

Valorización de subproductos de la industria alimentaria mediante fermentación sólida y sumergida con *Rhizopus* sp.

---

Elikagai industriako azpiproduktuen balorizazioa hartzidura solido eta likido egoeran *Rhizopus* sp. erabiliz

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

Jone Ibaruri Zamakona

2019



Valorización de subproductos de la  
industria alimentaria mediante  
fermentación sólida y sumergida con  
*Rhizopus* sp.

Jone Ibaruri Zamakona  
2019

Directores:  
Dr. Igor Hernández Ochoa  
Dr. Alejandro Barranco Ibarbia

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento a la fundación AZTI por darme la oportunidad de realizar esta tesis y, sobre todo, a Igor por haberme acogido como doctoranda y haberme dado todo su conocimiento y ayuda para sacar adelante este trabajo aun cuando comenzó su nueva etapa en la universidad, hasta que finalmente después del último año y medio ha conseguido poder aparecer como director oficial, aunque nunca dejó de serlo de manera extraoficial. También agradecer a Alex por codirigir la tesis y ayudarme en su campo.

Quiero agradecer a la gente que he conocido y con los que he compartido trabajo en AZTI durante estos 4 años. A la gente del laboratorio de microbiología por compartir conmigo sus conocimientos y ayudarme en todo lo que he necesitado, gracias Cristina, Iker, Miguel y Natalia. Agradecer a los compañeros de biblioteca con los que compartí los primeros dos años e hicieron que el inicio de esta nueva etapa fuera especial y sobre todo divertida, gracias Ekaitz, Itzi, Nerea, Janire, Javi, Lutxi, Mertxe y Nadia. También al resto de compañeros a los que fui conociendo año tras año, comenzando por Ane, Ibai, Iñaki, Iker y Xabi con los que compartí momentos de laboratorio, y los que fueron llegando, con los que compartí cafés, comidas y charlas. También agradecer a los compañeros de mesa de los últimos dos años, por el interés y el apoyo, en formato de ánimos, chocolates o frutos secos, gracias Bego, David, Jorge, Maite y Marta.

Quiero agradecer al departamento de Procesos Eficientes y Sostenibles, y sobre todo al equipo de Valorización, con quienes he podido compartir los últimos coletazos de mi tesis y me han ayudado en esta última etapa, gracias Bruno, Carlos, Carmen, David, Marta, Mikel, Jaime y Janire.

También dar las gracias a las empresas proveedoras de subproductos alimentarios. A la cooperativa La Milagrosa de Monterrubio por el alperujo, a Ekogras por los posos de café, a Natuber S.L. por las peladuras de patata, Vascolac S.L por el lactosuero, Indulleida S.A. por las melazas de naranja, a la cooperativa Boga por el bagazo de cerveza y a Mercabilbao por las frutas y verduras. Agradecer al Gobierno Vasco, departamento de Desarrollo Económico e Infraestructuras por financiar los proyectos de I+D+i en los que se ha desarrollado esta tesis.

Eskerrik asko Makazak: Heli, Lexu, Jun, Meri, Nairi, Bati, Gaizka, Gara, Jokin eta Maitan! Betiko lagunek, urrin dauzenak be bueltakeran denpora pasauko ez bazan moduen dalako, edozer gauze behar izin ezkerro lagunduteko prest zauzielako, batzutan laguntza eskatutea

kostau arren deskonekzio momentu asko emon doztezuezalako. Eskerrik asko ta gora kopak!  
Eskerrik asko Jun ta Eleder inglesagaz lagunduteagaitik!

Gracias por todos estos años, por crecer conmigo y por hacer de mí una persona más curiosa y a la vez más crítica, apoyarme siempre y, sobre todo, creer en mí.

A mi ama y a mi aita por ayudarme en este último año tan difícil en lo personal y en lo profesional, gracias por apoyarme en todas mis decisiones y sacarme de paseo para esos momentos clave de desconexión. Gracias a mi tía Bea, Iñigo, Naia, Iratxe, Izaskun, Jorge y Mikel por hacerme reír y disfrutar de estas Navidades.

A quien me ha hecho reír y desconectar cada vez que me veía, sin saber si lo necesitaba, solo porque él es así, ¡diversión asegurada! Eskerrik asko por este último año, mucho más dulce y lleno de vitalidad de lo que esperaba.



## RESUMEN

Se estima que entre un 20 y un 30 % del total de alimentos producidos en Europa se pierde o desperdicia, a pesar de que pueden desarrollarse procesos de bioconversión que permiten transformar estos subproductos en compuestos o productos de valor añadido. La presente tesis tiene como objetivo principal identificar nuevos bioprocesos para obtener nuevas fuentes de proteínas, ácidos orgánicos, quitosano, péptidos bioactivos y materias primas para alimentación animal y/o humana a partir de subproductos de diferentes industrias alimentarias. Para ello, los trabajos se han centrado en el desarrollo de los procesos fermentativos tanto en estado sólido (SSF) como líquido (SmF) mediante el hongo filamentoso *Rhizopus* sp.

A lo largo de la tesis se hace una introducción inicial y se desgranar los objetivos operacionales abordados en el trabajo. El apartado de resultados y discusión comienza con la descripción del aislamiento inicial de cepas ambientales y el intento de su mejora mediante mutaciones al azar. Una vez seleccionadas las cepas (apartado 1 de “resultados y discusión”), en los apartados 2, 3, 4 y 5, se describe la generación de modelos de fermentación (SSF y SmF), su validación y los efectos de la fermentación en diferentes subproductos como melazas de naranja, lactosuero, lixiviados de frutas y verduras, bagazo de cerveza y descartes de frutas y verduras. Los resultados muestran, en todos los casos, un aumento en el contenido proteico, en la cantidad y proporción de aminoácidos esenciales, la liberación de polifenoles y la reducción de la DQO en los productos resultantes. Los dos apartados siguientes (6 y 7) incluyen los trabajos de obtención de hidrolizados, bioactividades presentes, las pruebas de escalado y el análisis económico preliminar, que indica que los factores más importantes en la viabilidad del proceso de SSF son, por un lado, el ahorro generado por la no gestión de estos residuos y, por otro, la venta de productos finales. Finalmente, en la discusión general se presentan los resultados comunes a todos los procesos estudiados, con el fin de establecer reglas comunes a todos los productos fermentados con *Rhizopus* sp.

En conclusión, la combinación de la SmF y la SSF en la valorización integral de los subproductos, sobre todo frutas y verduras y el lixiviado generado en la etapa de prensado de las mismas, podría generar una disminución del impacto ambiental y económico por no tener que gestionarlos como residuos y un ingreso económico por la venta del producto valorizado, además de proporcionar una materia prima alternativa y sostenible para la alimentación animal y/o humana.

## LABURPENA

Europar ekoiztutako elikagai guztien %20 eta 30 bitartean galdu egiten da, nahiz eta azpiproduktu horiek baliozko produktuetan eraldatzeko biokonbertsio-prozesuak garatu daitezkeen. Tesi honen helburu nagusia, proteina iturri berriak, azido oganikoak, kitosanoa eta peptido bioaktiboak besteak beste lortzeko bioprozesu berriak garatzea da, animalia edo giza elikagai industrian zein industria kimiko eta farmazeutikoan lehengai gisa erabili ahal izateko. Horretarako, *Rhizopus* sp. onddoa erabili da, hartidura solido (SSF) zein likido egoeran (SmF) buruturiko prozesuetan.

Tesiaren hasieran, sarrera orokor bat eta helburu nagusiak aurkezten dira, horrez gain, emaitzen lehenengo atalean, onddoen isolamendua eta gauzatutako mutazio prozesuak aztertzen dira. Behin organismoak hautatuta, emaitzen 2., 3., 4. eta 5. ataletan sustratu ereduetan hartidura prozesuak aztertu eta produkzio ereduak garatu dira eta ondoren, elikagai industriako azpiproduktuetan (fruta eta barazki, garagardo ekoizpen prozesuko azpiproduktuak, melazak, gazura eta olibaren azpiproduktuak) sustratu ereduetan garatutako hartidura prozesuak balioztatzen dira. SSF prozesuen eraginez, azpiproduktuen proteina edukia handitu egiten da, funtsezko aminoazidoen kopurua eta proportzioa handituz eta polifenolak askatuz. SmF prozesuetan, azpiproduktuen oxigeno eskari kimikoa (OEK) murrizten da eta proteinan aberatsa den onddo biomasa lortzen da. Ondorengo bi ataletan (6. eta 7. atalak) hidrolizatuak lortzeko lanak, bioaktibitate analisiak, SSF prozesuen eskala handitze probak, eta SSF prozesuaren azterlan ekonomikoa azaltzen dira. Azterlan ekonomikoak, hondakin horiek ez kudeatzeak sortutako aurrezkiak eta lorturiko baliozko produktuen salmentak eragin handiena duten faktoreak direla ondorioztatzen du, eta hauei esker balantze positiboa lortzen da aztertutako egoeran. Ondorio gisa, diskusio orokorrean aztertutako prozesu guztien emaitza komunak aztertu eta *Rhizopus* sp. erabiltzen duten produktu hartiduraz guztiei arau komunak ezartzen zaizkie.

Laburbilduz, fruta eta barazki azpiproduktuen SmFa eta SSFa konbinatzen direnean, balorizazio prozesu integrala posiblea da; ondorioz, ez dira hondakin gisa kudeatu behar eta, gainera, lehengai alternatibo eta iraunkorrak eskaintzen dizkigu, ingurumen eta ekonomia arloan inpaktu positiboa izanik.

## **ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS**

AA	Aminoácidos/Amino acids
AG/FA	Ácidos grasos/Fatty acids
BCA	Ácido bicinconínico/Bicinchoninic acid
BE/EB	Bromuro de etidio/Ethidium bromide
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albúmina de suero bovino/Bovine serum albumin
BSG	Bagazo de cerveza/Brewer's spent grain
CCRD	Diseño compuesto central rotativo/Central composite rotary design
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CMC	Carboximetilcelulosa
CNF/NFC	Carbohidrato no fibroso/Non-fibrous carbohydrate
CW	Cheese whey
DE/SD	Desviación estándar/Standard deviation
DNS	Dinitrosalicylic
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DQO/COD	Demanda química de oxígeno/Chemical oxygen demand
EAA	Aminoácidos esenciales/Essential amino acids
EAAI	Índice de aminoácidos esenciales/Essential amino acid index
EFFPA	European Former Foodstuff Processor Association
ES/DM	Extracto seco/Dry matter
FAD	Fibra ácido detergente
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FBP	Fungal bio protein
FDA	Food and Drug Administration

FEDNA	Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal
FEFAC	European Feed Manufacturers' Federation
FND/NDF	Fibra neutro detergente/Neutral detergent fiber
FVd	Fruit and vegetable discards
FVL	Lixiviado de frutas y verduras/Fruit and vegetable leachate
FVS	Sólidos de frutas y verduras/Fruit and vegetable solids
GAE	Gallic acid equivalent
GH/DH	Grado de hidrólisis /Degree of hydrolysis
GRAS	Generally Recognized as Safe
ITS	Internal Transcribed Spaces
LD/BL	Límite de detección/Below detection limit
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados/Monounsaturated fatty acids
ND	No determinado/Not determined
MNNG	N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine
OM	Orange molasses
OPA	O -phthalaldehyde
PBC	Púrpura de bromocresol
PDA	Potato dextrose agar
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados/Polyunsaturated fatty acids
RSM	Response surface methodology
SCP	Single cell protein
SFA	Ácidos grasos saturados/Saturated fatty acids
SmF	Fermentación sumergida/Submerged fermentation
SSF	Fermentación en estado sólido/Solid state fermentation
t	Tonelada

TEAC	Trolox equivalent capacity
TIR	Tasa interna de retorno
TPC	Total phenolic content
TSA	Tryptone soya agar
UE/EU	Unión Europea/European Union
UV	Ultraviolet
VAN	Valor actual neto



