



## Revalorización de residuo de malta de cerveza para producir celulasas con hongos aislados en playas del estado de Jalisco

Leticia Casas-Godoy<sup>1</sup>, Iliana Barrera-Martínez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CIATEJ. Camino Arenero 1227, El Bajío, 45019. Zapopan, Jalisco.

México.

\*Autor de correspondencia: [ibarrera@ciatej.mx](mailto:ibarrera@ciatej.mx)

Recibido 11 de agosto de 2020; aceptado 22 de septiembre de 2020

### RESUMEN

El residuo de malta de cerveza es el principal subproducto de la industria cervecera, representa el 85% de los residuos generados en el proceso de producción. En este trabajo se utilizó el residuo de malta de cerveza como una opción económica y versátil para producir celulasas usando dos estrategias de cultivo, fermentación sumergida y sólida. Los microorganismos utilizados fueron hongos aislados en la zona costera de Jalisco y se identificaron como *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium spp.* El residuo de malta de cerveza se utilizó como fuente de carbono, inductor y sustrato para el crecimiento de los hongos y producción enzimática. La actividad celulasa en fermentación sumergida fue de 0.354 y 0.232 U/mL para *A. fumigatus* y *Penicillium spp.*, respectivamente ambas a 72 h de cultivo. En el caso de la fermentación sólida la actividad enzimática detectada fue 7.50 U/g<sub>RMC</sub> para *A. fumigatus* a los 11 días de cultivo y *Penicillium spp.* presentó la mayor actividad a los 14 d con 8.31 U/g<sub>RMC</sub>. De acuerdo con los resultados, este residuo fue adecuado para la producción de metabolitos de alto valor agregado, como las enzimas. Además, se lograron aislar e identificar microorganismos capaces de producir celulasas en fermentación sumergida y sólida.

**PALABRAS CLAVE:** enzimas, revalorización, residuos, aislamiento, identificación.

### ABSTRACT

Beer spent grains is the main by-product of the brewing industry, it represents 85% of the waste generated in the beer production process. In this work, beer spent grains was used as an inexpensive and versatile option to produce cellulases using two culture strategies, submerged and solid fermentation. The microorganisms used were fungi isolated from the coastal zone of Jalisco and were identified as *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium spp.* The beer spent grains was used as carbon source, inducer and substrate for fungal growth and enzyme production. Cellulase activity in submerged fermentation was 0.354 and 0.232 U/mL for *A. fumigatus* and *Penicillium spp.*, respectively, both at 72 h of culture. In the case of solid fermentation, the enzymatic activity detected was 7.50 U/g<sub>RMC</sub> for *A. fumigatus* at 11 days of culture and *Penicillium spp.* had the highest activity at 14 d with 8.31 U/g<sub>RMC</sub>. According to the results, this residue was suitable to produce high added value metabolites, such as enzymes. Furthermore, it was possible to isolate and identify microorganisms capable of producing cellulases in submerged and solid fermentation.

**KEY WORDS:** enzymes, revalorization, residues, isolating, identification.

## **INTRODUCCIÓN**

La producción de cerveza comienza con la germinación controlada de la cebada para producir la malta, ingrediente clásico de la industria cervecera (Mussato et al. 2006). Después, la malta se seca y se almacena. El proceso continúa con el molido de la malta para producir harina que se mezcla con agua y se calienta para producir un licor rico en azúcares fermentables, polipéptidos y aminoácidos (Mussato et al., 2006, Nigam, 2017). El licor se filtra y la parte insoluble se conoce como residuo de malta de cerveza (Nigam, 2017)

El residuo de malta de cerveza (RMC) representa el residuo más importante de la industria cervecera (Niemi et al., 2017). Esta industria genera aproximadamente 20 kg de RMC húmedo por cada 100 L de cerveza (Steiner et al., 2015). En 2018 México produjo 11,980 millones de litros de cerveza, generando 2.3 millones de RMC (Amador, 2019). El RMC está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina, proteínas, lípidos y almidón (Patel et al., 2018). Es utilizado como pienso para animales, ingrediente para alimentos de consumo humano, y materia prima para la producción microbiológica de bioetanol, ácido láctico,

xilitol y enzimas (Nigam, 2017). Algunas de las enzimas que se han producido son amilasas, xilanasas, celulasas, lacasas, ferulolil esterasa, etc., usando bacterias y hongos (Mussatto et al., 2013). En algunos casos, los medios de producción no son suplementados, porque el RMC tiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos y producción de metabolitos.

