medidas fueron 3200 y 2675 UI g<sup>-1</sup> (Szendefy et al. 2006) poseyendo unas condiciones de funcionalidad máxima a pH 5 (Bailey et al. 1991), y una temperatura óptima de 55 °C (Golubev et al 1993) La Figura 9 muestra la cinética de producción de xilanasa, en donde se pueden apreciar niveles estables de producción entre el día 3 y el día 8.



**Figura 9.** Cinética de producción de xilanasa por *A. oryzae* en BSG.

En la Tabla 3. Se muestran los picos de producción correspondientes al mayor contenido de la enzima, así como el tiempo de generación de cada una de ellas.

**Tabla 3.** Niveles de expresión máxima y tiempo de fermentación para cada enzima.

	Máxima actividad *	Horas de cultivo
$\alpha$ -amilasa.	$7.49 \pm 0.13$	216
$\beta$ - amilasa.	$9.56 \pm 0.26$	216
Amiloglucosidasa.	$4.29 \pm 0.78$	216
Pululanasa.	$9.52 \pm 0.11$	192
Betaglucanasa.	$16.89 \pm 0.21$	96
Celulasa.	$18.00 \pm 0.85$	144
Xilanasa.	$17.72 \pm 0.19$	144

*\*Promedios  $\pm$  error estándar (EE).*

La Tabla 3 muestra el pico máximo de producción de cada enzima con su correspondiente tiempo de fermentación. Se puede observar una tendencia en la generación de enzimas, ocurriendo primero la síntesis de aquellas enzimas relacionadas con la degradación del material celulósico, como son la betaglucanasa, seguida de la celulasa y xilanasa, y posteriormente las enzimas encargadas de degradar los polímeros más simples como la amiloglucosidasa, y las amilasas.

La fermentación en estado sólido se utiliza con éxito para la producción a gran escala de metabolitos fúngicos y la bioconversión de residuos vegetales y animales en productos útiles (Pandey et al. 1999). Es un proceso altamente atractivo y alternativo para la generación de enzimas celulolíticas con el uso de residuos lignocelulósicos de bajo precio y bajo consumo energético (Pandey 2003). Los avances en la biotecnología industrial ofrecen oportunidades potenciales para la utilización económica de sustratos lignocelulósicos (Pandey et al. 2000). La fermentación en estado sólido es un proceso microbiano en el cual los microorganismos crecen en condiciones más cercanas a su hábitat natural y producen mayores cantidades de enzimas extracelulares y otras enzimas que en la fermentación sumergida (Sato y Sudo 1990). Los materiales lignocelulósicos

son insolubles en agua, por lo que su utilización puede mejorarse fructíferamente mediante bioconversiones de estado sólido. La formación de azúcares solubles a partir de celulosa en residuos agrícolas se basa en la acción secuencial y coordinada de componentes individuales tales como exoglucanasa, endoglucanasa y glucosidasa (Lynd et al. 2002).

Las celulasas son uno de los sistemas de enzimas multicomponente más investigados debido a su capacidad para descomponer la biomasa celulósica en glucosa, que se puede convertir a otros productos químicos, alimenticios, o energéticos (Mukataka et al. 1998). Los hongos *A. niger*, *A. flavus* y *Penicillium sp.* se han reportado como las principales fuentes de celulasa, hemicelulasa, pectinasa y xilanasas (Hamlyn 1998) en los polisacáridos no almidonosos, incluida la celulosa. En un estudio similar al presente en el que se utilizó *Aspergillus niger*, este se cultivó en fermentación en estado sólido sobre una variedad de materiales lignocelulósicos como el aserrín, salvado de trigo, forraje de maní y el salvado de arroz. La producción de celulasa en los sustratos lignocelulósicos se monitoreó durante un período de 5 días. La actividad máxima de celulasa se registró el tercer día de incubación en todos los materiales lignocelulósicos, excepto en aserrín. El crecimiento de *Aspergillus niger* en salvado de trigo dio la mayor actividad de celulasa de 2.9 U / g de soporte sólido, mientras que el forraje de maní y el salvado de arroz dieron 2.09 y 1.62 U / g de soporte sólido, respectivamente. El aserrín apoyó débilmente la actividad de celulasa como se refleja por la recuperación de 0.28 FPU / g de soporte sólido. La disminución de la actividad de celulasa en el salvado de trigo, el forraje de maní y el salvado de arroz se produjo a partir del cuarto día en adelante. Por lo tanto, el salvado de trigo es el más adecuado para la producción de celulasa seguida de forraje de maní.

De forma similar se registró la actividad endoglucanasa en todos los materiales lignocelulósicos, excepto el aserrín debido al pobre crecimiento de *A. niger*. El salvado de trigo produjo niveles más altos de 3.24 U / g de endoglucanasa en la fermentación en estado sólido contra 1.36 U / g por el forraje de maní y 1.09 U / g por el salvado de arroz. La actividad de endoglucanasa en todos los sustratos disminuyó el segundo día en adelante. El salvado de trigo es el más adecuado para la producción de endoglucanasa entre todos los sólidos lignocelulósicos probados en ese estudio. El patrón de secreción

de glucosidasa siguió la tendencia inversa con respecto a la endoglucanasa y celulasa, la producción de glucosidasa en aserrín fue más alta en comparación con otros sustratos sólidos en sus respectivos intervalos de tiempo de producción máxima (Subhosh-Chandra et al. 2007).

Estudios anteriores realizados sobre *Aspergillus oryzae* han mostrado que la producción de enzimas amilolíticas está fuertemente relacionada con la fuente de carbono utilizada, en el estudio de Toshikazu y Hiroshi (Toshikazu y Hiroshi 2012) se aprecian las notables diferencias en la síntesis de enzimas relacionadas con la degradación de almidón al utilizar glucosa como única fuente de carbono. Los niveles de producción fueron de  $1.5 \pm 0.5$ ,  $0.1 \pm 0.1$  y  $1.8 \pm 0.2$  miliunidades por mililitro para glucoamilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa respectivamente. En este mismo estudio, al utilizar dextrinas indigeribles, los niveles de estas mismas enzimas incrementaron a  $301 \pm 12$ ,  $7 \pm 0.5$  y  $27.7 \pm 1.9$ . Es sabido que la síntesis de estas enzimas es fuertemente reprimida por la glucosa a través de la proteína CreA (Agger et al. 2001). Para lograr una producción industrial eficiente de las enzimas amilolíticas es necesario un bajo nivel de glucosa. El almidón y otros oligosacáridos relacionados, tales como la maltosa y las dextrinas, inducen la producción de enzimas amilolíticas. La isomaltosa también actúa como desencadenante de la producción de enzimas amilolíticas a través del activador transcripcional AmyR (Agger et al. 2001). Sin embargo, es difícil lograr una alta tasa de producción de enzimas debido al rápido metabolismo de tales oligosacáridos inducibles en células que producen glucosa y la posterior represión catabólica por glucosa.