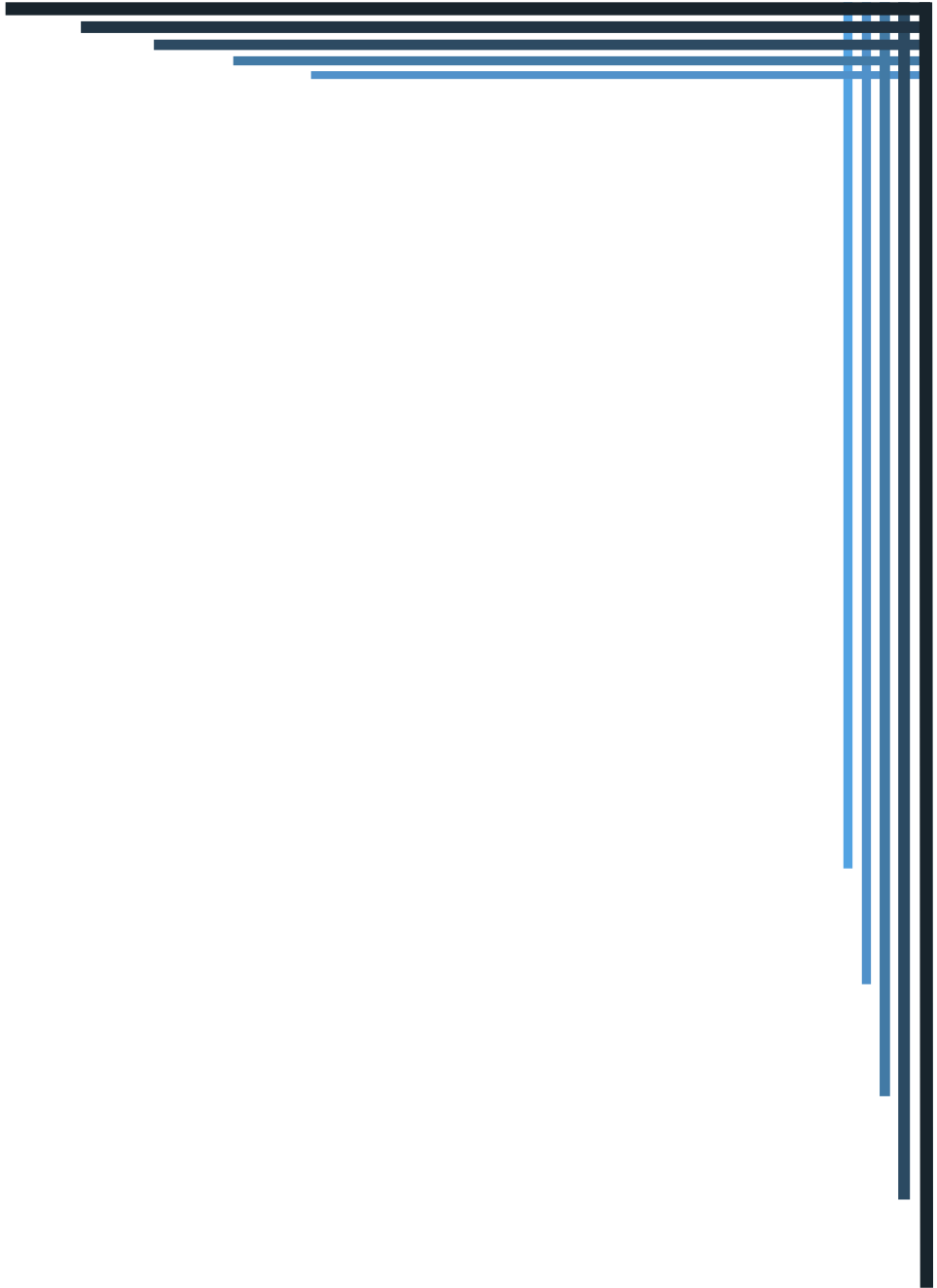


## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Sostenibilidad de la cadena alimentaria; ¿Qué hacemos con lo que no consumimos? .....	3
1.2 Principales subproductos a considerar .....	18
1.3 El agente transformador: Hongos <i>Zygomycetes</i> .....	26
1.4 Proceso de biotransformación .....	30
1.5 Productos de interés a partir de <i>Rhizopus</i> .....	36
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
3.1 Subproductos utilizados .....	51
3.2 Recuento de hongos y bacterias .....	53
3.3 Cepas fúngicas: aislamiento, identificación y selección.....	54
3.4 Mutación y caracterización de cepas .....	55
3.5 Fermentación en estado sólido .....	56
3.6 Fermentación sumergida .....	60
3.7 Determinaciones analíticas .....	63
3.8 Extracción y caracterización de compuestos tras los procesos de SSF .....	67
3.9 Extracción, hidrólisis y caracterización de proteínas de la biomasa de <i>Rhizopus</i> ...	70
3.10 Viabilidad técnico-económica .....	72
3.11 Análisis estadístico .....	74
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1: Selección de cepas de <i>Rhizopus</i> sp.: herramienta biotecnológica para la producción de compuestos de valor añadido.....</b>	<b>79</b>
<b>4.2: <i>Rhizopus oryzae</i> as fermentation agent in food derived sub-products .....</b>	<b>93</b>
<b>4.3: Valorization of cheese whey and orange molasses for fungal biomass production by submerged fermentation with <i>Rhizopus</i> sp. ....</b>	<b>109</b>
<b>4.4: Solid state fermentation of Brewer's spent grain using <i>Rhizopus</i> sp. to enhance nutritional value .....</b>	<b>133</b>
<b>4.5: A combined integral strategy for fruit and vegetable by-product valorization by fungal submerged and solid state fermentation .....</b>	<b>155</b>
<b>4.6: Pruebas preliminares de escalado y viabilidad técnico-económica del proceso de fermentación en estado sólido.....</b>	<b>175</b>
<b>4.7: Extracción proteica y sus hidrolizados a partir de la biomasa de <i>Rhizopus</i> sp....</b>	<b>207</b>
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>213</b>

<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>223</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>227</b>
<b>8.</b>	<b>SUPPLEMENTARY MATERIAL</b> .....	<b>257</b>

# 1. INTRODUCCIÓN





La valorización de subproductos de la industria alimentaria mediante biotransformación en productos de alto valor es un proceso con cuatro componentes claros: el subproducto a tratar, el agente biotransformador, la tecnología de transformación y el producto obtenido. En esta introducción haremos un breve repaso de estos componentes en el contexto de la presente tesis.

## 1.1 Sostenibilidad de la cadena alimentaria; ¿Qué hacemos con lo que no consumimos?

### 1.1.1 ¿Qué es un subproducto?

Una parte muy importante de los alimentos producidos no es consumida, bien porque no llega al consumidor o porque este no lo aprovecha. Sin embargo, antes de abordar el problema debemos hacer un ejercicio semántico con el fin de entender los datos publicados, la regulación existente y aclarar la terminología en este campo.

Para unificar la definición de qué es un subproducto, quizá la forma más gráfica sea utilizar la “jerarquía de alimentos y bebidas” (Figura 1) [1] desarrollada dentro del programa WRAP (Waste and Resources Action Programme, Reino Unido) como una “hoja de ruta” a la hora de considerar los posibles usos de los descartes o desperdicios de la industria alimentaria y de bebidas en función del valor de los nuevos productos generados.

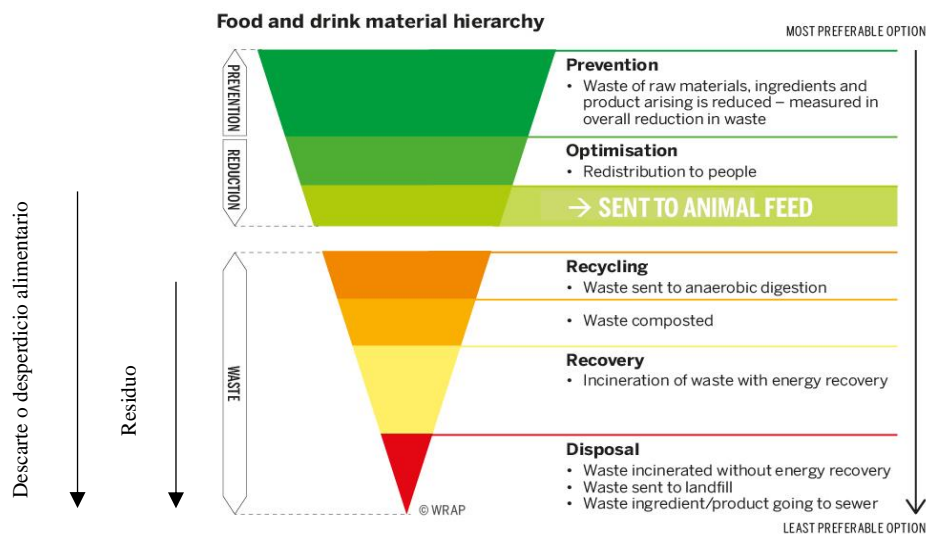


Figura 1. "Jerarquía de alimentos y bebidas" desarrollada por WRAP. Figura obtenida de EFFPA [1].

De acuerdo a esta clasificación, el material que se genera debido al proceso de producción de un alimento, que no llega a los consumidores, o que estos no utilizan, se denomina “descarte o desperdicio alimentario”, mientras que la fracción de los descartes que no puede entrar de nuevo en la cadena alimentaria se denomina “residuo”, y se define como cualquier sustancia u objeto del cual su poseedor se desprenda o tenga la intención o la obligación de hacerlo. Pese a que puede parecer una mera diferencia semántica, es de gran importancia, puesto que tiene repercusiones legales y económicas importantes para las empresas, al tener que tratar los residuos generados, con el correspondiente desembolso que ello supone.

En una misma idea de aclarar la terminología, la Directiva de Residuos 2018/851 (UE) [2], en el apartado 1 de su artículo 5, determina claramente los criterios para distinguir un subproducto de un residuo. De forma literal, afirma que *“Los Estados miembros adoptarán las medidas adecuadas para garantizar que una sustancia u objeto resultante de un proceso de producción cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia u objeto no se considere un residuo, sino un subproducto, si se cumplen las condiciones siguientes:*

- a) es seguro que la sustancia u objeto va a ser utilizado ulteriormente;*
- b) la sustancia u objeto puede utilizarse directamente sin tener que someterse a una transformación ulterior distinta de la práctica industrial normal;*
- c) la sustancia u objeto se produce como parte integrante de un proceso de producción;*
- d) el uso ulterior es legal, es decir la sustancia u objeto cumple todos los requisitos pertinentes para la aplicación específica relativos a los productos y a la protección del medio ambiente y de la salud, y no producirá impactos generales adversos para el medio ambiente o la salud humana.”*

### **1.1.2 Un problema a nivel mundial y local**

Tanto a nivel mundial como a nivel europeo, existen diversas iniciativas con el objetivo de estimar los desperdicios alimentarios, disminuirlos y valorizarlos, como por ejemplo el proyecto FUSIONS (Food Use for Social Innovation by Optimising Waste Prevention Strategies) [3] y la iniciativa “SAVE FOOD: Iniciativa mundial sobre la reducción de la pérdida y el desperdicio de alimentos” [4].

Ambos proyectos estiman que entre un 20 y un 30% del total de alimentos producidos en Europa se pierde o desperdicia, generando impactos negativos en toda la cadena de suministro



de alimentos y que existe, además, una falta de coordinación entre los componentes de la cadena de suministro y una necesidad de sensibilización por parte de las industrias.

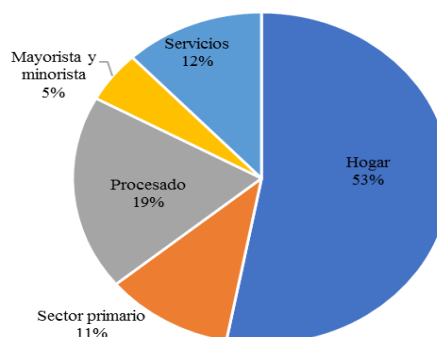
El proyecto FUSIONS concluyó que, de los 865 kg de alimentos por persona y año que se producen en la UE-28, se desperdician 173 kg de alimentos (Tabla 1).

*Tabla 1. Estimaciones de desperdicio alimentario (alimentos y partes no comestibles asociadas a alimentos) en UE-28, año 2012.*

Sector	Millones de toneladas	Kg por persona
Sector primario	9,1 ± 1,5	18 ± 3
Procesado	16,9 ± 12,7	33 ± 25
Mayorista y minorista	4,6 ± 1,2	9 ± 2
Servicios	10,5 ± 1,5	21 ± 3
Hogar	46,5 ± 4,4	92 ± 9
Total	87,6 ± 13,7	173 ± 27

Tabla obtenida de Stenmarck *et al.* [3] 95% intervalo de confianza.

Sin embargo, no todos los actores de la cadena alimentaria tienen la misma tasa de pérdida, siendo el hogar el punto más problemático. Más de la mitad del desperdicio de alimentos en la UE-28 corresponde al consumidor, mientras que solo un 5% corresponde a la venta al por mayor y comercio minorista (Figura 2). Los costes asociados con el desperdicio de alimentos para la UE-



*Figura 2. Desperdicio alimentario en UE-28 en 2012 por sectores. Figura adaptada de Stenmarck *et al.* [3].*

28 en 2012 se estimaron alrededor de 143 mil millones de euros. Dos tercios de estos costes están asociados con el desperdicio de alimentos de los hogares; debido a los elevados costes asociados al procesamiento, el embalaje, los costes de venta al por menor, etc. [3].

También existen diferencias entre países. En los países en vías de desarrollo el 40% de las pérdidas ocurren en las etapas de postcosecha y procesamiento, mientras que, en los países industrializados, más del 40% de las pérdidas se producen a nivel del consumidor y del comercio minorista. En este último grupo se desperdician grandes cantidades de alimentos debido a estándares de calidad que sobrevaloran la apariencia.

En cuanto al País Vasco, el plan de competitividad de la industria alimentaria vasca 2014-2016 [5] muestra que existe una baja tasa de aprovechamiento y valorización de residuos y vertidos en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). Dado que las pérdidas durante el proceso de producción se traducen en pérdidas económicas, la industria alimentaria lleva años trabajando en la mejora continua de la eficiencia de sus procesos y en la optimización del uso de los recursos.

Actualmente, tanto las pérdidas que se producen durante los procesos de transformación de alimentos como su margen de mejora, son cada vez menores, por lo que se están poniendo en marcha nuevas iniciativas para desarrollar sistemas integrales de valorización de estos subproductos y residuos.

Al mismo tiempo, el cuidado del medio ambiente comienza a ser un factor relevante dentro de la gestión global de las empresas. Muchas de ellas han incorporado con éxito el factor ambiental en su gestión diaria, aprovechando así las oportunidades que supone la inclusión de criterios medioambientales en la política de empresa, la mejora de procesos, el desarrollo de nuevos productos, la apertura de nuevos mercados, nuevos envases, etc. Sin embargo, aún quedan muchos subproductos sin tratar debido a la falta de procesos de valorización.

### **1.1.3 Rutas de tratamiento de descartes alimentarios**

El proyecto FUSIONS de la UE ha definido un Marco Técnico para analizar los descartes resultantes de la cadena de suministro de alimentos [6] (Figura 3). La Sección A presenta los principales pasos en el sistema agroalimentario, desde la producción al consumo. La sección B refleja las diferentes rutas de reutilización, reciclaje, recuperación y eliminación de todo lo que los humanos no consumen.