En años recientes, el uso de celulasas ha crecido por sus múltiples e importantes aplicaciones en las industrias de papel, alimentación animal, agricultura, limpieza y biorrefinería. Las celulasas son un grupo de enzimas: glucanasas (EC 3.2.1.4), exoglucanasas (EC 3.2.1.91) and beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) que hidrolizan la celulosa en oligosacáridos solubles (Nascimento et al., 2009).

Para la producción de estas enzimas se utilizan, preferentemente, hongos filamentosos por ser fácilmente cultivables y producir grandes cantidades de enzimas extracelulares (Payn et al., 2015). En México hay una gran biodiversidad de hongos que no han sido estudiados y que pueden ser usados para la producción de enzimas.

El objetivo de este trabajo fue revalorizar el RMC para producir celulasa por fermentación sumergida y sólida usando dos hongos aislados en playas del estado de Jalisco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

El RMC fue donado por la “Cervecería Fantástica”, cervecería artesanal localizada en Jalisco y se determinó su composición mediante un análisis bromatológico. El agar, PDA, PDB, los componentes de los medios de cultivo y otras sales se compraron a Sigma/Aldrich.

### Cribado e identificación molecular de los hongos

Los hongos se recolectaron en la playa “La Manzanilla” ubicada en el estado de Jalisco. Los microorganismos aislados se mantuvieron en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA) a 4°C. El cribado de los hongos productores de celulasas se llevo a cabo en cajas Petri usando un medio de cultivo cuya formulación fue (g/L): carboximetilcelulosa (CMC) 10, agar 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3. Las cajas Petri se inocularon con los hongos aislados y se incubaron a 30°C durante 72 h. La posible actividad celulasa de las cepas se evidenció tiñéndolas con rojo Congo al 0.1% durante 10 minutos para después lavar con una solución de NaCl (1M). Las cepas con capacidad de hidrolizar CMC formaron un halo, aquellas con los halos más grandes se eligieron para un segundo cribado (Kasana et al., 2008). Las cepas elegidas se inocularon en un

medio líquido con la misma formulación que el medio anterior sin agar y se incubaron a 30°C, 220 rpm durante 5 días.

Aquellas que presentaron mejor crecimiento se eligieron y se identificaron usando ADN genómico. La identificación se llevó a cabo amplificando la región ITS usando los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'). El ADN genómico fue extraído usando el kit DNeasy plant mini siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se observó en un gel de agarosa (1%) y cuantificó en un NanoDrop. La PCR se hizo con una mezcla de: ADN aislado 100 ng, buffer PCR 1x, primers 0.2 µM (sentido y contrasentido) y ADN polimerasa Phusion High-Fidelity 1 µM de. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C, 5 min seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30 s, hibridación a 45°C, 1 min y elongación a 72°C, 1.5 min con una elongación final a 72°C por 10 min. El fragmento amplificado fue separado en un gel de agarosa (1%) y se disolvió en 30 µM de agua para secuenciarse. La secuencia fue ensamblada y analizada con el software BioEdit, y se buscaron similitudes en el BLASTn

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Residuo de malta de cerveza

Para retirar los azúcares solubles que tiene el RMC se colocaron 100 g del residuo en un vaso de precipitados y se agregaron 600 mL de agua destilada. La mezcla se agito durante 2 h a 250 rpm, después se filtró usando un lienzo y el sólido se secó en un horno a 70°C durante 48 h. Una vez seco una parte se molió con un molino de café.

Producción de celulasas

Inóculo

La composición del medio de cultivo fue (g/L): PDB 12 y RMC lavado y molido 100. Una vez estériles y fríos se inocularon con las cepas elegidas y se incubaron a 30°C, 180 rpm durante 72 h.

Fermentación sumergida

Las celulasas fueron producidas en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio. El medio de producción fue (g/L) RMC lavado y molido 4, extracto de levadura 0.4,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.04,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.4 y  $\text{MgSO}_4$  0.1.