En cuanto a las enzimas encargadas de la degradación de hemicelulosa *Aspergillus oryzae* produce enzimas degradadoras de la pared celular vegetal, esto reportado cuando crece en granos de trigo y soya. Tiene una gran eficiencia para degradar matrices ricas en hemicelulosa, compuesta a su vez de xilano, arabinano, galactano y manano. Entre estos elementos es el xilano el que se encuentra en mayor proporción y las enzimas sintetizadas por este hongo han sido ampliamente estudiadas. Actualmente, estas enzimas se encuentran caracterizadas y secuenciadas. Múltiples trabajos buscan su sobreexpresión y clonación para producción industrial. Algunas especies de *Aspergillus oryzae* probaron tener altas actividades xilanasas, de 500 a 4300 U por gramo de materia seca, creciendo en sustrato sólido con condiciones óptimas de

humedad del 83% y pH 8.3 durante cuatro días. Estas fueron las mejores condiciones para la producción de xilanasas, siendo que esta enzima tenía su punto óptimo a 6.5 pH y 65°C (Faulds et al 2006).

El uso directo de enzimas substrato específicas en fermentación en sustrato sólidos sin tratamientos posteriores representa un método innovador el blanqueo de pulpa para producir papel, y significa una reducción del consumo de químicos blanqueadores que pueden significar un impacto económico y medioambiental positivo en la industria, siguiendo este mismo paradigma se pueden aprovechar las enzimas generadas durante el crecimiento para la posterior bioconversión del material en otros procesos, como es el caso de la producción de mosto.

### **Producción y caracterización de mostos dulces.**

La transformación de maltas en mosto se realizó mediante el procedimiento de maceración. La hidratación de la malta, las adecuadas curvas de calentamiento y la adición de lúpulo, generan cambios importantes en el mosto. Se puede usar una serie de indicadores de composición para reconocer el mosto de buena calidad y por consiguiente una fermentación de buena calidad. Los mostos de gravedad específica dentro del rango 1.03 a 1.06, es decir de 7.5 a 15° Plato, contienen aproximadamente 7.5 a 15% de sólidos disueltos (Boulton y Quan 2001). Como se muestra en la Tabla 4 ambos mostos están dentro de estos rangos reportados para gravedad específica.

En la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos correspondientes a las características fisicoquímicas y de rendimientos de los diferentes mostos analizados, tanto el mosto control, como aquel obtenido utilizando el adjunto hidrolizado. Se marcan las diferencias significativas con letra, se puede observar que en cuestiones de Rendimiento, contenido total de azúcares fermentables y pH se obtuvieron valores mayores para el mosto control, y un mayor contenido de amino nitrógeno libre y mayor color en el mosto obtenido utilizando el adjunto hidrolizado.

**Tabla 4.** Comparativa de las características de los mostos. \*

	Mosto control	Mosto con adjunto hidrolizado
Rendimiento ajustado a 15° P (L)	4.021 ± 0.08 a	3.78 ± 0.074 b
Grano gastado producido (g/sólidos/Kg grano)	151 ± 0.32 b	161.57 ± 0.22 a
Pérdida de sólidos por centrifugación (g /kg grano)	148 ± 0.89 a	139 ± 0.66 b
Gravedad específica (g/mL)	1.0611 ± 0.0 a	1.04 ± 0.06 a
pH	5.81 ± 0.08 a	5.42 ± 0.09 b
Extracto original (%)	15a	15 a
Carbohidratos:		
Fructosa (%p/p)	0.039 ± 0.004 b	0.047 ± 0.003 a
Glucosa (%p/p)	1.895 ± 0.01 b	1.966 ± 0.01 a
Maltosa (%p/p)	7.661 ± 0.03 a	7.499 ± 0.02 b
Maltotriosa (%p/p)	1.456 ± 0.018 a	1.367 ± 0.023 b
Azúcares fermentables totales (%p/p)	11.051 ± 0.016 a	10.879 ± 0.022 b
Amino nitrógeno libre (mg/L)	173.9 ± 0.0 b	189.3 ± 0.2 a
Color (°EBC)	8.65 b	10.4 a

\*Promedios ± error estándar (EE). Promedios por columnas con letras diferentes muestran diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

El pH del mosto está típicamente en el rango pH 5.0 -5.3 (Boulton y Quan 2001). Los mostos comenzaron con valores más altos, siendo el mosto control el más alto a 5.81. No hubo diferencias significativas en el pH de los tres mostos.

Los componentes nitrogenados están presentes en forma de aminoácidos, péptidos pequeños y proteínas. Las concentraciones recomendadas de nitrógeno, como nitrógeno libre en el mosto son del orden de 150 a 200 mg / L (Boulton y Quan 2001). La Tabla 3 se muestra cómo el mosto control está en los rangos reportados de FAN, y el tratamiento tiene una concentración más alta. El hecho de que el mosto obtenido con el grano gastado hidrolizado tenga la mayor concentración de FAN y su diferencia con el mosto de cebada se atribuye a la acción de las proteasas (principalmente carboxipeptidasas) producidas durante la fermentación con la presencia de *Aspergillus*.

Las carboxipeptidasas de malta tienen actividad máxima a temperaturas entre 40-60% y se inactivan a 70°C. Puede apreciarse que la temperatura a la que se realiza la maceración tiene un impacto crucial en el contenido de FAN de los mostos (Boulton y Quan 2001).