La sección B-i de la Figura 3 muestra los alimentos o partes no comestibles de los alimentos enviados a alimentación animal o a la producción de materiales biológicos y/o procesamiento bioquímico (B1-B2) denominados “valorización y conversión”. El destino B2 no cubre la bioenergía ni la producción de biocombustibles de ningún tipo (por ejemplo, biogás, biodiesel o bioetanol).

La sección B-ii de la misma figura se refiere al flujo de todos los alimentos y partes no comestibles retiradas de la cadena de suministro de alimentos y tratadas por una de las actividades dentro de B3-B11. La sección C y D incluyen usos de materias primas previo a su entrada en la cadena alimentaria, por lo que no son contabilizados como desperdicio

alimentario.

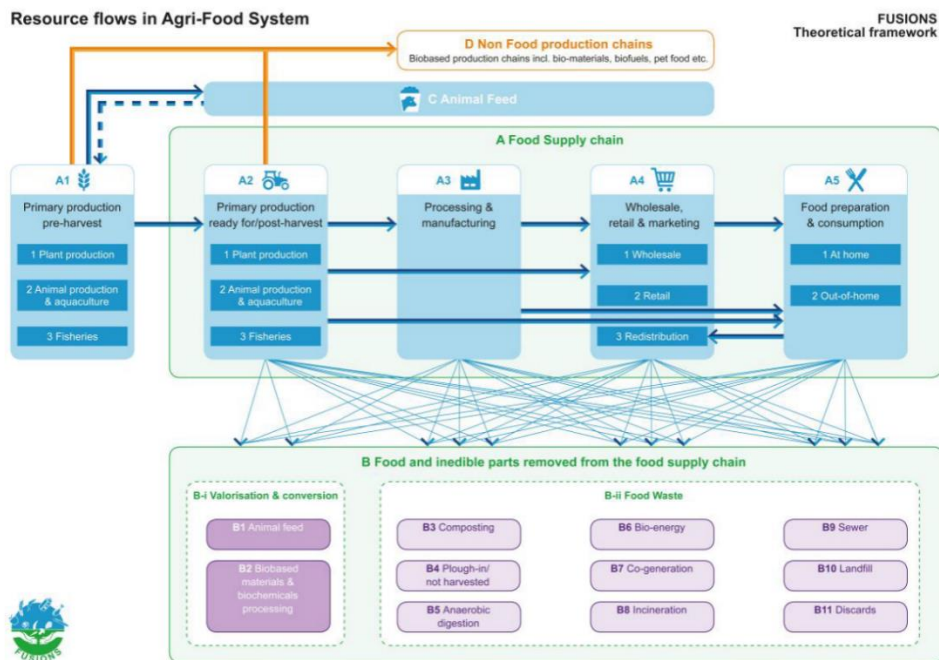


Figura 3. Marco técnico que define la cadena de suministro de alimentos y el desperdicio de alimentos. Figura obtenida de Östergren et al [6].

Cabe destacar que según la Directiva de Residuos 2018/851 (UE) [2] los procesos de reciclado y obtención energética están recogidos como procesos de valorización, mientras que en las iniciativas dirigidas y centradas en el sector alimentario y de bebidas, en cambio, se clasifican como desperdicio alimentario. Esta tesis “Valorización de subproductos de la industria alimentaria mediante fermentación sólida y sumergida con *Rhizopus* sp.” está centrada en la industria alimentaria y de bebidas, por lo que los términos se fijan por los proyectos y estudios llevados a cabo en este ámbito y se denominará valorización a los procesos clasificados en el apartado B-i (Figura 3).

Los estudios existentes muestran que la valorización y conversión (sección B-i, Figura 3) es una alternativa común y preferida por muchos sectores, evitando los costes de tratamiento para su eliminación y, a su vez, pudiendo generar un rendimiento financiero. Cuando no es posible la prevención o reducción en la producción de un subproducto (Figura 1, secciones en color verde), la legislación vigente fija que se debe estudiar la aplicación de los objetivos

establecidos en la Directiva de Residuos 2018/851 (UE) [2]. En dicha normativa se fija por orden de prioridad las siguientes opciones:

- **Reutilización:** operación mediante la cual productos o componentes que no sean residuos se utilizan de nuevo con la misma finalidad para la que fueron concebidos.
- **Reciclaje:** transformación mediante la cual los materiales de residuos son transformados de nuevo en productos, materiales o sustancias, con el propósito de destinarlos a su objetivo inicial o a otros fines.
- **Valorización:** operación cuyo resultado principal sea que el subproducto sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales que, de otro modo, se habrían utilizado para cumplir una función particular, o que sea preparado para cumplir esa función, en la instalación o en la economía en general. Dentro de esta opción, la utilización de los descartes como alimento para animales puede llegar al 50-80% del descarte total [3].
- **Eliminación:** realizar un vertido controlado o destruir los residuos total o parcialmente, con métodos que no causen peligro para la salud humana y ni perjuicios al medio ambiente.

Igualmente, desde las instancias europeas se anima a transformar estos descartes orgánicos en productos que generen un beneficio económico y medioambiental, siendo el desarrollo tecnológico la clave para obtener el máximo potencial de algunos de estos desperdicios.

#### **1.1.4 Problemática de los piensos para alimentación animal**

Se estima que para 2050, el mundo necesitará alimentar a 2 mil millones de personas adicionales y un 70% más de carne y leche. La creciente demanda futura de productos ganaderos, relacionada con el aumento de ingresos, población y urbanización, conllevará a una gran demanda de alimentos y recursos. La sostenibilidad de los sistemas de producción de piensos está siendo desafiada debido a factores como la escasez de tierra, suelo y agua, la competencia por los recursos entre cultivos destinados a alimentos o biocombustible, el cambio climático, y la competencia por los recursos no renovables. Una de las claves para el desarrollo ganadero sostenible es el uso eficiente de los recursos disponibles, incluyendo la reducción del desperdicio de alimentos y la aplicación de nuevos recursos para la alimentación animal que no compitan con la alimentación humana [7].

La EFFPA (European Former Foodstuff Processor Association) afirma que se utilizan 5 millones de toneladas de materias primas en alimentación animal [1], y que existe una tendencia de aumento a 7 millones de toneladas hasta 2025. De forma general, la demanda de piensos en ganadería está aumentando en la mayoría de los países en desarrollo, lo que provoca que, muchos de estos países no puedan producir suficiente pienso, teniendo que importar gran parte de los ingredientes, como la soja. Es por ello, que la investigación en nuevos recursos para la elaboración de piensos puede ayudar a reducir este déficit y disminuir la competencia entre la producción de alimentos para ganado y alimentación humana.

En este escenario, una de las alternativas planteadas es la utilización en alimentación animal de los descartes de la alimentación humana. Esta estrategia puede ofrecer a los productores de alimentos un mercado constante y sostenible para valorizar sus pérdidas de alimentos y, al mismo tiempo, puede ser una fuente de materia prima alternativa para los fabricantes de piensos.

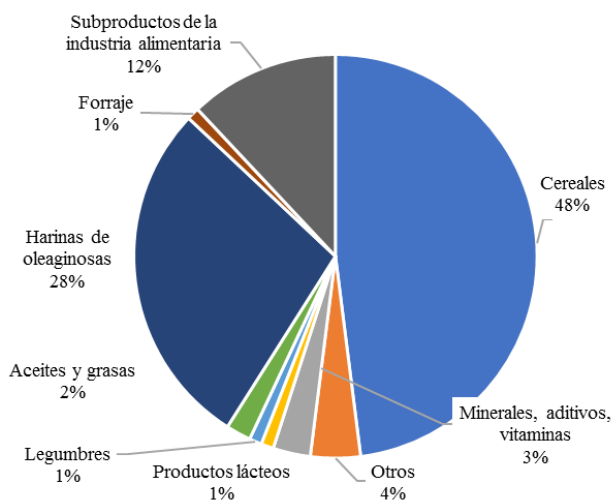


Figura 4. Ingredientes utilizados en la industria de piensos UE-27 en 2011. Figura adaptada de FEFAC [8].

Los cereales y las oleaginosas son el componente principal de los piensos, su incidencia en sus precios es muy alta y los fabricantes precisan un suministro continuo y garantizado que les permita cubrir las necesidades de alimentación del ganado. Según la FEFAC (European Feed Manufacturers Federation), a pesar de la gran variación del precio de las materias primas en los últimos años, la proporción de materias primas por categorías se mantiene relativamente estable (48% cereal, 28% harinas de oleaginosas) [8] (Figura 4). Cuestiones como la calidad de las partidas compradas, la continuidad en la oferta, la garantía de que estén libres de micotoxinas o los costes logísticos, condicionan la competitividad del sector de piensos.

Los efectos más negativos para los agentes industriales son los incrementos de los precios y su volatilidad. A nivel interaccional, la UE también necesita obtener sus ingredientes ricos en

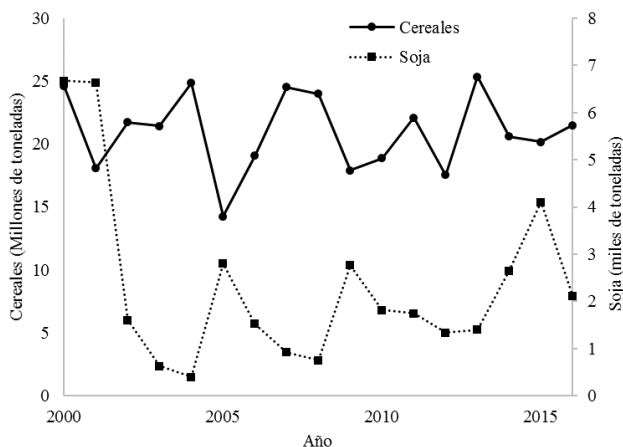


Figura 5. Oscilaciones en la producción de cereales y soja en España. Figura propia, datos obtenidos de FAOSTAT [9].

proteína del mercado global, en el que la soja ha sido la fuente más importante en los últimos años. A nivel estatal, España es alta y crecientemente deficitaria en cereales y soja, debido, sobre todo, al fuerte desarrollo ganadero y a que las producciones españolas en secano son muy variables, lo que obliga a la

importación de grandes volúmenes de los mismos. Es por esto, que el sector de piensos español es muy dependiente de los mercados exteriores y sufre directamente sus fluctuaciones.

Actualmente, la producción de cereales de grano en España está en torno a 20 millones de toneladas y la producción de soja en torno a 2 mil toneladas (Figura 5), con fuertes variaciones [9]. Esta variabilidad provoca fuertes oscilaciones en los precios finales y genera una gran incertidumbre ante los resultados económicos en todos los actores de la cadena ganadera (productores de piensos, ganaderos, consumidores).

En el sector de la alimentación para acuicultura, la harina de pescado sigue siendo la principal fuente de proteína, particularmente en alimentos para peces carnívoros [10,11]. Esto es debido a que tiene un alto contenido de proteínas digeribles, un adecuado perfil de aminoácidos (AA), una alta palatabilidad y carece de compuestos antinutritivos, al mismo tiempo, la harina de pescado es también una fuente de lípidos, incluidos los ácidos grasos esenciales altamente insaturados (HUFA) y de minerales como el fósforo.

Dado que la producción de estas harinas es poco sostenible medioambientalmente, y que la disponibilidad de este producto en el mercado mundial es limitada, se requiere con urgencia que el uso de la harina de pescado en alimentos acuáticos se reduzca sustancialmente [12]. Sin embargo, como los peces tienen altos requerimientos de proteínas en la dieta, las fuentes potenciales de proteínas alternativas están restringidas a solo unos pocos ingredientes [13], como subproductos de animales, alimentos de origen vegetal (principalmente concentrados) y “single cell proteins” (SCP). Por lo general, estas fuentes alternativas tienen desventajas frente



a la harina de pescado [14], como perfiles de AA inadecuados, menor digestibilidad, menor palatabilidad y presencia de antinutrientes [10].

En este escenario, la aparición de materias primas alternativas, como es el caso de las harinas a partir de subproductos de la industria alimentaria después de un proceso de valorización como la fermentación, reduciría la dependencia de los mercados internacionales, reduciría costes y por tanto mejoraría la competitividad del sector.

La viabilidad de la valorización de dichas fracciones alimentarias para su uso en alimentación animal depende fundamentalmente de una serie de aspectos clave.

- **Legislativos:** Cumplimiento de los requisitos legales relativos a la gestión de residuos y alimentación animal.
- **Técnicos y de mercado:** Aspectos relacionados con las magnitudes de proceso, ratios de obtención, consumos, escalabilidad y producto final representativo y de calidad homogénea. Adecuada composición nutricional respecto a los requerimientos nutricionales de los animales. Disponibilidad real, cantidades, estacionalidad, dispersión, tendencia de mercado, gestión que se realiza actualmente...
- **Económicos:** Modelo de negocio, oportunidad de negocio, propuesta de valor y mercado de clientes.

La Tabla 2 desgana estos factores y avanza los parámetros a analizar para cada uno de ellos.

#### *Factores legislativos*

La legislación sobre residuos ha sido ampliamente discutida en los apartados iniciales de la introducción del presente documento, por lo tanto, los aspectos legislativos a estudiar en esta sección serán aquellos ligados a la legislación de piensos. El reglamento (CE) N° 767/2009 sobre la comercialización y la utilización de los piensos del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de julio de 2009 [15] define las diversas categorías de piensos comerciales y las tolerancias admitidas relativas a las indicaciones del etiquetado sobre la composición (anexo IV), declaraciones obligatorias de composición en función de la materia prima (anexo V) y las declaraciones de composición de las materias primas para piensos y piensos completos en función de si están dirigidos a animales destinados a producción de alimentos (anexo VI) o dirigidos a animales no destinados a la producción de alimentos (anexo VII).