El medio esterilizado y frío (15 min, 121°C) se sembró con 5 mL del inóculo. Las condiciones de producción fueron 30°C, 180 rpm. Se tomaron muestras cada 24

horas por 4 días. La biomasa se separó por centrifugación (12500 rpm, 10 min) y la actividad enzimática se determinó en el sobrenadante. El experimento se hizo por duplicado.

Fermentación sólida

En este caso, las celulasas fueron producidas en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 5 g de RMC lavado sin moler estéril. Se inoculó con 4 mL de la semilla y 12 mL de agua destilada estéril. La humedad final aproximada fue de 70%. Los matraces se incubaron a 30°C por 18 días. Para determinar la actividad enzimática se tomaron dos matraces de cada hongo cada determinado tiempo. El extracto enzimático se recuperó adicionando 30 mL de agua destilada a cada matraz para después agitarlo a 250 rpm durante 1 hora. El RMC fermentado se removió mediante centrifugación (12500 rpm, 10 min) y la actividad enzimática se determinó en el sobrenadante. El experimento se hizo por duplicado.

Determinación de actividad celulasa

La actividad enzimática se determinó midiendo la hidrólisis de CMC (1%). Las condiciones de reacción fueron 50  $\mu\text{L}$  de CMC y 50  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático a 50°C, 30 minutos. Los azúcares hidrolizados se midieron usando el método de DNS (Miller, 1959). Una unidad de

actividad celulasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto a 50°C. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

## RESULTADOS

### Material biológico

Se aislaron 15 diferentes hongos de la muestra recolectada. Todas fueron cultivadas en el medio de CMC. En la figura 1 se observan los halos formados por algunas de las cepas. Solo 9 de los hongos ensayados presentaron el halo indicativo de hidrólisis de CMC.

En el siguiente cribado (medio líquido de CMC), de las 9 cepas formadoras de halo solo 7 presentaron crecimiento. De estas, se eligieron las 2 que presentaban mejor crecimiento.



**Figura 1.** Hongos sembrados en medio CMC y teñidas con rojo Congo.

Las cepas elegidas para la producción de celulasa y que fueron identificadas fueron las marcadas como H1 y HPA. De acuerdo con la identificación molecular realizada H1 es *Aspergillus fumigatus* y HPA es *Penicillium spp.*

La composición del RMC se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1.** Composición química del RMC (análisis bromatológico).

Componente	Concentración (%)
Humedad	4.4
Cenizas	2.1
Grasas	4.6
Proteína	18.6
Carbohidratos totales	66.1
Fibra cruda	4.2

En la figura 2 se muestra el RMC lavado y seco que se utilizó como fuente de carbono e inductor para la producción de celulasas.



**Figura 2.** RMC lavado y seco utilizado en este estudio.

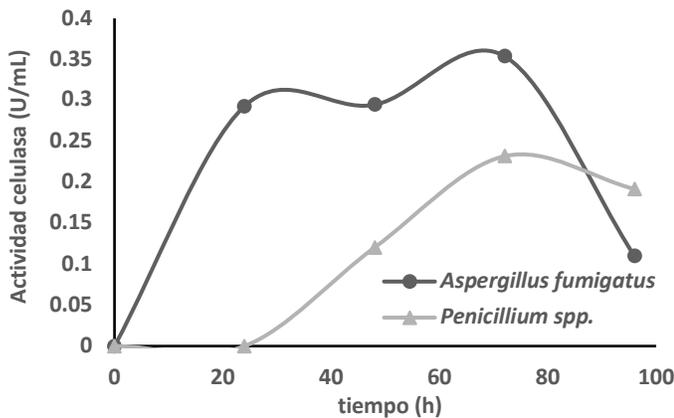
Producción de celulasas

Fermentación sumergida

Se detecto producción de celulasas con ambos hongos usando RMC lavado como fuente de carbono e inductor, tal como se puede observar en la figura 3.

En el caso se *A. fumigatus* la mayor actividad enzimática fue de 0.354 U/mL a las 72 h de cultivo. Se observo buen crecimiento y se detectó producción de celulasas desde las 24 h.

*Penicillium spp.* produjo celulasas a las 48 h, de acuerdo con los detectado. La mayor actividad enzimática fue de 0.232 U/mL a las 72 h. Sin embargo, se observó crecimiento desde las 24 h de cultivo.



**Figura 3.** Producción de celulasas con RMC lavado en fermentación sumergida con *A. fumigatus* y

*Penicillium spp.* Desviación estándar menor a 5%.