Como muestra la Tabla 4, la maltosa fue el carbohidrato más abundante en todos los mostos generados. Esto se debe a la acción enzimática de las  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas. El mosto con el adjunto hidrolizado contenía más glucosa y menos maltotriosa que el mosto de cebada. Esto está relacionado con la mayor actividad de  $\beta$ -amilasa. Aunque los mostos se ajustaron a 15°Plato, la cantidad total de azúcares fermentables no coincide con el 15% debido a la presencia de dextrinas. Las dextrinas representan el 90% del carbohidrato residual de la cerveza. Alrededor del 40-50% de las dextrinas son oligosacáridos que contienen 4-9 unidades de glucosa, y el 50-60% restante son dextrinas más altas con 10 o más unidades de glucosa (Boulton y Quan 2001). Estas dextrinas son hidrolizables por las enzimas exógenas añadidas desde el cultivo de *Aspergillus oryzae* utilizado como adjunto.

El color de los mostos que se muestra en la Tabla 4 indica una diferencia en los valores, principalmente de los diferentes granos utilizados para maltear. La diferencia de color entre el mosto que contiene el adjunto hidrolizado y el mosto control se atribuye a las características del grano, al pigmento que se pudo liberar de las cascarillas del grano gastado hidrolizado, por lo que es un color más oscuro.

El volumen de mosto generado se usó como un indicador para cuantificar la diferencia en los rendimientos de los mostos. La relación entre un kilogramo de granos y el volumen de mosto producido es un parámetro que puede usarse para calificar la malta en términos de extracción y rendimiento. Los valores se ajustan a 15°Plato para tener una comparación justa. Como se muestra en la Tabla 4, el mosto que se elaboró con el adjunto hidrolizado tuvo un rendimiento de volumen menor que el mosto control. El control tuvo un 6 % más de rendimiento en volumen de mosto en comparación con el equivalente de mosto elaborado con el adjunto hidrolizado. Tomando en consideración el bajo contenido inicial de almidón del grano gastado de cervecería, haber logrado una diferencia tan pequeña con respecto al mosto control en el aspecto de rendimiento indica

un efecto positivo en el tratamiento de grano gastado con *Aspergillus oryzae*, ya que permitió aumentar la cantidad de azúcares fermentables disponibles debido a su producción de enzimas encargadas de la degradación del material lignocelulósico.

Es bien sabido que *Aspergillus oryzae* es un hongo que produce altas cantidades de enzimas amilolíticas, proteolíticas y lipolíticas. De hecho, los cultivos comerciales se utilizan para producir y aislar enzimas ampliamente utilizadas por las industrias alimentarias. Se sabe que *Aspergillus oryzae* expresa altas cantidades de amiloglicosidasas que convierten las dextrinas lineales y ramificadas en glucosa (Nielsen y Schmidt 1985).

### Producción y caracterización de cervezas.

La medida más común, práctica y útil para determinar el progreso de la fermentación y determinar las propiedades finales de la cerveza es la gravedad específica. A medida que se consumen carbohidratos fermentables y se produce alcohol, cae la gravedad específica. Una indicación del final de la fermentación de carbohidratos es que la gravedad específica deja de disminuir. La Tabla 5 muestra los valores finales de gravedad específica para cada cerveza después de 120 horas de fermentación.

**Tabla 5.** Comparativa de las características de las cervezas. \*

	Mosto control	Mosto con adjunto hidrolizado
Gravedad específica (g/ml)	1.0162 ± 0.0 a	1.0206 ± 0.013 a
pH	4.08 ± 0.05 a	4.04 ± 0.4 a
Atenuación aparente (%)	72.76 ± 0.09 b	70.98 ± 0.12 a
Atenuación real (%)	60.09 ± 0.0 a	59.88 ± 0.23 a
Etanol (% v/v)	5.25 ± 0.07 a	5.09 ± 0.04 b
FAN (mg/ml)	56.18 ± 3.45 b	61.02 ± 1.26 a
Alcoholes superiores:		
Propanol (ppm)	13.778 ± 0.0 a	13.699 ± 0.1 a
Isobutanol (ppm)	13.143 ± 0.2 a	13.12 ± 0.2 a
Alcohol isoamilico (ppm)	85.553 ± 1.86 a	86.13 ± 1.22 a
Compuestos volátiles:		
Acetaldehído (ppm)	3.127 ± 0.69 a	2.76 ± 0.1 b
Acetato de etilo (ppm)	13.241 ± 0.2 a	11.66 ± 1.33 b
Acetato de isoamilo (ppm)	0.977 ± 0.0 a	0.917 ± 0.04 b
Etil hexanoato (ppm)	0.0684 ± 0.0 a	0.0366 ± 0.02 b
Color (°EBC)	6.36154 ± 0.09 b	8.45 ± 0.3 a

*\*Promedios ± error estándar (EE). Promedios por columnas con letras diferentes muestran diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey (P <0.05).*

En la Tabla 5, se muestran los resultados obtenidos correspondientes a las características fisicoquímicas y de rendimientos de las diferentes cervezas obtenidas, tanto la del mosto control, como aquella obtenida utilizando el adjunto hidrolizado. Se marcan las diferencias significativas con letra. Se puede observar que Las principales diferencias se encuentran en el contenido de alcohol, siendo estadísticamente mayor en la cerveza control, que a la vez presenta menos contenido de amino nitrógeno libre. No hay diferencias significativas en la producción de alcoholes superiores, y en el caso de todos los compuestos volátiles la producción en la cerveza obtenida utilizando el adjunto

hidrolizado es estadísticamente menor. El valor final de la gravedad específica está estrechamente relacionado con el contenido final de etanol (Esslinger 2009). Como se esperaba, la cerveza elaborada con el adjunto hidrolizado, que contenía menos de etanol en comparación con las otras cervezas, tenía el valor de gravedad específica final más alto. La cerveza control tenía un valor de gravedad específica similar al que corresponde a cervezas lager que contienen alrededor de 5% de etanol (v / v).

Esslinger (Esslinger 2009) informa un valor de atenuación final para cervezas de cebada de 82.1%. Se obtuvieron datos experimentales inferiores para ambas cervezas, probablemente debido a la utilización de adjuntos y la presencia de dextrinas no fermentables, la atenuación obtenida de las diferentes cervezas fue más alta en cerveza control y menor en la elaborada con el adjunto hidrolizado.