Tabla 2. Factores legislativos, técnicos y de mercado y económicos en la viabilidad del proceso industrial.

Factores legislativos		Factores técnicos y de mercado		Factores económicos	
Factor	Parámetro de análisis	Factor	Parámetro de análisis	Factor	Parámetro de análisis
Compuestos inorgánicos	Arsénico; cadmio; flúor, mercurio; plomo	Humedad	< 12% Piensos / Sin límite: suministro directo	Coste y disponibilidad de materia prima	
Pesticidas	Aldrín; Dieldrín, Canfecloro, Clordán, DDT, Endosulfán, Endrín, Heptacloro, Hexaclorobenceno, Hexaclorociclohexano	Disponibilidad todo el año	Suministro regular	Coste Logístico	Dispersión geográfica
Micotoxinas	Aflatoxina B1, Cornezuelo de centeno ( <i>Claviceps purpurea</i> )	Tamaño de partícula	Homogéneo	Coste procesado	% Humedad inicial → Humedad final, coste fermentación...
Dioxinas y PCBs		Valor nutricional	Proteína; fibra; grasa; CNF; AA; antioxidantes, minerales; digestibilidad proteica...	Coste de inversión	Equipos, terrenos...
Compuestos nitrogenados	Nitritos y melamina	Estabilidad en la composición	Composición en diferentes periodos		Tecnología idónea para la aplicación
Otro	Gosipol, teobromina, esencia volátil de mostaza, ácido cianhídrico, impurezas botánicas perjudiciales...	Aceptación por parte del animal	Sabor; Aroma; Color; Aspecto...	Ingreso Gestión	Precio de la gestión
		% Inclusión	Cantidad anual y por meses	Ingreso Venta	Precio de la harina

Las materias primas permitidas en la formulación de piensos están definidas dentro del catálogo de materias primas para piensos reguladas por el reglamento (UE) 2017/1017 de la Comisión de 15 de junio de 2017 por el que se modifica el Reglamento (UE) N° 68/2013 [16]. Este reglamento establece, por un lado, un glosario de tratamientos y, por otro, un listado de materias primas. Dentro del glosario de tratamientos se encuentra la fermentación, que está definida como “*tratamiento por el cual se producen o se utilizan microorganismos como bacterias, hongos o levaduras en las materias primas para modificar su composición o sus propiedades químicas*”.

Dentro del listado de materias primas existe un apartado 12 donde se especifican los productos y subproductos obtenidos por microorganismos fermentadores que se inactivan tras el proceso de fermentación, de modo que no quedan microorganismos vivos. Dentro de este apartado, no existe ningún bloque común de microorganismos a utilizar, como si ocurría con el reglamento anterior (UE) N° 68/2013 [17]. En el reglamento actual existe una materia prima similar a la estudiada en este proceso, declarada como, “*producto derivado de Aspergillus oryzae rico en proteína*” y definida como “*Producto de fermentación obtenido del cultivo de Aspergillus oryzae en sustratos, en su mayoría, de origen vegetal, como melazas, jarabe de azúcar, alcohol, vinazas, cereales y productos que contengan almidón, zumos de frutas, lactosuero, ácido láctico, azúcar, fibras vegetales hidrolizadas y nutrientes de fermentación, como amonio o sales minerales. Puede tratarse de un producto seco*”. Lo cual nos indica una posible vía de inclusión del uso de subproductos fermentados por *Rhizopus oryzae*, al ser también un hongo filamentoso reconocido como GRAS (Generally Regognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration), en el listado de materias primas para piensos [18].

Finalmente, el producto comercial también debe cumplir los requisitos sobre higiene de piensos, definidos en el Reglamento (CE) N° 183/2005 del Parlamento Europeo por el que se fijan los requisitos en materia de higiene de los piensos [19] y la Directiva 2002/32/CE sobre sustancias indeseables en la alimentación animal [20]. En este último se establecen las sustancias indeseables a determinar en función de la materia prima que sea, su destino y tipo de pienso, además de especificar el contenido máximo de las mismas. Algunas de las sustancias a determinar se listan en la Tabla 2.

#### *Aspectos nutricionales a considerar*

Cuando tratamos la formulación de los piensos, hay que tener en cuenta tanto las necesidades nutricionales de los animales destinatarios como las propias necesidades tecnológicas de la elaboración de piensos. El estudio sobre las necesidades fisiológicas de los animales atiende a

los requerimientos nutricionales de los animales y la absorción de los mismos. Los animales pueden utilizar una variedad de sustancias químicas, sobre todo, carbohidratos y grasas, para proporcionar la energía manteniendo así a los animales vivos, sanos y productivos. También se requiere de otras sustancias como proteínas, algunos lípidos y minerales como componentes básicos para el tejido corporal y los procesos naturales de mantenimiento del cuerpo, además de para la correcta producción de carne, huevos o leche [21].

La composición química de la mayoría de las materias primas utilizadas como fuentes de alimentación animal se puede encontrar en las tablas de composición química [22], las cuales pueden proporcionar una indicación amplia de cómo ese alimento puede adecuarse a los requisitos de un animal. Cuando un nuevo material o subproducto industrial atrae la atención como una fuente potencial de alimento animal, el análisis químico es prioritario, si bien, en fases posteriores, se debe realizar un ensayo de alimentación en el que el nuevo compuesto se incorpora a una dieta formulada para investigar la respuesta empírica del animal [23].

Las principales unidades de valoración en la alimentación animal y formulación de piensos son la composición en proteínas, fibras, lípidos, minerales y vitaminas, y el aporte energético de los mismos.

- **Proteína**

Mejorar la disponibilidad de proteínas y aminoácidos (AA) es un factor clave en las dietas de animales, todos los sistemas actualmente en uso coinciden en evaluar las necesidades de proteínas en proteínas metabolizables o digestibles [24,25], que es de hecho el porcentaje real de proteínas que puede utilizar el animal. Existen diversas maneras de determinar la digestibilidad proteica, ya sea con métodos *in vivo* o *in vitro* [26-28].

Las recomendaciones de proteína varían en función de la raza y objetivo de la cría del animal, sexo, estadio, etc. En general, los valores tanto para ruminantes como para monogástricos son alrededor del 13-18%, pudiendo aumentar estas necesidades hasta un 30% en terneros [29].

En cuanto a los cerdos y aves, no existen necesidades establecidas de proteína como tal, sino que se establecen valores de AA. Es común que estos valores no se conozcan a ciencia cierta, por lo que se establecen unos mínimos de proteína para asegurar así el aporte necesario de los aminoácidos esenciales (EAA) [30,31].

En acuicultura se recomienda que la proteína del pienso tenga un perfil de AA equilibrado [32]. La mayoría de los peces herbívoros y omnívoros requieren de 25-35% de proteína en su

dieta, mientras que los carnívoros requieren niveles más altos que van desde 40 al 55% de la dieta [33]. En la formulación de la dieta, se debe tener cuidado para asegurar que se cumplan los requisitos de las especies para los EAA, y mantener proporciones óptimas entre EAA y AA no esenciales (NEAA). Relaciones de 30:70 de esenciales y no esenciales afectan de manera negativa al rendimiento del crecimiento. Para un crecimiento adecuado, la proporción debe mantenerse dentro de 50-60% de EAA [34,35].

- **Lípidos**

Los lípidos aportan palatabilidad y valor energético a la formulación de piensos, mejorando los rendimientos productivos. Debe de tenerse en cuenta el tipo de grasa que se añade, si es más o menos insaturada y de cadena larga o corta, ya que esto puede afectar a la digestibilidad de los piensos o a su conservación [30]. De esta manera, cuando existe un exceso de aceites insaturados puede empeorar la digestibilidad y suponer un riesgo de enranciamiento del pienso si no se añaden estabilizadores. En rumiantes de leche, además, un exceso de grasa puede limitar el consumo de materia seca por lo que existen limitaciones en función del periodo de lactancia [36]. En porcino se proponen valores mínimos de entre 3-5,8% hasta un 9%, en rumiantes un máximo de 6,5% y en avicultura entre 2,8 hasta 6,5%. En el caso de la avicultura la cantidad recomendada de ácido linoleico (C18:2n-6) en los piensos de aves ponedoras para maximizar la puesta y el tamaño del huevo es de 1,10% del pienso [37-40].

En acuicultura, los lípidos son necesarios para aportar energía y ácidos grasos (AG) esenciales. Los peces, al igual que otros vertebrados, tienen requerimientos dietéticos de ácidos grasos poliinsaturados (n-3 y n-6) (PUFA), pero los requisitos específicos de AG esenciales son diferentes en especies marinas y de agua dulce. Las formas biológicas activas de los AG esenciales son el C20 y C22 derivados de los PUFA C18 [41]. Los peces de agua dulce pueden convertir el PUFA C18 en C20 o C22 mediante una serie de reacciones de elongación y desaturación de la cadena; por lo tanto, sus requisitos son cubiertos por los PUFA (C18:3n-3 y C18:2n-6). Por otro lado, los peces marinos no pueden realizar dicha conversión ya que carecen o tienen una expresión reducida de la enzima delta-5 desaturasa [42] o tienen una capacidad limitada de alargamiento de C18 a C20 [43]. De modo que los peces marinos tienen un requisito específico para EPA (C20:5n-3) y DHA (C22:6n-3).

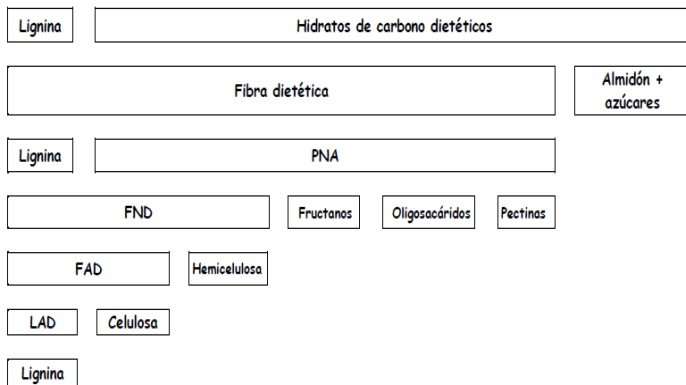


Figura 6. Representación de hidratos de carbono, fibra y PNS según el método de Van Soest. Figura obtenida de de Blas, Mateos [30].

sustancias potencialmente degradables, como la celulosa y la hemicelulosa y, finalmente, los componentes prácticamente indigestibles, como la lignina. La Figura 6 muestra más detalladamente esta clasificación de hidratos de carbono, fibra y polisacáridos no amiláceos (PNA). La FND es la fibra neutro detergente y está compuesta por hemicelulosa, celulosa y lignina; la FAD es la fibra ácido detergente y está compuesta por celulosa y lignina; y la LAD es la lignina ácido detergente y está compuesta por lignina [30].

Uno de los factores más importantes en las formulaciones de piensos en alimentación de rumiantes es el mantenimiento de la salud ruminal y la prevención de acidosis y timpanismo. Para ello es necesario mantener un equilibrio entre los carbohidratos no fibrosos (CNF) y los fibrosos o FND. La FND estimula la rumia, la secreción salivar y evita trastornos digestivos, pero debido al limitado aporte energético existen unos valores mínimos, ya que los máximos quedan autolimitados por las necesidad energéticas del animal [36,44]. Los CNF por su parte, son la fuente principal de energía de las bacterias ruminales y del animal, pero al ser altamente fermentables pueden causar acidosis y timpanismo, por lo que se establecen niveles máximos [45]. Los CNF están compuestos por almidones, azúcares y pectinas y pueden calcularse como:

$$CNF (\%) = \text{Extracto seco} (\%) - (\text{proteína bruta} (\%) + FND (\%) + \text{grasa} (\%) + \text{cenizas} (\%)) \text{ (eq. 1)}$$

La FND y, en general la presencia de fibra disminuye el valor energético del pienso, tanto de forma directa reduciendo el valor nutricional, como indirecta, influyendo en la disponibilidad

## • Fibra

La fibra presente en los alimentos y en sus descartes es de naturaleza heterogénea y puede clasificarse en diversos grupos. Estos grupos incluyen los componentes solubles fácilmente fermentables como los fructanos, gomas y pectinas; las

de otros nutrientes, rebajando la palatabilidad y, por ende, el consumo de piensos. Sin embargo, la presencia de fibra también ofrece aspectos positivos en las distintas especies; en general, la inclusión de fibra estimula la velocidad de tránsito digestivo en relación proporcional a su contenido en FND, y disminuye los estreñimientos y estereotipias [46]. La proporción de fibra fermentable está relacionada con el contenido de fibra soluble y el contenido de lignina. Ambas fibras tienen un efecto positivo en la salud gastrointestinal de los porcinos mediante mecanismos diferenciados, producción de ácidos grasos volátiles mediante fermentación en intestino grueso en el caso de la fibra fermentable, y mejora de la motilidad y funcionalidad de las paredes digestivas en el caso de la lignina.

Las tablas de nutrición animal incluyen valores mínimos y máximos de fibra bruta y FND, obteniendo un balance entre los efectos beneficiosos, sin comprometer la eficiencia nutricional del alimento. Los animales rumiantes en general tienen mayores necesidades de FND, desde un 10-15% en corderos, hasta un 40-45% en rumiantes de cebo. En porcino, las cantidades mínimas están alrededor de 15-19% [30,45] y en avicultura alrededor del 10-12,5% [31].