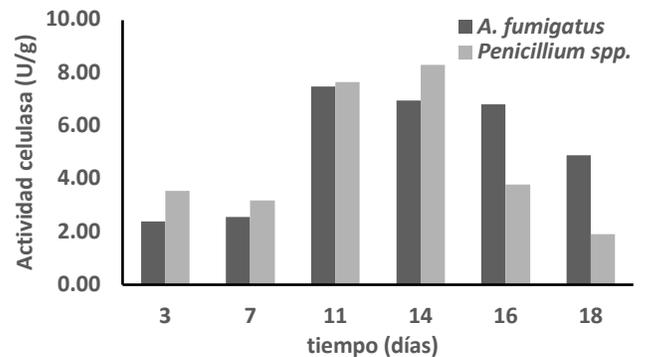
*A. fumigatus* presentó mayor actividad que *Penicillium spp.* al mismo tiempo de cultivo (72 h). Sin embargo, ambos hongos tuvieron la capacidad metabólica para

crecer y producir celulasas en RMC lavado en fermentación sumergida.

Fermentación sólida

Se detectó crecimiento y producción de celulasas con ambos hongos usando RMC lavado como único sustrato.

En el caso se *A. fumigatus* la mayor actividad enzimática fue de 7.50 U/g a los 11 días de cultivo. Se observo



invasión del hongo en el sustrato y se detectó producción de celulasas desde el día 3.

**Figura 4.** Producción de celulasas con RMC lavado en fermentación sólida con *A. fumigatus* y *Penicillium spp.*

Desviación estándar menor a 5%.

*Penicillium spp.* produjo celulasas a partir del día 3, de acuerdo con los detectado. La mayor actividad enzimática fue de 8.31 U/g a los 14 días de cultivo. Sin embargo, se observó invasión del hongo y producción de enzima desde el día 3 de cultivo.

*Penicillium spp.* presentó mayor actividad que *A. fumigatus*, pero en este caso fue a distintos tiempos de cultivo. Sin embargo, ambos hongos tuvieron la capacidad metabólica para crecer y producir celulasas en RMC lavada en fermentación sólida mostrando buena invasión del sustrato.

### CONCLUSIONES

El RMC fue revalorizado logrado producir metabolitos de alto valor agregado, como son las enzimas. Debido a su composición resulto ser una excelente fuente de carbono, inductor y sustrato para el crecimiento de hongos y producción de biomoléculas. Se detectaron 7 potenciales hongos productores de celulasas, y se eligieron los 2 que presentaron crecimiento más rápido y halos de mayor tamaño. De acuerdo con la identificación molecular realizada los 2 hongos se identificaron como *A. fumigatus* y *Penicillium spp.* Ambos produjeron celulasas en fermentación sólida y líquida.

### BIBLIOGRAFÍA

Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006).

Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of cereal science*, 43(1), 1-14.

Nigam, P. S. (2017). An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery. *Waste management*, 62, 255-261.

Niemi, P., Tamminen, T., Smeds, A., Viljanen, K., Ohra-aho, T., Holopainen-Mantila, U., ... & Buchert, J. (2012). Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9910-9917.

Steiner, J., Procopio, S., & Becker, T. (2015). Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology*, 241(3), 303-315.

Amador, O. (2019). México apuntaló en 2018 su liderazgo en el sector cervecero, *El Economista*.

Patel, A., Mikes, F., Bühler, S., & Matsakas, L. (2018). Valorization of brewers' spent grain for the production of lipids by oleaginous yeast. *Molecules*, 23(12), 3052.

Mussatto, S. I., Moncada, J., Roberto, I. C., & Cardona, C. A. (2013). Techno-economic analysis for brewer's spent grains use on a biorefinery

concept: The Brazilian case. *Bioresource technology*, 148, 302-310.

Nascimento, R. P. D., Alves Junior, N., & Coelho, R. R.

R. (2011). Brewer's spent grain and corn steep liquor as alternative culture medium substrates for proteinase production by *Streptomyces malaysiensis* AMT-3. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1384-1389.

Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H.,

Himmel, M. E., Sandgren, M., ... & Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chemical reviews*, 115(3), 1308-1448.

Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati,

A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, 57(5), 503-507.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent

for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.