La fermentación causa la degradación de los componentes del grano, especialmente los azúcares solubles y los componentes FAN por las enzimas que la levadura genera durante su crecimiento. Como se esperaba, la maltosa era el azúcar más abundante. Este disacárido generalmente representa del 60 al 65% del total de azúcares fermentables. La glucosa fue el segundo hidrato de carbono fermentable más abundante en todos los mostos. El tercer hidrato de carbono fermentable más abundante en todos los mostos fue maltotriosa, que constituía del 13 al 14% del total de carbohidratos fermentables. Además de estos tres carbohidratos, los mostos también contienen fructosa, sacarosa, maltotriosa y dextrinas de mayor peso (Esslinger 2009). Las dextrinas lineales y ramificadas no fermentables permanecen en la cerveza y afectan la viscosidad o el cuerpo de la cerveza y también contribuyen al valor calórico (Nielsen y Schmidt 1985). La clave para la producción de cervezas *light* o reducidas en calorías es la conversión de dextrinas en carbohidratos fermentables mediante la utilización de  $\beta$ -amilasa exógena, pululanasa o con mayor frecuencia amiloglicosidasas exógenas (Serna-Saldivar y Rubio-Flores 2016). Al final de la fermentación se consumió prácticamente toda la maltosa, mientras que pequeñas cantidades de maltotriosa permanecieron en la cerveza. Para la fructosa, se visualizó un incremento en su concentración después de 15 horas de fermentación. Esto es probablemente debido a la isomerización de glucosa a fructosa por la levadura mediante la enzima glucosa

isomerasa. Durante la fermentación hay cambios progresivos en las tasas de producción de etanol. Hay una fase de retraso inicial, que se correspondía con el paso de la levadura del retraso al crecimiento exponencial cuando el mosto oxigenado se volvió gradualmente anaeróbico (Hough 1991). En el último período, la tasa de formación de etanol alcanza un máximo. A partir de entonces, la tasa de producción de etanol disminuye debido a la baja disponibilidad de carbohidratos fermentables que cesaron la actividad y el crecimiento de la levadura (García-Garibay et al. 2004). La disminución en las tasas de producción de etanol es consecuencia de una combinación de agotamiento de nutrientes y efectos tóxicos del etanol. La capacidad de la levadura para soportar altas concentraciones de etanol es obviamente clave para una fermentación exitosa, particularmente cuando se usan mostos concentrados (Boulton y Quan 2001). La cerveza control presenta un contenido de alcohol ligeramente superior al obtenido en la cerveza elaborada con el adjunto hidrolizado, sin embargo, no se trata de un decremento tan grande como para significar una falta de factibilidad de la utilización del producto. Este hecho, junto con el rendimiento del volumen de mosto indica que el uso propuesto del adjunto hidrolizado es tecnológicamente posible. La fermentación en sustrato sólido con *Aspergillus oryzae* aumentó la cantidad de azúcares fermentables provenientes del grano gastado de cervecería, por lo que este puede reemplazar parcialmente adjuntos amiláceos sin impactar fuertemente en los niveles de producción. Por lo tanto, la implementación de esta tecnología sencilla y directa permitirá a los cerveceros la utilización de su subproducto, a fin de buscar una economía circular ecológicamente responsable.

Los alcoholes superiores representan la fracción más grande de los compuestos responsables del aroma de cerveza. Estos compuestos se forman durante los primeros 2 a 3 días de fermentación a partir de compuestos nitrogenados solubles, por ejemplo, se generan alcoholes iso-amílicos a partir del metabolismo de la leucina (García-Garibay et al. 2004) Estas concentraciones de alcoholes superiores a 100 ppm afectan el sabor y la calidad de la cerveza. La Tabla 5 muestra que la cerveza control y la elaborada a partir del adjunto hidrolizado no presentan diferencias significativas en la producción de ninguno de los alcoholes superiores. A pesar de existir una diferencia en el FAN de los mostos de los que se elaboraron, el que no exista diferencia puede deberse directamente

a las características metabólicas de la levadura utilizada durante la fermentación, además de que la producción de alcoholes superiores se reduce por las bajas temperaturas de fermentación (Esslinger 2009).

El acetaldehído es cuantitativamente el compuesto de carbonilo más importante en la cerveza. Se forma en la cerveza durante los primeros 3 días e imparte a la cerveza un sabor inmaduro y desequilibrado. Como desaparece en etapas de fermentación posteriores, no presenta dificultades tecnológicas. En la fase inicial de la cerveza, el contenido de acetaldehído varía de 20 a 40 ppm, mientras que en las cervezas terminadas de 8 a 10 ppm. La presencia de aldehído es a menudo una indicación de contaminación microbiana, ya sea por levadura o bacterias (García-Garibay et al. 2004). Como se muestra en la Tabla 5, todas las cervezas contenían valores inferiores a los umbrales informados que afectan significativamente el sabor. La cerveza control tuvo el valor más alto. La cerveza contiene más de 50 ésteres diferentes, de los cuales tres son de mayor relevancia porque afectan en gran medida el sabor de la cerveza: acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo. Los ésteres son los productos de la catálisis enzimática de ácidos orgánicos, etanol y alcoholes superiores. Su formación está estrechamente relacionada con la propagación de la levadura y el metabolismo de los lípidos. Los ésteres activos de aroma se forman intracelularmente mediante la fermentación de células de levadura. Como son solubles en lípidos, los ésteres de etilo pueden difundirse a través de la membrana celular en el medio de fermentación. A diferencia de la excreción de éster de acetato, que es rápida y completa, la transferencia de ésteres de etilo al medio de fermentación disminuye drásticamente al aumentar la longitud de cadena, desde 100% para hexanoato de etilo hasta 54 a 68% para octanoato de etilo y 8 a 17% para decanoato de etilo. La velocidad de formación del éster de etilo depende de tres factores: las concentraciones de los dos cosustratos (acetil CoA y el etanol) y la actividad de las enzimas implicadas en su síntesis e hidrólisis. Por lo tanto, todos los parámetros que influyen en las concentraciones de sustrato o la actividad enzimática pueden afectar la producción de éster etílico (Saerens et al. 2007). El hexanoato de etilo es característico por su aroma a manzana. La presencia de etilhexanoato, fue particularmente baja en ambas cervezas.

## CONCLUSIONES

Las cuatro cepas evaluadas probaron producir enzimas relacionadas con la degradación de materiales lignocelulósicos, tal como estaba reportado, considerando la naturaleza del material objeto de este estudio, se eligió utilizar *Aspergillus oryzae*.