No se ha demostrado ningún requerimiento dietético de carbohidratos en peces; sin embargo, si los carbohidratos no se proporcionan en la dieta, un mayor porcentaje de proteínas y lípidos se catabolizarán para obtener energía. La capacidad de los peces para usar carbohidratos de la dieta con el fin de obtener energía varía considerablemente, y la mayoría de las especies carnívoras tienen una capacidad más limitada que las especies herbívoras u omnívoras. El total de carbohidratos solubles incluidos en las dietas preparadas para especies carnívoras es generalmente inferior al 20%, en cambio, las dietas para especies omnívoras generalmente contienen entre 25% y 40% de carbohidratos solubles. Por otro lado, los polisacáridos que no contienen almidón, como la celulosa, la hemicelulosa y la quitina, son indigestos para la mayoría de las especies de peces [33].

- **Minerales y vitaminas**

La cantidad de vitaminas y minerales recomendada en los piensos se establece como recomendaciones generales e incluyen un amplio margen de seguridad con el objetivo de cubrir las variaciones que puedan surgir entre los ingredientes utilizados para su elaboración. En el caso de los macrominerales, como calcio (Ca), potasio (K), fósforo (P), magnesio (Mg), sodio (Na) y cloro (Cl), su recomendación se considera teniendo en cuenta los aportes que se realizan por parte de los ingredientes que componen el pienso.

Las recomendaciones deben hacerse teniendo en cuenta las unidades de mineral absorbible, es decir, la disponibilidad del mineral aportado en los ingredientes, y no solo dependiendo del estado y nivel productivo del animal.

## 1.2 Principales subproductos a considerar

La Figura 7 muestra la producción de diversos grupos alimentarios, sus pérdidas y su uso en alimentación animal en Europa [47]. Los cereales son los que ocupan mayor producción con casi 500 millones de toneladas anuales, seguido de lácteos con 220 millones de toneladas y frutas y verduras con 170 millones. Las pérdidas asociadas a las frutas y verduras son mayores al resto de fracciones y suponen un 7% de su producción. El uso en alimentación animal en cambio es muy superior en los cereales donde supone la mitad de la producción. Las legumbres, raíces y lácteos son los que les siguen con una proporción del 42, 18 y 15% respectivamente. El uso en alimentación animal de frutas y verduras es, en cambio, considerablemente inferior con un 4,5%, debido a su alta humedad y mucho menor contenido proteico.

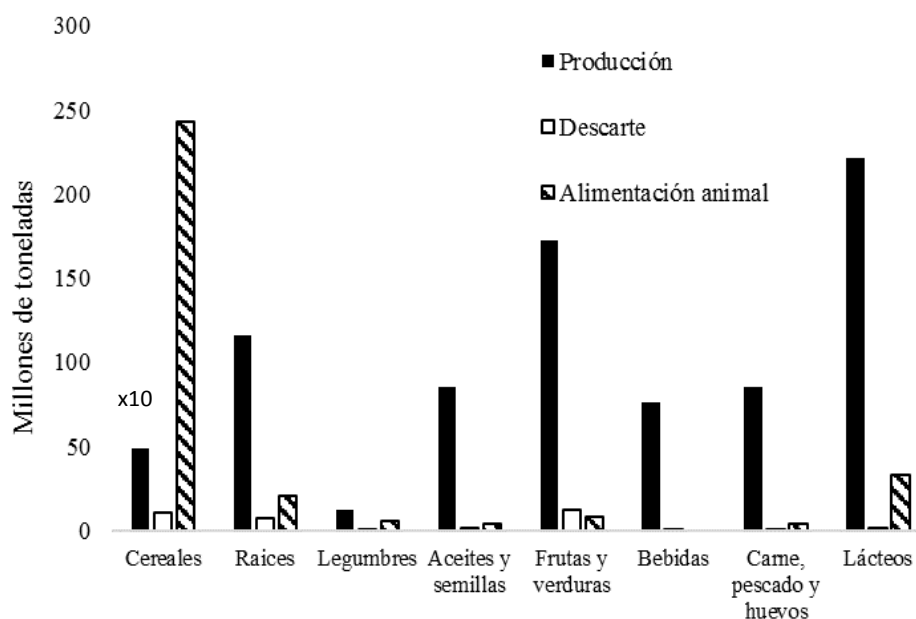


Figura 7. Producción, descarte y uso en alimentación animal de diversas fracciones alimentarias, año 2013 Europa. Figura propia, datos obtenidos de FAOSTAT [47].

### 1.2.1 Subproductos de la producción de frutas y verduras

Una gran cantidad de fracciones no consumidas de frutas y verduras y de la industria de procesamiento de frutas y verduras están disponibles en todo el mundo. La Figura 7 muestra



que, del total de alimentos no consumidos en Europa en el año 2013, las tasas más altas de descartes se concentran en los grupos de frutas y verduras.

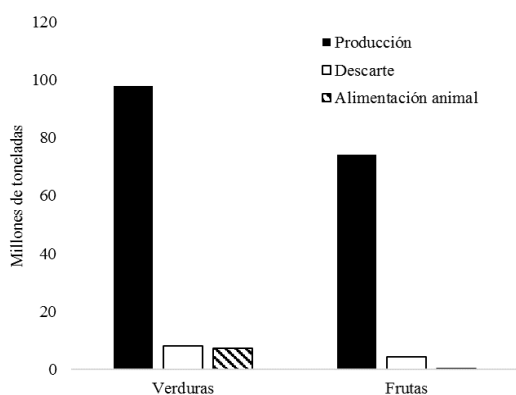


Figura 8. Producción, descarte y uso en alimentación animal de frutas y verduras en Europa. Figura propia, datos obtenidos de FAOSTAT [47].

En Europa se producen casi 98 millones de toneladas de verduras y 74 millones de toneladas de frutas y se generan 8 y 4 millones de toneladas de descartes respectivamente (Figura 8). Las cantidades destinadas a alimentación animal son mínimas, de 7 y 0,3 millones de toneladas respectivamente, especialmente bajas en el caso de las frutas.

La Figura 9 muestra la producción, descarte y uso alimentario de frutas y verduras en el año 2013 en España. El uso en alimentación animal difiere entre las dos fracciones siendo mayor la inclusión de verduras con alrededor del 2% de producción. La producción es mayor en la fracción de frutas que en verduras, aunque la parte no aprovechada en este último supone el doble que en frutas.

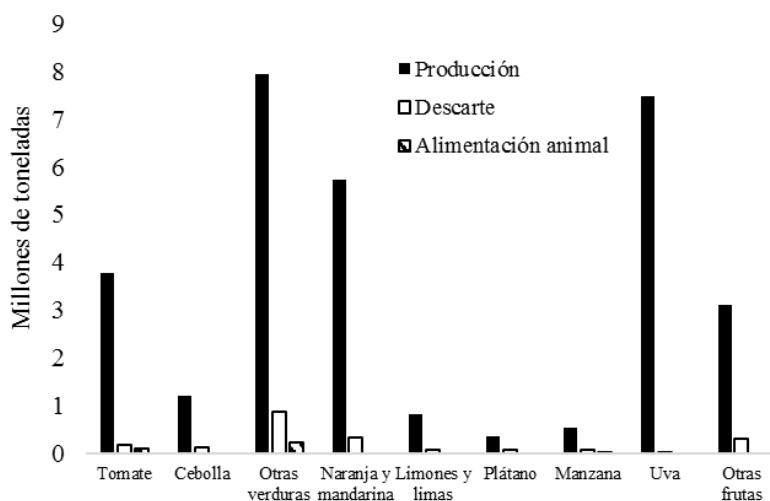


Figura 9. Producción, desperdicio y uso en alimentación animal de diversas frutas y verduras en España. Figura propia, datos obtenidos de FAOSTAT [47].

La situación a nivel europeo es similar a la que se observa en España. Se observa una elevada producción de frutas y verduras que supone una generación de descartes derivados tanto de su procesado en fresco como en conserva. Dependiendo del producto en concreto, el descarte puede ser entre el 5 y el 50% del total de producción, generando anualmente unos 2 millones de toneladas de descartes de frutas y verduras en España y 12 millones de toneladas en Europa.

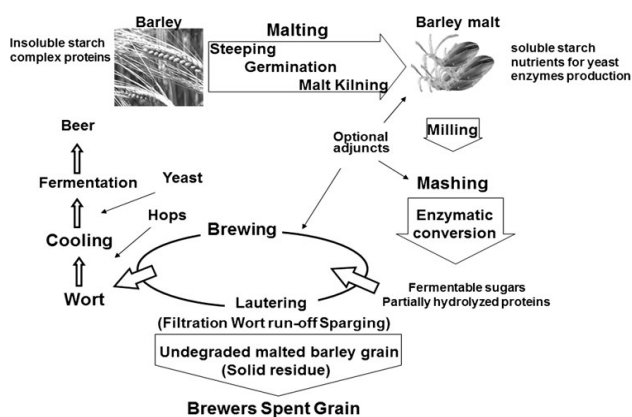
La mayoría de los desperdicios de frutas y verduras son altamente fermentables y perecederos, debido principalmente a su alta humedad (80-90%). Existen picos de producción de frutas y verduras con grandes cantidades disponibles, pero no pueden consumirse al mismo ritmo que se producen, debido al desajuste entre la generación, que es muy estacional, y la demanda para ganado que es constante. Por lo tanto, es necesario adoptar medidas para poder valorizar, estabilizar y almacenar estos subproductos para poder utilizarlos a lo largo del año de una manera competitiva y sostenible [7]. El principal impedimento para el uso de subproductos vegetales o frutícolas en alimentación animal de calidad es el escaso valor nutricional que presentan algunos de estos subproductos (bajo contenido en proteína), así como la baja digestibilidad o la presencia de posibles sustancias indeseables como agentes antinutricionales o micotoxinas.

En la actualidad, estos descartes son gestionados mayoritariamente como residuos, debido fundamentalmente a la inexistencia de una actividad de valorización integral y eficiente, causando así riesgos ambientales. Por otro lado, el empleo de estos descartes en alimentación directa de ganado encuentra cada día mayores problemas por aspectos relacionados con la logística y mantenimiento de las condiciones higiénicas, variabilidad en el suministro, en el aseguramiento de la recogida, etc. Esta situación genera inseguridad tanto para el productor del subproducto como para el ganadero, por lo que se precisan sistemas de procesado que permitan dar salida en continuo a estos subproductos y su transformación en una materia más homogénea que pueda garantizar su empleabilidad en alimentación animal.

Incluso en el caso de los subproductos recogidos por gestores, la transformación que se realiza con buena parte de ellos se limita a la producción de compost o ensilados con un bajo valor económico en el mercado. Otras alternativas de valorización que se aplican a los subproductos de frutas y verduras son la obtención de productos de valor añadido, tales como, extracción de aceites esenciales, polifenoles, compuestos anticancerígenos, pigmentos, enzimas y obtención de proteína microbiana mediante fermentación (SCP, single cell protein) [7]. Por otra parte, la obtención de ciertos compuestos de valor añadido presenta sin embargo problemas en la

mayoría de los casos ya que se genera un nuevo residuo a gestionar, debido que solo una parte del subproducto es aprovechado.

### 1.2.2 Subproductos de la industria cervecera: Bagazo de cerveza (BSG)



El bagazo de cerveza (Brewer's spent grain, BSG) es el principal subproducto del proceso de la elaboración de cerveza. La Figura 10 muestra el proceso clásico de elaboración de cerveza, que consiste en 6 etapas: malteado, molienda, macerado, obtención del mosto, enfriamiento y fermentación. Durante la conversión enzimática (macerado), el

Figura 10. Producción de cerveza y generación de residuos. Figura obtenida de Xiros, Christakopoulos [48].

almidón de la cebada pasa a azúcares fermentables (maltosa y maltotriosa) y no fermentables (dextrinas), las proteínas también se degradan parcialmente a polipéptidos y AA. Una vez finalizado este proceso se lleva a cabo una etapa de filtración, donde se obtiene el mosto compuesto por esos azúcares fermentables y se lleva a cabo la fermentación a etanol. La fracción sólida obtenida después de la filtración es el BSG [48].

La UE produce 416 millones de hl de cerveza al año en sus más de 6500 cervecerías [49]. El mayor volumen de desechos corresponde al bagazo de cerveza (80% de los subproductos sólidos totales), seguidos de la levadura de cerveza (BY) (10%). Dada la producción de cerveza de la UE en 2016, podemos estimar que se generaron más de 7 millones de toneladas de BSG (15-20 kg de BSG húmedo por 1 hl de cerveza) [50,51] y más de 0,8 millones de toneladas de BY (1,5-3 kg de BY por 1 hl de cerveza) .

A pesar de ser fácilmente disponible, el BSG recibe poca atención en la industria y es tradicionalmente usado en alimentación animal [52]. Sin embargo, debido al hecho de que está disponible a bajo costo o sin costo alguno durante el año y presenta valores nutricionales interesantes (20% de proteína y un 70% de fibra, entre otros) (Tabla 3), se considera una materia prima prometedora en la biotecnología, industria alimentaria y farmacéutica. Las proteínas del BSG y sus hidrolizados pueden usarse como potenciadores de la textura debido a sus propiedades emulsionantes [53] y pueden presentar efectos inmunomoduladores [54] y

actividad antimicrobiana [55]. Al mismo tiempo, contiene compuestos fenólicos (ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido cafeico) [56], los cuales le proporcionan capacidad antioxidante. Además de los componentes principales mencionados en la Tabla 3 el BSG es también una fuente valiosa de vitaminas (biotina, el ácido fólico, niacina, colina, riboflavina, tiamina, ácido pantoténico y la piridoxina), minerales (Ca, Cu, Fe, Mn, K y Na) y EAA como la lisina, histidina, metionina, fenilalanina y triptófano [57]. En los últimos años ha ganado atención debido a sus componentes bioactivos relacionados con la salud, entre los que se encuentran alcaloides, factores de crecimiento de las plantas, pigmentos de calidad alimentaria y los ya mencionados ácidos fenólicos [58].

Sin embargo, su compleja composición y su alto contenido de humedad (70%), dificulta su almacenamiento y transporte por lo que es necesario una tecnología económicamente viable para promover su valorización. Con el objetivo de aumentar la digestibilidad de sus proteínas, la liberación de péptidos funcionales y la liberación de compuestos fenólicos se ha aplicado el uso de enzimas para su hidrólisis [52,54] o la aplicación de la fermentación en estado sólido (SSF) [58] para su mejora nutricional y funcional.

Tabla 3. Variabilidad en la composición del BSG (% ES).

Proteína	Grasa	Cenizas	Almidón	Lignina	Celulosa	Hemicelulosa	Ref
21	10	5		20	20		[50]
26,7		3,3	1,0			22,5	[53]
	10,1	3,4	2,2				[59]
24	10,6	2,4		11,9	25,4	21,8	[60]
15,2		4,6		27,8	16,8	28,4	[61]
14,2	13,3	3,3		11,5	12	40,2	[62]
24,6		1,2		21,7	21,9	29,6	[63]
18	4,2	3,4					[64]

Los datos no mostrados no han sido determinados en las publicaciones referenciadas.

El suministro directo del BSG para la alimentación animal sin ningún tratamiento depende de muchos factores, que pueden limitar su viabilidad y, en muchos casos, pueden hacerlo insostenible. El alto contenido de humedad junto con su alta carga microbiana y la alta temperatura a la que se generan hace que su vida útil no exceda las 48 horas y, por otro lado, aunque el uso de estos subproductos para consumo humano o incluso con fines farmacéuticos y cosméticos podría ser una opción valiosa, se necesita una solución confiable para hacer frente a las fracciones no utilizadas generadas tras la extracción de los compuestos de interés [48]. Mantener la calidad y requisitos para su uso en las industrias alimentarias y piensos es

complicado, y su deshidratación es económicamente costosa. Sin embargo, hay una creciente presión para garantizar una solución económica y ambientalmente viable.

### **1.2.3 Subproductos de la industria quesera: Lactosuero**

Las industrias de procesamiento de lácteos y quesos generan grandes volúmenes de descartes líquidos incluido el lactosuero. El suero es la porción líquida producida tras la elaboración del queso, concretamente durante la coagulación de la caseína de la leche. La producción total mundial de suero se estima en 180-190 millones de toneladas al año [65], y la mayor parte de su producción se da en la UE y EE.UU., aproximadamente el 70% del total [66].

El lactosuero genera importantes problemas medioambientales debido a su gran volumen de producción y su alto contenido orgánico, siendo su demanda química de oxígeno (DQO) de aproximadamente entre 50-102 g/l [67]. El vertido del suero acarrea graves problemas de contaminación al afectar las características fisicoquímicas del suelo provocando una disminución en el rendimiento de los cultivos. Por lo tanto, una gestión adecuada, con un tratamiento o reutilización, es obligatorio antes de su eliminación.

Los factores responsables de la alta carga orgánica (y de su capacidad contaminante) son los nutrientes residuales como la lactosa (46,0–52,0 g/l), proteínas (6,0–10,0 g/l), lípidos (5,0 g/l) y vitaminas.

El lactosuero presenta una gran cantidad de nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos, considerados un recurso potencial para la obtención de productos de valor añadido. Se utilizan varias tecnologías para su valorización y, hoy en día, aproximadamente un 70% del suero es valorizado en forma de suero en polvo. Sin embargo, sigue habiendo una cantidad de suero considerable sin valorizar. Esta valorización se puede realizar mediante procesamiento directo y/o biotecnológico. La Figura 12 muestra los procesos propuestos por Yadav *et al.* [66] para la valorización del lactosuero.

El procesamiento directo, bien por tratamiento térmico o por físico, se utiliza para obtener suero en polvo, concentrado de proteína de suero, aislado de proteína de suero, permeado de suero, lactosa y otras fracciones. En el procesamiento biotecnológico el suero de leche se utiliza como sustrato para diversos procesos microbianos y obtener así productos finales de alto valor añadido, tales como, SCP, probióticos, ácidos orgánicos, enzimas, exopolisacáridos y bioplásticos [66-69]. La SCP se produce mediante fermentaciones con microorganismos que consuman lactosa y la proteína producida puede ser utilizada como alimento para animales o como fuente de proteínas para alimentación humana [70,71].

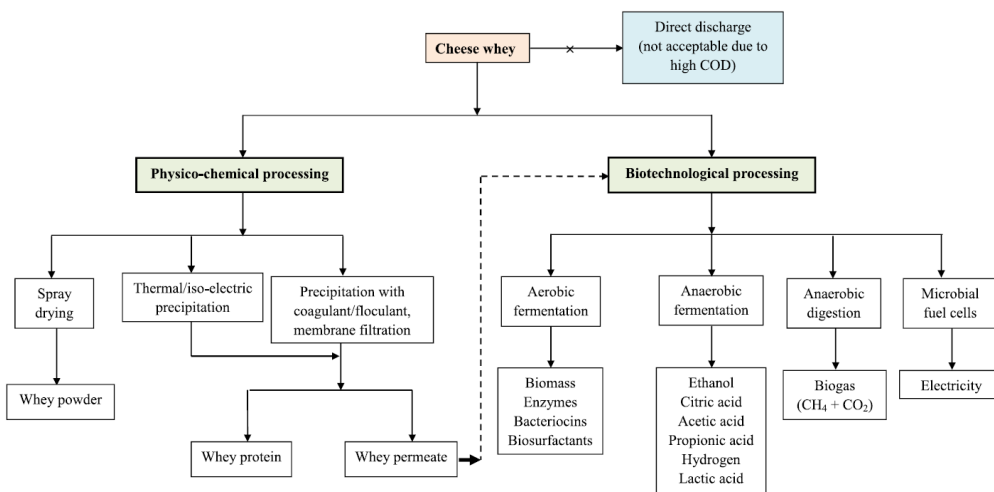


Figura 11. Tratamiento de lactosuero mediante técnicas fisicoquímicas y biotecnológicas. Figura obtenida de Yadav et al [66].

### 1.2.4 Subproducto de la industria de zumos: Melaza de naranja

La producción mundial de cítricos en 2016 fue cercana a 124 millones de toneladas, de las cuales casi 70 millones de toneladas fueron de naranjas. De esta producción se utilizaron más de 18 millones de toneladas de naranja para su procesamiento [72], sin embargo, tras la producción de zumo, aproximadamente el 50-60% de la naranja permanece como cáscaras, secciones de membrana y semillas [73], lo que requiere un procesamiento previo al tratamiento de desechos. La Figura 11 muestra el diagrama de flujo del procesado de zumos de naranja donde se puede apreciar la gran proporción de descartes generados en la misma.

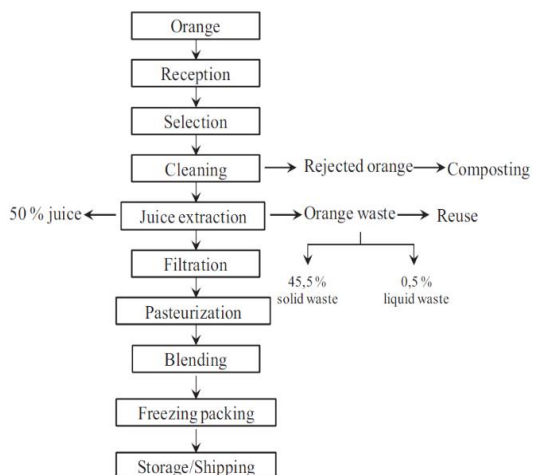


Figura 12. Diagrama de flujo de producción de zumo de naranja. Figura obtenida de Rezzadori et al [74].

En general, los residuos de naranja son ricos en azúcares solubles, celulosa, hemicelulosa, pectina y aceites esenciales que podrían ser materia prima de varios procesos industriales. La

aplicación actual de descartes sólidos derivados del procesamiento de cítricos está dirigida a alimentación de ganado o producción de bioenergía [74]. Sin embargo, y teniendo en cuenta la actual Directiva de Residuos 2018/851 (UE) [2], los procesos para la obtención de productos de valor añadido está en aumento [75]. Estos procesos incluyen la extracción de polifenoles, pigmentos, compuestos antimicrobianos y nanocelulosas entre otros. En los últimos años se intentan englobar todos los residuos generados dentro de un proceso de biorrefinería completo [74,76,77], como el desarrollado por Kantifedaki *et al.* [78] donde combinan procesos de fermentación sumergida (SmF) y SSF para la obtención de pigmentos (Figura 13).

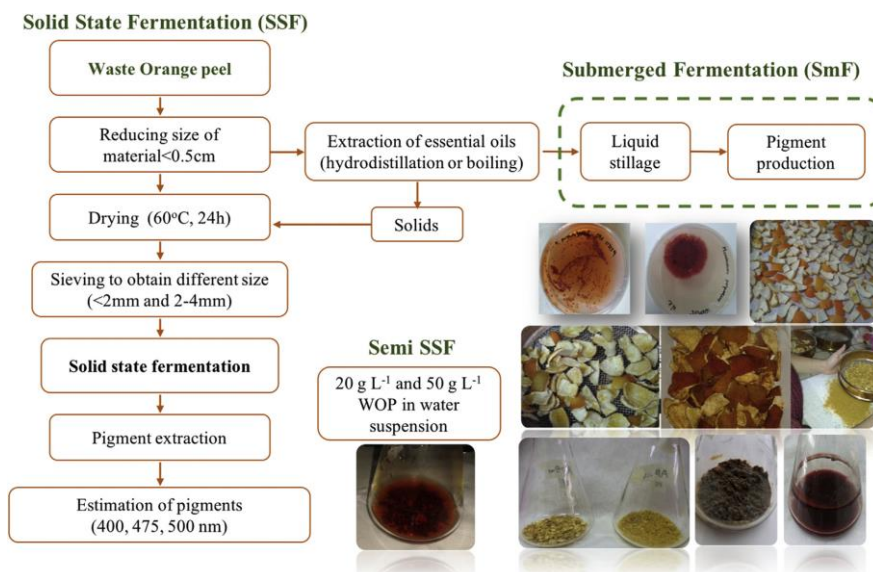


Figura 13. Esquema de biorrefinería para el aprovechamiento integral de las cáscaras de naranja. Figura obtenida de Kantifedaki *et al* [78].

La obtención de melazas cítricas se realiza en la industria aplicando un proceso de maceración con carbonato cálcico. Brevemente, las pieles y pulpas de cítricos que no se aprovechan para consumo directo son trituradas y tratadas con carbonato cálcico, lo que desestructura la matriz vegetal y libera gran parte de la humedad presente en la masa cítrica.

Este agua liberada se elimina por gravedad y los sólidos resultantes son procesados en una prensa de agotamiento progresivo, con lo que la extracción de la parte líquida es máxima. La fase líquida obtenida antes y después del prensado se combina y se conducen a los equipos evaporadores, en los cuales se elimina parte del agua. El producto final es una melaza concentrada de cítricos.

### 1.3 El agente transformador: Hongos *Zygomycetes*

#### 1.3.1 Generalidades



Figura 14. Clasificación de microorganismos con interés biotecnológico dentro de la clase *Zygomycetes*. Figura adaptada de Lennartsson [83].

El phylum *Zygomycota* es una división primitiva de hongos que incluye alrededor de 1000 especies. Las especies fúngicas que pertenecen a este linaje basal son caracterizadas por reproducción sexual a través de zigosporas y reproducción asexual por formación de esporangiosporas. El phylum *Zygomycota* se divide en dos clases, *Zygomycetes* y *Trichomycetes*. Los *Zygomycetes* abarcan una diversidad ecológica de clases de hongos, que incluyen hongos saprófitos patógenos de plantas, patógenos de animales y otros hongos [79].

Entre la clase *Zygomycetes* algunos de los hongos más conocidos son los del género *Rhizopus*, siendo *Rhizopus oryzae* el miembro más descrito del género [80]. El género *Rhizopus* pertenece al phylum: *Zygomycota*, clase: *Zygomycete*, orden: *Mucorales*, familia: *Mucoraceae*, género *Rhizopus*. Este género incluye 10 especies [81], entre las que destacan *R. oligosporus*, *R. microsporus*, *R. delemar*, *R. oryzae*, *R. microsporus* y *R. stolonifer*, algunas relacionadas con el deterioro de plantas como *R. stolonifer* y especies relacionadas con la producción de alimentos, como *R. oligosporus* y *R. oryzae* [82]. La Figura 14 muestra la clasificación centrándose en *Zygomycetes* [83].

#### 1.3.2 Género *Rhizopus*

*Rhizopus*, como otros miembros de *Mucorales*, es un moho ubicuo que se propaga por esporangiosporas hidrofóbicas que se dispersan fácilmente después de la maduración. Aunque se ha descrito un ciclo sexual para este género, la haploidía es su forma más estudiada, principalmente porque la germinación de zigosporas lleva meses y la tasa de germinación es errática. Las esporas asexuales se producen dentro de los esporangios y se liberan al madurar (Figura 15). En cultivos de 7 días, los esporangios intactos son raros y las estructuras que se



observan principalmente son las columnelas [84]. La primera descripción de este género fue *Rhizopus nigricans* [79] y, además, es uno de los géneros de hongos económicamente más importante.

*R. oryzae* se distribuye ampliamente en la naturaleza [85], con prevalencia en regiones subtropicales. Se ha aislado de varios sustratos incluyendo una gran variedad de suelos, vegetales en descomposición, frutas y semillas. Debido a su rápido crecimiento se le conoce como un colonizador primario, por su invasión rápida en sustratos ricos en azúcares simples. Ma *et al.* [86] encontraron un alto grado inusual de duplicación de genes en el genoma de *R. oryzae*, y concluyeron que se produjo un evento ancestral de duplicación del genoma completo, lo que les permite crecer bajo una amplia gama de condiciones adversas [87].