La fermentación en sustrato sólido con *Aspergillus oryzae* proporciona la batería enzimática necesaria para sacarificar parcialmente el grano gastado de cervecería.

El adjunto elaborado con BSG hidrolizado por *Aspergillus oryzae* utilizado en un procesamiento de cocimiento de mosto proporciona azúcares fermentables, por lo que este puede reemplazar parcialmente adjuntos amiláceos sin impactar fuertemente en los niveles de producción.

El mosto elaborado con el adjunto hidrolizado por *Aspergillus oryzae* puede ser fermentado exitosamente por *Saccharomyces spp* obteniendo una cerveza con características similares a una cerveza tipo lager.

## **PERSPECTIVAS**

Otros estudios se han centrado en la realización de pretratamientos físicos o químicos que han demostrado aumentar el grado de sacarificación del grano gastado de cervecería. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos utilizan ácidos o álcalis concentrados que no podrían aplicarse directamente para la obtención de un producto para consumo humano, lo que abre un campo de investigación a nuevos esquemas de tratamiento.

El presente proyecto responde a una tendencia global de conciencia ecológica, se fundamenta en la economía circular, buscando un aprovechamiento de los subproductos industriales, para tratar de reducir lo más posible la generación de residuos y así disminuir el impacto medio ambiental de las operaciones comerciales, buscando un desarrollo industrial sustentable, por lo que al buscar optimizar estos procesos implicaría una aplicación directa de un subproducto en su industria generadora, con un alto impacto ecológico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agger T, Spohr A y Nielsen J. 2001. Amylase production in high cell density submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and *nidulans*. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 55, 81-84.
- Alani FA, William A, Anderson A, y Murray MY. 2008. New isolate of *Streptomyces sp.* with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol. Lett.* 30, 123–126. doi: 10.1007/s10529-007-9500-9.
- Amore A, Pepe O, Ventrino V, Birolo L, Giangrande C, y Faraco V. 2012. Cloning and recombinant expression of a cellulase from the cellulolytic strain *Streptomyces sp.* G12 isolated from compost. *Microb. Cell Fact.* 11:164. doi: 10.1186/1475-2859-11-164.
- Amore A, Pepe O, Ventrino V, Birolo L, Giangrande C, y Faraco V. 2013. Industrial waste based compost as a source of novel cellulolytic strains and enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.* 339, 93–101.
- AOAC. 1980. *Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists.* AOAC, Washington, DC.
- AOAC. 2007. *Official methods of analysis of AOAC.* 18th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- ASBC. 1994. *Methods of Analysis Method Beer.* American Society of Brewing Chemists, St. Paul.
- Bailey MJ, Puls J, y Poutanen K. 1991. Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Appl Biochem.* 13, 380–9.
- Bamforth CW. 2000. Beer: an ancient yet modern Biotechnology. *Chemistry Educator.* 5,102-112.
- Bamforth CW. 2003 *Beer. Tap into the art and science of brewing,* 2nd edn. Oxford University Press, New York

- Battaglino R, Huergo M, Pilosof AMR, y Bartholomai GB. 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 292-296
- Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, y Hoondal GS. 2000. Production and characterization of thermo stable xylanase and pectinase from *Streptomyces sp.* QG-11-3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 396–402. doi: 10.1038/sj.jim.7000010.
- Bennamoun L, Meraihi Z, y Dakhmouche S. 2004. Use of experimental planning to optimize production of alpha amylase by *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivated on a basal medium made from orange waste. *J. Food Eng.* 64, 257–264
- Bhanja-Dey T, y Banerjee R. 2015. Purification: biochemical characterization and application of  $\alpha$ -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103, *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* 4, 83–90.
- Bhat MK. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), 355-383.
- Biesebeke R, Ruijter G, Rahardjo YSP, Hoogschagen MJ, Heerikhuisen M, y Levin A. 2002. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations progress report on a multi-disciplinary project. *FEM Yeast Research.* 2, 245-8.
- Boulton C, y Quain D. 2001. *Brewing yeast and fermentation.* Blackwell Science, Malden.
- Briggs D, Hough J, Stevens R, y Young T. 1981. *Malting and Brewing Science: Malt and sweet wort.* Segunda edición. Kluwer Academic. Inglaterra. pp 914.
- Briggs, D. 1998. *Malts and malting.* Blackie Academic and Professional. Inglaterra. pp.796.
- Budihal SR, Agsar D, y Patil SR. 2016. Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces cellulase*. *Bioresour. Technol.* 200, 706–712. doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.098.

Buffington J. 2014. The Economic Potential of Brewer's Spent Grain (BSG) as a Biomass Feedstock. *Advances in Chemical Engineering and Science*. 4, 308-318.

Castillo JM, Romero E, y Nogales R. 2013. Dynamics of microbial communities related to biochemical parameters during vermicomposting and maturation of agroindustrial lignocellulose wastes. *Bioresour. Technol.* 146, 345–354.

Celus I, Brijs K, y Delcour JA. 2006. The effects of malting and mashing on barley protein extractability, *J. Cereal Sci.* 44, 203–211.

Ćilerdžić J, Galić M, Vukojević J, Brčeski I, y Stajić M. 2017. Potential of selected fungal species to degrade wheat straw, the most abundant plant raw material in Europe. *BMC Plant Biol.* 2017; 17(2), 249.

Cologna NMD, Gómez-Mendoza DP, Zanoelo FF, Giannesi GC, Guimarães NCA, Moreira LRS, Filho EXF, y Ricart CAO. 2018. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme and Microbial Technology*. 109, 1-10.

Dos-Santos L, Ramos-Pedersoli W, Cristina-Campos A, Stecca-Steindorff A, Silva-Rocha R, Martinez-Rossi NM, Rossi A, Brown NA, Goldman GH, Faça VM, Persinoti GF, y Silva RN. 2014. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. *Biotechnol. Biofuels* 7, 41.

Do-Vale LHF, Gómez-Mendoza DP, Kim MS, Pandey A, Ricart CA, Ximenes F, Filho E, y Sousa MV. 2012. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics* 12, 2716–28.

EBC. 2008. Analytica European Brewing Convention. Fachverlag Hans Carl Gmbh, Nuremberg.