El género *Rhizopus* también está implicado en el deterioro de los alimentos, particularmente de los cultivos, causando enormes pérdidas económicas durante el almacenamiento y el transporte. *Rhizopus stolonifer* es un excelente ejemplo de la podredumbre blanda en frutas de hueso. También se sabe que algunas cepas de *Rhizopus* son patógenos oportunistas y pueden provocar cigomicosis en individuos inmunocomprometidos [80].

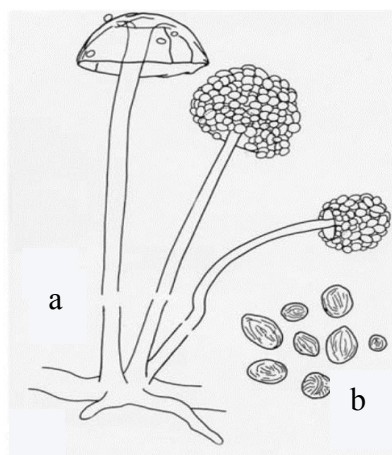


Figura 15. *Rhizopus oryzae* (a) esporangio y columnela (b) esporangiosporas. Figura obtenida de Pitt, Hocking [84].

### 1.3.3 Características metabólicas de *Rhizopus*

*Rhizopus* es conocido como primer colonizador de sustratos debido a su adaptación para utilizar carbohidratos fácilmente degradables como el almidón, la pectina y las hemicelulosas. Además, las especies del género *Rhizopus* pueden degradar la celulosa, aunque a un ritmo más lento que los hongos más agresivos.

Independientemente del sustrato y condición, casi todos los derivados del azúcar son canalizados a través del piruvato que es el centro del catabolismo de carbohidratos de *Rhizopus* (Figura 16) [80,88]. La excepción notable es el glicerol, que es producido durante condiciones de oxígeno limitado para retener el potencial redox de las células mientras se forma la biomasa. Normalmente, si el suministro de oxígeno es limitado, el piruvato será transformado en ácido

láctico o etanol, dependiendo de la cepa, que resulta en 2 mol de ATP por cada mol de hexosa. En estas condiciones, la fuente de carbono debe de proceder de hexosas o un compuesto fácilmente hidrolizable en hexosas. Por el contrario, si el oxígeno está presente, el piruvato formará acetil-CoA y entrará en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), produciendo el máximo de energía para las células (32 mol ATP) y la mayor producción de biomasa.

Las pentosas no son metabolizables por el hongo en condiciones anaeróbicas y su uso es limitado en condiciones de oxígeno limitado [80]. El ácido galacturónico es el principal componente estructural de la pectina. Su uso, al igual que el de las pentosas parece ser estrictamente aeróbico ya que su catabolismo implica múltiples portadores redox. Por lo tanto, para conservar el equilibrio redox y liberar energía, se requiere oxígeno.

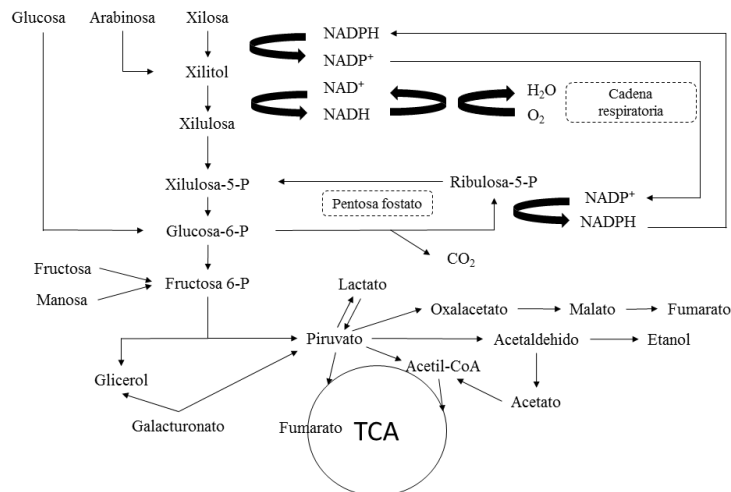


Figura 16. Visión general de las vías metabólicas de *Rhizopus*. Figura adaptada de Lennartsson et al [80], Maas et al [88].

En presencia de múltiples fuentes de carbono, *Rhizopus* utiliza las hexosas que son metabolizables incluso en condiciones anaerobias. Los dímeros de hexosa, como la celobiosa, también se utilizan fácilmente, seguido de las pentosas, estas últimas en condiciones aeróbicas.

### 1.3.4 Condiciones de cultivo

El género *Rhizopus* tiene gran interés para su aplicación en industria biotecnológica [85] gracias a sus pocas necesidades nutricionales, amplios intervalos de temperatura y pH de crecimiento (de 25 a 45 °C y de 4,5 a 7,5), y gran variedad de sustratos fermentativos y subproductos generados [18,80]. Durante la fermentación genera un amplio abanico de enzimas (amilasas, lipasas, proteasas, celulasas, pectinasas...) que permiten metabolizar gran

variedad de sustratos y producir un gran número de compuestos de interés debido a su variado metabolismo secundario [89].

Los requisitos de crecimiento pueden resumirse como una fuente de carbono, una de nitrógeno, una de fosfato, una de azufre y una de metales. *Rhizopus* puede crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, aunque el crecimiento aeróbico es preferido. Se han evaluado distintas fuentes de nitrógeno tanto orgánicas como inorgánicas para el crecimiento [64,90-92], aunque dependiendo del producto de interés las condiciones óptimas varían. Cuando se utilizan descartes agroindustriales para su crecimiento, en función de la composición, los nutrientes adicionales pueden ser o no, necesarios.

### 1.3.5 Ingeniería metabólica

El genoma completo de *Rhizopus oryzae* fue secuenciado en 2009 [86]. Las secuencias genéticas principalmente se han utilizado para estudios filogenéticos en un esfuerzo por determinar la relación entre diferentes especies de hongos.

Se han hecho varios intentos para manipular genéticamente a los hongos del género *Rhizopus*. Estas técnicas permiten la introducción de genes heterólogos, la sobreexpresión de genes homólogos, la anulación de vías de competencia existentes o la mutación al azar [87]. La mutación al azar es una herramienta poderosa para interrumpir la funcionalidad del gen o para aumentar la productividad de los procesos metabólicos y se ha aplicado en *R. oryzae* utilizando agentes químicos y físicos [93].

También se han publicado ejemplos de las mutaciones dirigidas con el objetivo de aumentar la producción de ácidos orgánicos mediante técnicas de sobreexpresión de genes [94-96] y la expresión de genes en otros microorganismos [97,98].

### 1.3.6 *Rhizopus* en alimentación humana

*R. oryzae* se ha utilizado desde hace siglos para la producción de tempeh, entre otros productos alimenticios, principalmente en el sudeste asiático. El tempeh es uno de los principales alimentos fermentados de la soja conocido por su sabor, textura y digestibilidad [99]. Estas propiedades son bien conocidas y las aplicaciones culinarias de *R. oryzae* han sido exploradas por otros investigadores para fermentar nueces, legumbres y frutas [100,101] o para la producción de vino de arroz [102]. La mayoría de estos investigadores describen modificaciones profundas en las características sensoriales, tanto en las visuales y de textura, como de sabor y aroma, relacionadas con el metabolismo secundario del hongo, que genera un gran número de compuestos sensoriales y nutricionales interesantes [89]. Además, las

características nutricionales también cambian durante la fermentación, ya que se liberan AA libres, compuestos nitrogenados, AG, vitaminas y minerales debido a la acción enzimática del hongo, lo que puede suponer una mejora nutricional. Ejemplos de estas modificaciones se describen ampliamente en la literatura [89,103,104].

### **1.3.7 Aspectos de seguridad sobre el uso de *Rhizopus oryzae***

La seguridad alimentaria es crítica cuando se considera el uso de aplicaciones para consumo humano y/o animal. *R. oryzae* se considera GRAS por la FDA por lo que puede usarse para la producción de alimentos de forma segura [105]. Sin embargo, no es considerado QPS (Qualified Presumption of Safety) por la EFSA (European Food Safety Authority). Según las evaluaciones de la JECFA (Evaluación de los riesgos asociados con las sustancias químicas) las carbohidrasas producidas por la fermentación controlada de *R. oryzae* pueden utilizarse como aditivos alimentarios [106].

Hasta la actualidad, no se ha publicado la producción de micotoxinas por parte de *R. oryzae* o *R. oligosporus* [101,107].

Actualmente, el género *Rhizopus* se ha utilizado, por un lado, como agente detoxificante contra toxinas alimentarias como la ocratoxina A [108] y las aflatoxinas B1, B2, M1, G1 y G2 [109-111] y por otro lado, con el objetivo de aumentar la digestibilidad de ciertas leguminosas [112]. Además, Suzuki *et al.* [113] identificaron un extracto acuoso del hongo *Rhizopus oryzae* U-1 con actividad anti proliferativa y capacidad de inducir apoptosis en una línea celular de leucemia promielocítica humana.

## **1.4 Proceso de biotransformación**

### **1.4.1 Fermentación, una alternativa muy real**

La obtención de materias primas y compuestos de valor a partir de subproductos alimentarios de manera eficiente y competitiva de cara a su aceptación por el mercado es uno de los principales objetivos y retos tecnológicos a los que se enfrenta la industria alimentaria y de valorización de residuos. En este sentido, existen numerosas experiencias y estudios que demuestran el elevado contenido de compuestos de valor en la mayoría de los subproductos desechados por la industria agroalimentaria [114-116].

Además de la extracción directa de los compuestos de valor presentes en los subproductos (fibras, antioxidantes, antimicrobianos, pectinas, pigmentos...), una alternativa que ha generado un creciente interés es el desarrollo de bioprocesos, que permiten la transformación

de los subproductos en compuestos o productos de valor añadido [116-119]. Los bioprocesos, basados tanto en fermentaciones sumergidas como en medio sólido, presentan un amplio campo de aplicaciones para la valorización de estos subproductos [120,121].

Dependiendo de los casos, el producto a obtener será la propia biomasa de microorganismos, el medio fermentado o un compuesto o compuestos presentes en dicho medio y que habrá que purificar mediante procesos de *down stream* (filtración, centrifugación, floculación, precipitación, absorción...).

La optimización y escalado de este tipo de procesos puede suponer el desarrollo de nuevas actividades de base biotecnológica, lo que permitirá un aprovechamiento de los subproductos y el suministro de materias primas y productos de valor añadido competitivos a sectores tan variados como la alimentación animal y humana, la cosmética, la farmacéutica o la industria química.

En el campo de la fermentación industrial, se diferencian claramente dos tipos de fermentación: la fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación en estado sumergido (SmF).

#### **1.4.2 Fermentación en estado sólido (SSF)**

La SSF se define como el bioproceso de fermentación llevado a cabo en medio sólido a baja actividad de agua ( $A_w$  0,6-0,9) pero siempre por encima de la necesaria para permitir el crecimiento y actividad metabólica del microorganismo. La matriz sólida puede ser la fuente de carbono y nutrientes, o también, un material de apoyo para el crecimiento del microorganismo al que se le añade un caldo de crecimiento [122]. La ventaja de la SSF es proporcionar a los microorganismos un entorno lo más parecido al hábitat natural y desde donde están aislados, siendo este uno de los principales factores por el cual se obtienen mayores rendimientos que en procesos de SmF [123]. Es además, un proceso de fermentación especialmente apropiado para hongos filamentosos, dada su capacidad especial para penetrar en la masa de los sólidos y debido a que permite una alta aireación [124].

Este proceso está cada vez más ligado al concepto de valorización de descartes o subproductos alimentarios [125] dado que el uso de subproductos agroindustriales como materia prima en los procesos de SSF aumenta el valor económico de los mismos al mismo tiempo que evita el gasto y el impacto ambiental de tener que eliminarlos [126-128].

Se observa una tendencia creciente al uso de esta tecnología en el campo de la biotecnología debido a su simplicidad y capacidad para realizar la bioconversión de sustratos sólidos de bajo

coste con mayores productividades en muchos de los casos en comparación con la tecnología de SmF [129-131], debido sobre todo a problemas de transferencia de masa por fenómenos reológicos en los medios de fermentación. Además, la SSF presenta una ventaja al no necesitar de procesos estrictamente estériles debido a la ausencia de una fase líquida que proporcione un mayor crecimiento de bacterias por contaminación.

Además de los beneficios ya señalados, la SSF requiere de pocos reactivos y/o nutrientes adicionales ya que el propio producto contiene normalmente los nutrientes necesarios para el proceso, y por lo general, requiere de bajo consumo de energía ya que la agitación y la esterilización no siempre son necesarias [132], es por ello que se presenta como un proceso con numerosas ventajas medioambientales [117].

A pesar de todas las ventajas mencionadas, los equipos de fermentación presentan una serie de complejidades al ser una tecnología en continuo estudio con desafíos por solucionar como: la transferencia de masa y calor, el escalado y el control operacional [125,133]. Además, el uso de sustratos naturales a menudo está limitado por su baja reproducibilidad y heterogeneidad, lo cual plantea problemas en los estudios de cinética y composición, los cuales son necesarios para el desarrollo óptimo de los biorreactores. Esta heterogeneidad también está relacionada con la porosidad, la cual puede provocar problemas de transferencia de calor [125].

Otro problema a tratar es la determinación de la biomasa producida, especialmente por hongos filamentosos los cuales generan una estrecha interacción entre micelio y sustrato [90,134].