El-Naggar NEA, Abdelwahed NA, Saber WI, y Mohamed AA. 2014. Bioprocessing of some agro-industrial residues for endoglucanase production by the new subsp.; *Streptomyces albogriseolus* subsp. *cellulolyticus* strain NEAE-J. *Braz. J. Microbiol.* 45, 743–756. doi: 10.1590/S1517-83822014005000049.

- Esslinger HM. 2009. Handbook of brewing: processes, technology, markets. Wiley-VCH. Weinheim.
- Fan LT, Gharpuray MM, y Lee YH. 1987. Cellulose Hydrolysis. Berlin, Alemania. Springer-Verlag. 3, 1-68.
- Food Agriculture Organization. 2016. Statistical database. Rome. <http://faostat.fao.org>. Revisado 01 Marzo 2016.
- Faulds C, Mandalari G, Curto RL, Bisignano G, Christakopoulos P, y Waldron K. 2006. Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan, Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 622–629.
- Fengel D. y Wegener G. 1984. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter. Berlin.
- Forssell P, Kontkanen H, Schols HA, Hinz S, Eijsink VG, Treimo J, Robertson JA, Waldron KW, Faulds CB, y Buchert J. 2008. Hydrolysis of brewers' spent grain by carbohydrate degrading enzymes, J. Inst. Brew. 114, 306–314.
- Franco-Cirigliano MN, Carvalho-Rezende R, Gravina-Oliveira MP, Pereira PHF, Do-Nascimento RP, y Da-Silva EP. 2013. *Streptomyces misionensis* PESB-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates. Biomed. Res. Int. 584207. doi: 10.1155/2013/584207.
- Gao J, Weng H, Zhu D, Yuan M, Guan F, y Xi Y. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. Bioresource Technology, 99(16), 7623-7629.
- García-Garibay M, Quintero-Ramírez R, y López-Munguía A. 2004. Biotecnología alimentaria. México: Limusa: Noriega.
- Goesaert H, Slade L, Levine H, y Delcour JA. 2009. Amylases and bread firming-An integrated view. J. Cereal Sci. 50, 345–352

- Golubev AM, Ibatullin FM, Kilimnik AY, Rodionova NA, y Neustroev KN. 1993. Isolation and properties of endoxylanase and beta-xylosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biochemistry*. 58, 565–70.
- Gusakov AV. 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 419-425.
- Hallgren L. 1995. Lager beers from sorghum. In: Dendy DAV (ed) *Sorghum & millets: chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, pp 283–297
- Hamlyn PF. 1998. Fungal Biotechnology. *British Mycological Society Newsletter*, ISSN 1465-8054
- Haq IU, Hamad A, Qadeer MA, y Iqbal J. 2005. Pearl millet, a source of alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technol.* 96, 1201–1204.
- Hardwick W. 1995. *Handbook of Brewing*. Marcel Dekker, Inc. EUA. 714 p.
- Hashemi M, Razavi SH, Shojaosadati SA, y Mousavi SM. 2011. The potential of brewer's spent grain to improve the production of alpha-amylase by *Bacillus sp.* KR-8104 in submerged fermentation system. *New Biotechnol.* 28, 165–172
- Hata Y, Ishida H, Kojima Y, Ichikawa E, Kawato A, Suginami K, y Imayasu S. 1997. Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(6), 532-537
- Hough JS. 1991. *Biotechnology of malting and brewing*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hsu CL, Chang KS, Lai MZ, Chang TC, Chang YH, y Jang HD. 2011. Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulase-producing *Streptomyces* for bioethanol production. *Biomass Bioenerg.* 35, 1878–1884.

Hu H, van-den-Brink J, Gruben B, Wosten H, Gu J, y de-Vries R. 2011. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1), 248-252.

Huang WC, y Tang IC. 2007. Bacterial and Yeast Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications en: *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. pp 185-223.

Huige NJ. 1994. Brewery by-products and effluents, in: Hardwick, W.A. (Ed.), *Handbook of Brewing*. Marcel Dekker, New York, pp. 501-550.

Hyun-Wook K, Ko-Eun H, Dong-Heon S, Soo-Yeon L, Min-Sung C, Yun-Bin L, Ji-Hun C, Yun-Sang C, Hack-Youn Ki, y Cheon-Jei K. 2013. Effects of dietary fiber extracts from brewer's spent grain on quality characteristics of chicken patties cooked in convective oven. *Korean J. Food Sci. An*. Vol. 33, No. 1, pp. 45-52.

Iandolo D, Piscitelli A, Sannia G, y Faraco V. 2011. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Appl Biochem Biotechnol* 1631, 40–51

Imanaka H, Tanaka S, Feng B, Imamura K, y Nakanishi K. 2010. Cultivation characteristic and gene expression profiles of *Aspergillus oryzae* by membrane-surface liquid culture, shaking-flask culture, and agar-plate culture. *J Biosci Bioeng*. 109, 267-73.

Iserentant T. 1994. Beers: recent technological innovations in brewing. En: A. Lea y J. Piggot (Eds.). *Fermented beverage production*. Segunda edición. Kluwer Academic. Estados Unidos. pp. 41-58.

Izydorczyk MS, y Edney MJ. 2003. MALT | Chemistry of Malting. En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* pp. 3677–3685

Jay AJ, Parker ML, Faulks R, Husband F, Wilde P, Smith AC, Faulds CB, y Waldron KW. 2008. A systematic micro-dissection of brewers' spent grain, *J. Cereal Sci.*47, 357–364

- Kariya M, Shigemi Y, Yano M, Konno H, y Takii Y. 2003. Purification and properties of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* MIBA316. *J.Biol.Macromol.* 3 (2), 57-60.
- Kerem Z, Friesem D, y Hadar Y. 1992. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1121–1127.
- Kitano H, Kataoka K, Furukawa K, y Hara S, 2002. Specific expression and temperature-dependent expression of the acid protease-encodin gene (pepa) in *Aspergillus oryzae* in solid state culture (rice koji). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93 6:563-567
- Kiyota T, Hamada R, Sakamoto K, Iwashita K, Yamada O, y Mikami S. 2011. Aflatoxin non-productivity of *Aspergillus oryzae* caused by loss of function in the aflJ gene product. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(5). 512-517
- Klein-Marcuschamer D, Oleskiewicz-Popiel P, Simmons BA, y Blanch HW. 2012. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(4), 1083-1087.
- Ko KC, Han Y, Shin BS, Choi JH, y Song JJ. 2012. A rapid and simple method for preparing an insoluble substrate for screening of microbial xylanase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 677–84.
- Kobayashi T, Abe K, Asai K, Gomi K, Juvvadi P, Kato M, Kitamoto K, Takeuchi M, y Machida M. 2007. Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71(3), 646-670.
- Kundu AK, y Das S. 1970. Production of Amylase in Liquid Culture by a Strain of *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol.* 19(4), 598–603.
- Laureano PL, Teymouri F, Alizadeh H, y Dale BE. 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 124 1-3, 1081–1099.
- Liang Y, Pan L, y Lin Y. 2009. Analysis of extracelular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73, 192-5.

- Lim JH, Lee CR, Dhakshnamoorthy V, Park JS, y Hong SK. 2016. Molecular characterization of *Streptomyces coelicolor* 3 SCO6548 as a cellulose 1,4- $\beta$ -cellobiosidase. FEMS Microbiol. Lett. 363:fnv245. doi: 10.1093/femsle/fnv245
- Lio JY, y Wang T. 2012. Solid-state fermentation of soy bean and corn processing coproducts for potential feed improvement. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(31), 7702-7709.
- López A, García M. y Quintero R. 2002. Biotecnología alimentaria. Quinta edición. Limusa. México. 636 p.
- Lynch M, Steffen E, y Arendt E. 2016. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. Journal of the Institute of Brewing. Volume 122, Issue 4, 553-568.
- Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH y Pretorius IS. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66, 506–577.
- Machida M, Yamada O, y Gomi K. 2008. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. DNA Research, 15(1), 173-183
- Maki, Leung KT y Qin WS. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. Int. J. Biol. Sci. 5, 500–516.
- Mamo G, y Gessesse A. 1999. Production of raw starch digesting amyloglucosidase by *Aspergillus spp.* GP-21 in solid state fermentation. J Ind Microbiol Biotechnol. 22, 622–6.
- Mangan D, McCleary BV, Cornaggia C, Ivory R, Rooney E. y McKie V. 2015. Colourimetric and fluorimetric substrates for the assay of limit-dextrinase. J. Cereal Sci., 62, 50-57.
- Martins LF, Antunes LP, Pascon RC, Franco-de-Oliveira JC, Digiampietri LA, Barbosa D, Malveira B, Vallim MA, Viana-Niero C, Ostroski EH, Telles GP, Dias Z, Batista-da-Cruz J, y Setubal JC. 2013. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the São Paulo Zoo Park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. PLoS ONE 8, e61928

Maziero R, Bononi VL, y Capelari M. 1992. Cultivo e produtividade de *Pleurotus ostreatus* var. *Florida* em Mogi das Cruzes, SP, Brasil. Sao Paulo: Hoehnea.

McCleary BV, Bouhet F. y Driguez H. 1991. Measurement of amyloglucosidase using p-nitrophenyl  $\beta$ -maltoside as substrate. *Biotechnology Techniques*, 5, 255-258.

McCleary BV. 1999. "Problems in the measurement of  $\beta$ -xylanase,  $\beta$ -glucanase and  $\alpha$ -amylase in feed enzymes and animal feeds". In "Proceedings of Second European Symposium on Feed Enzymes" (W. van Hartingsveldt, M. Hessing, J. P. van der Lugt and W. A. C. Somers, Eds.), Noordwijkerhout, Netherlands.

Membrillo I, Sanchez C, Meneses M, Favela E, y Loera O. 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, 99, 7842–7847

Meneses NG, Martins S, Teixeira JA, y Mussatto SI. 2013. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains, *Sep. Purif. Technol.* 108, 152–158.

Montgomery D. 2004. Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley. México D.F. México.

Mussatto SI. 2014. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *J Sci Food Agric.* 94(7), 1264-75.

Mussatto SI, Dragone G, Fernandes M, Milagres AM, y Roberto IC. 2008. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain, *Cellulose* 15, 711–721.

Mussatto SI, Dragone G. y Roberto IC. 2006. Brewer's spent grain: generation characteristics and potential applications. *J Serial Sci.* 43,1-14.

Narahara H, Koyama Y, Yoshida T, Athasampunna P, y Taguchi H. 1984. Control of water content in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation Technology*, 62 (5), 453-459

- Narahara H, Koyama Y, Yoshida T, Pichangkura S, Ueda R, y Taguchi H. 1982. Growth and enzyme production in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. J Ferment Technol. 60,311-9.
- Nielsen NB,y Schmidt F. 1985. The fate of carbohydrates during fermentation of low calorie beer. Carlsberg Research Communications 50, 325.
- Nielsen S. 2003. Food Analysis. Springer Science and Business Media. Ney York. EUA. 3a ed. pp. 118-119.
- Okalo BN, Ezeogu LI, y Ebisike CO. 1996. Raw starch digesting amylase from *Thermoactinomyces thalophilus* F13. World J Microbiol Biotechnol. 12, 637–8.
- Owuama CI. 1997. Sorghum: a cereal with lager beer brewing potential. World J Microb Biot 13,253–260
- Palacio H. 1956. Fabricación del alcohol. Barcelona – España. Salvat Editores, S.A.. pp. 279-305.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, y Nigam P. 1999. Solid state cultivation for the production of industrial enzymes. Current Sci 77, 149–162
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochem. 35, 1153–69.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P y Soccol VT. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresour Technol 74, 69–80
- Pandey A. 1992. Production of starch saccharifying enzyme (glucoamylase) in solid cultures. J Starch 44, 75–7.
- Pandey A. 1995. Glucoamylase research—an overview. J Starch. 47, 305–9.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. Biochem Eng J 13:81–84.
- Patrabansh S, y Madan M. 1997. Studies on cultivation, biological efficiency and chemical analysis of *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer on different bio-wastes. Acta Biotechnology, 172, 107–122.

- Pepe O, Ventorino V. y Blaiotta G. 2013. Dynamic of functional microbial groups during mesophilic composting of agro-industrial wastes and free-living (N<sub>2</sub>-fixing bacteria application. *Waste Manage.* 33, 1616–1625.
- Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G, y Faraco V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr Genet* 55:45–57
- Pirota RDPN, Tonelotto M, Delabona PS, Fonseca RF, Paixão DAA, Baleeiro FCF, Bertucci-Neto V, y Farinas CS. 2016. Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* Vol.33. ISSN 0104-6632 On-line version ISSN 1678-4383.
- Priest FG, y Stewart GG. 2006. *Handbook of brewing.* CRC Taylor and Francis, Boca Raton
- Robertson JAI, Anson KJA, Treimo J, Faulds CB, Brocklehurst TF, Eijsink VGH, y Waldron KW. 2010. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT Food Sci. Technol.* 43, 890-896.
- Rocha VAL, Maeda R, Pereira N, F Kern M, Elias L, Simister R, Steele-King C, Gómez LD, y McQueen-Mason SJ. 2016. Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. *Biotechnol. Prog.* doi:10.1002/btpr.2217
- Rotter BA, Marquardt RR, Guenter W, y Crow GH. 1990. "Evaluation of three enzymic methods as predictors of in vivo response to enzyme supplementation of barley-based diets when fed to young chicks". *J. Sci. Food. Agric.*, 50, 19-27
- Saerens SMG, Delvaux F, Verstrepen KJ, Van Dijck P, Thevelein, JM, y Delvaux FR. 2008. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 454–461
- Sahnoun M, Kriaa M, Elgharbi F, Ayadi DZ, Bejar S, y Kammoun R. 2015. *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: Optimization of culture conditions. *International Journal of Biological Macromolecules.* 75, 73-80

Saini JK. y Tewari AL. 2012. Simultaneous isolation and screening of cellulolytic bacteria: selection of efficient medium. *J. Pure Appl. Microbiol.* 3, 1339–1344.

Sandhu SK, Oberoi HS, Dhaliwal SS, Babbar N, Kaur U, Nanda D, y Kumar D. 2012. Ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) peels via simultaneous saccharification and fermentation using crude enzyme produced by *Aspergillus oryzae* and the thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain. *Annals of Microbiology*, 6(2)2, 655-666.

Santos M, Jimenez JJ, Bartolome B, Gomez-Cordoves C, y Nozal MJ. 2003. Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chem.* 80, 17-21.

Santos MM, y Riis, P. 1996. *Journal of the Institute of Brewing*, 102, 271-275.

Sato K, y Sudo S. 1990. Small scale solid state fermentation. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* Arnold. L. Demain and Jullian E. Davies, ASM press, Washington. D.C 61–79

Serna-Saldívar S. 1996. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. Primera edición. AGT Editor. México. 521 p.

Serna-Saldivar SO, y Rubio-Flores M. 2016. Role of intrinsic and supplemented enzymes in brewing and beer properties. In: Ray RC, Rosell CM (eds) *Microbial enzyme technology and food applications*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton

Serna-Saldivar SO. 2010. *Cereal grains properties, processing and nutritional attributes*. CRC Press, Boca Raton

Singh H, Soni SK. 2001. Production of starch-gel digesting amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae* HS-3 in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 37, 453–459

Sizova MV, Izquierdo JA, Panikov NS, y Lynd LR. 2011. Cellulose- and xylan-degrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2282–2291.

Soares FL, Melo IS, Dias AC, y Andreote FD. 2012. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2195–2203.

Sturion GL, y Oetterer M. 1995. Composicao quimica de cogumelos comestiveis (*Pleurotus spp.*) originados de cultivos em diferentes substratos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 152, 189–193.

Subhosh-Chandra M, Buddolla-Viswanath, y Rajasekhar-Reddy M. 2007. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian J. Microbiol.* 47, 323–328

Sugimoto T, y Shoji H. 2012. Indigestible dextrin is an excellent inducer for  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase production in a submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Letters*, 34, 347-351

Szendefy J, Szakacs G, y Christopher L. 2006. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1354–1360.

Taherzadeh MJ, y Karimi K. 2007. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources* 2, 707–738.

Toshikazu S, y Hiroshi S. 2012. Indigestible dextrin is an excellent inducer for  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase production in a submerged culture of *Aspergillus oryzae* *Biotechnology letters*. 34 (2), 347-51.

Ventorino V, Aliberti A, Faraco V, Robertiello A, Giacobbe S, Ercolini D, Amore A, Fagnano M, y Pepe O. 2015. Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Scientific Reports*. 2 (5), 8161. doi: 10.1038/srep08161.

Ventorino V, Ionata E, Birolo L, Montella S, Marcolongo L, de-Chiaro A, Espresso F, Faraco V, Pepe O. 2016. Lignocellulose-Adapted Endo-Cellulase Producing *Streptomyces* Strains for Bioconversion of Cellulose-Based Materials. *Frontiers in Microbiology*. 7. 2061. doi: 10.3389/fmicb.2016.02061

Viikari L, Kantelinen A, Sundquist J, Linko M. 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol Rev.* 13, 335–50.

Zadrazil F, Kurtzman RH. 1981. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics In Chang ST, Quimio TH, *Tropical mushrooms* p. 493. Hong Kong: The Chinese University Press, Shatin

Zhang D, Luo Y, Chu S, Zhi Y, Wang B, Zhou P. 2016. Enhancement of cellulase and xylanase production using pH-shift and dissolved oxygen control strategy with *Streptomyces griseorubens* JSD-1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178, 338–352. doi: 10.1007/s12010-015-1875-9.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Arnulfo Ricardo García Arellano

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Alimentos

Tesis: EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS PARA LA SACARIFICACIÓN DEL GRANO GASTADO DE CERVECERÍA Y SU UTILIZACIÓN COMO ADJUNTO EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA TIPO LAGER.

Campo de Estudio: Biotecnología de alimentos.

Datos Personales: Nacido en San Nicolás de los Garza, Nuevo León el 10 de agosto de 1989, hijo de Hilario Arnulfo García Arellano y Teresa de Jesús Arellano Orozco.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo el Grado de Licenciado en Ciencia de Alimentos en Agosto de 2011, así como el de Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología en marzo de 2015.

Experiencia Profesional: Gerente de Operaciones en Grupo LASECLAT Laboratorios, Jefe de Investigación y Desarrollo de Nuevos Productos en Pastelería Lety.