Una vez seleccionados los dos componentes principales del proceso (el microorganismo y el sustrato), se debe estudiar la fisiología del microorganismo y los factores fisicoquímicos que son necesarios para su desarrollo óptimo, que incluyen humedad inicial, tamaño de partícula, pH, temperatura, composición de medios, esterilización, actividad de agua, densidad del inóculo, agitación, aireación y tratamiento del producto final. Estos deben optimizarse en base a experimentos de diseño factorial y superficie de respuesta para identificar los factores críticos y sus interacciones [123].

El estudio de transferencia de calor y masa son los aspectos más críticos del proceso y plantean un desafío a la hora de diseñar y escalar los procesos en estado sólido [135,136].

El número de tipo de biorreactores usados en la SSF a nivel piloto y/o industrial es reducido debido a diversas razones [137], tales como, la eliminación de calor generado en grandes volúmenes de sustrato, control de los parámetros de proceso (agitación, oxígeno y temperatura), naturaleza del sustrato y necesidad de un pretratamiento (esterilización,

inoculación) y control de los factores de manejo como el llenado, vaciado y limpieza del reactor. Los biorreactores pueden clasificarse teniendo en cuenta diversos factores, siendo habitual diferenciarlos teniendo en cuenta el mezclado del sustrato y la aireación del sustrato. De esta manera existen los fermentadores en bandeja, los fermentadores de lecho, fermentadores de aireación forzada y fermentadores con mezclado continuo o intermitente [125].

La **fermentación en bandejas** se ha utilizado tradicionalmente para la producción de alimentos fermentados como tempeh, miso, koji o salsa de soja en países asiáticos [99]. Las bandejas se apilan unas encima de otras a temperatura y humedad controlada y el escalado se logra aumentando la superficie de las mismas.

En los **fermentadores de lecho** la aireación forzada ayuda a la reposición de oxígeno y humedad sin necesidad de mezclado. Aun así, este sistema puede no ser adecuado para el crecimiento microbiano, sobre todo en hongos filamentosos.

Los **fermentadores de aireación forzada** emplean pulsaciones periódicas de aire a presión con el fin de obtener una mejora en la actividad microbiana y disminuir la heterogeneidad del proceso. Los ciclos repetidos simulan la acción de mezclado, con la ventaja de que no actúan como cortes y no destruyen así el micelio de los hongos y la actividad microbiana.

Los **reactores de tipo tambor rotatorio** (rotating drum biorreactor, RDB), se clasifican dentro de los reactores con mezclado continuo o intermitente. Estos reactores se componen de un contenedor en forma de tambor que consta de la pared del tambor, el espacio de cabeza y el sustrato. El aire se introduce por un extremo al espacio de cabeza y el biorreactor se puede girar de manera intermitente o continua para facilitar su mezcla mediante la acción de rotación del mismo tambor. También se puede utilizar una paleta cuando el tambor está montado en un eje central, con movimiento de este eje y manteniendo el tambor restante estático. En los reactores de tipo tambor, el espacio útil es de alrededor del 30% del volumen ya que una alta carga de sustrato deriva en un bajo rendimiento. Existen modelos útiles de predicción de transferencia de calor en este tipo de reactores [138], aunque muestran cierta dificultad de control de temperatura en altas cargas de sustrato. Estos proporcionan un mayor control sobre los factores de proceso en comparación con los fermentadores en bandeja y los de lecho, aunque también presentan dificultad con la esterilización, extracción de productos y tratamiento post-fermentación. Los diseños modulares patentados por Biococon Ltd [139] y

Novozyme [140] son prometedores en cuanto a la obtención de sistemas estancos para el conjunto del proceso.

En la **fermentación en lecho fluido** el sustrato y el microorganismo se mantienen constantemente en estado fluido por la acción del flujo ascendente de aire. Su aplicación es limitada y es además altamente energética, por lo que casi apenas hay estudios realizados hasta el momento [125].

Al igual que otros hongos filamentoso, *Rhizopus* sp. puede ser utilizado como agente transformador durante la SSF para fermentar desechos agroindustriales con el fin de obtener productos con mayor valor nutritivo, especialmente en contenido de proteínas y enzimas [141] mediante esta tecnología. El uso de estos desechos como las principales fuentes de carbono y energía para la producción de proteína microbiana (SCP) o fúngica (Fungal bioprotein, FBP) y compuestos aromáticos y antioxidantes [58,142,143] ha recibido una considerable atención en los últimos años debido al bajo coste de la materia prima [119]. El proceso de fermentación permite mejorar tanto la digestibilidad de los productos debido al gran rango de enzimas producidas por hongos del género *Rhizopus* (lipasas, amilasas, celulasas, proteasas...) las cuales van a ayudar al digerido de los nutrientes, cómo modificar su composición nutricional con un aumento notable en el contenido proteico [144,145] y mejorando el perfil aminoacídico de la mezcla [59]. Además, también aumenta la capacidad antioxidante de los productos fermentados [146,147]. Estas características pueden darle un valor añadido al producto final, lo que puede generar gran interés entre los productores de piensos.

Los ejemplos publicados a escala laboratorio mejoran el perfil nutricional (sobre todo proteico y graso), entre los que se encuentran la pulpa de manzana [148], el salvado de arroz [144,145] y desechos de mango [149]. En todos los casos hay aumento proteico significativo del orden de 50-80%, aunque apenas profundizan en el estudio del perfil aminoacídico y/o perfil graso, la composición de fibra, la digestibilidad proteica de los mismos y su adecuación y comparativa con las fuentes actuales de materias primas para piensos y/o alimentación humana.

#### **1.4.3 Fermentación sumergida (SmF)**

La SmF utiliza medios líquidos para el crecimiento de los microorganismos y/o la producción de compuestos de interés. En comparación con la SSF la posibilidad de controlar factores ambientales como temperatura, aireación y pH, es más sencilla, manteniendo más estable el



medio de crecimiento [134]. Aun así, existen diversas complicaciones a la hora de trabajar con hongos filamentosos en SmF debido a su morfología [150].

Los hongos filamentosos son microorganismos morfológicamente complejos, que exhiben diferentes formas estructurales a lo largo de sus ciclos de vida. La estructura vegetativa básica del crecimiento consiste en un filamento tubular conocido como hifa que se origina a partir de la germinación de una sola espora reproductiva. A medida que la hifa continúa creciendo, con frecuencia se ramifica repetidamente para formar una masa de filamentos de hifas denominada micelio. Cuando se cultivan en cultivos sumergidos, estos hongos exhiben diferentes formas morfológicas, que van desde filamentos miceliales, grumos y hasta masas miceliales densamente entrelazadas, denominadas gránulos o pellets [151,152]. En los biorreactores, los micelios filamentosos o agrupados pueden aumentar la viscosidad del medio, envolverse alrededor de los impulsores [83] y bloquear el transporte de nutrientes; lo cual puede llevar a una disminución en la eficiencia de producción. El crecimiento de hongos en forma de pellets se define como la morfología deseable para la fermentación industrial porque no solo reduce la viscosidad del medio o la posibilidad de enrollarse alrededor de los impulsores, sino que también permite la reutilización de la biomasa de hongos, mejora la reología del cultivo mediante una mayor transferencia de masa y oxígeno y reduce el consumo de energía para la aireación y agitación. Muchos factores como la agitación, los nutrientes del medio, el pH, los aditivos y el tamaño del inóculo influyen en la morfología de los hongos filamentosos, aunque a menudo el estudio de la formación de pellets de hongos se limita a nivel de una cepa individual [153,154].

*Rhizopus* puede utilizarse durante la SmF como agente valorizador dentro del programa de sostenibilidad de la industria alimentaria que genera grandes volúmenes de desechos con gran carga orgánica y que por lo tanto es necesario tratarlos antes de ser desechados. Estos subproductos pueden utilizarse como medio de crecimiento del hongo para disminuir la DQO y a su vez para la obtención de productos de valor añadido. El uso de estos desechos como fuentes principales de carbono y energía para la producción de SCP o FBP ha recibido mucha atención en los últimos años con el fin de mejorar el aspecto medioambiental de estos procesos y dar un valor añadido a los desechos líquidos de las industrias alimentarias. Esta práctica se ha estudiado con diversos hongos filamentosos como *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor indicus* y *Neurospora Intermedia* entre otros, con el objetivo de obtener diversos productos de interés como la propia biomasa del hongo como fuente de proteína, AA y quitosano, además de etanol y ácidos orgánicos. Entre los subproductos fermentados se

encuentran materiales lignocelulósicos, aguas residuales, vinaza y productos lácteos [105,155-162].

Tabla 4. Diferencias entre la fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación sumergida (SmF).

Parámetros	SSF	SmF
Ausencia de agua como disolvente	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menor tamaño de reactor</li> <li>- Menor posibilidad de contaminación</li> <li>- Ausencia de formación de espuma</li> <li>- Menores costes de tratamiento de efluentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grandes volúmenes de reactor</li> <li>- Aw elevadas con mayor riesgo de contaminación</li> <li>- Posibilidad de formación de espuma y mayores costes en tratamiento de efluentes</li> </ul>
Sustrato de fermentación	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajo coste</li> <li>- Mínima necesidad de suplementación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A veces requiere el uso de productos químicos, generando mayor coste</li> </ul>
Adaptación del hongo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La naturaleza sólida del medio se asemeja a la propia del microorganismo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No es el hábitat natural del hongo</li> </ul>
Productividad	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citada como mayor en varios estudios</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menor productividad cuando se utilizan hongos</li> </ul>
Procesos downstream	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayor simplicidad debido a que el producto está más concentrado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayores costes por la purificación y concentración del producto final</li> </ul>
Aspectos medioambientales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El uso de desechos orgánicos como sustrato ayuda al control del desperdicio alimentario</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En caso de necesitar complemento sintético, mayor impacto ambiental</li> </ul>
Escalado	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Caro y complejo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Comparativamente sencillo y barato</li> </ul>
Control de las variables del proceso	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Difícil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fácil</li> </ul>

Tabla de elaboración propia, en parte adaptada de Nigam, Pandey [163], Arora *et al.* [125].

## 1.5 Productos de interés a partir de *Rhizopus*

El género *Rhizopus* es un conocido productor de diversos metabolitos con una gran importancia en la industria alimentaria y química. Los ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido fumárico), enzimas (celulasas, pectinasas, amilasas ...), ésteres, alcoholes, compuestos volátiles, FBP y productos nutricionalmente enriquecidos pueden producirse mediante la fermentación de *Rhizopus* utilizando diversas fuentes de carbono [164-176].

La Figura 17 muestra un mapa sobre el esquema de biorrefinería basada en productos fermentables por *Rhizopus* y los productos derivados de la fermentación [177].

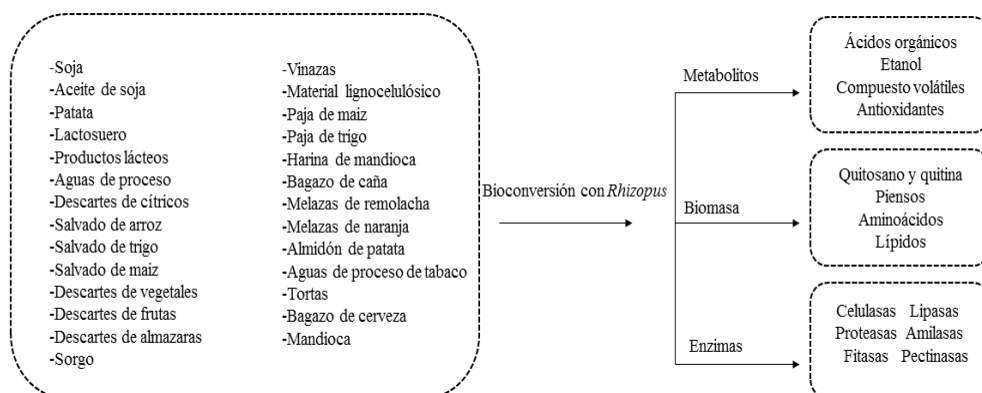


Figura 17. Esquema general de una biorrefinería basada en *Rhizopus*, que ilustra las alternativas de materia prima, así como las opciones de productos obtenidos, incluidos metabolitos, enzimas y posibles aplicaciones de la biomasa. Figura adaptada de Ferreira et al [177].

### 1.5.1 Ácidos orgánicos

La producción de ácidos orgánicos es una de las aplicaciones más estudiadas y conocidas del género *Rhizopus*. Durante la glucólisis, todas las fuentes de carbono fermentables se metabolizan a piruvato y se distribuyen posteriormente en las vías que conducen a la formación de L - (+) - ácido láctico, ácido fumárico y etanol [87,178] (Figura 16).

Los ácidos orgánicos láctico, fumárico y málico son los de mayor producción por parte de *Rhizopus* sp [179]. El ácido fumárico es comúnmente utilizado como acidulante e ingrediente en bebidas, el ácido láctico se utiliza como acidulante, aromatizante y conservante en la industria de la alimentación, aunque también se utiliza en la industria farmacéutica [88] y el ácido málico se utiliza como aditivo alimentario.

Las cepas de *Rhizopus oryzae* han sido clasificadas en dos grupos, productoras de ácido láctico y productoras de ácido fumárico y málico [180], donde las cepas productoras de fumárico no producen ácido láctico, debido a la ausencia del gen *ldh* responsable de su producción. En cambio, las cepas productoras de ácido láctico no liberan ácido fumárico, si bien lo utilizan como intermediario del ciclo TCA (Figura 16).

Diversos estudios han optimizado los procesos de producción de ácidos orgánicos a partir de subproductos de la industria alimentaria, utilizando la SmF a partir de almidón de patata [91],

cascarilla de trigo [181], cascarilla de maíz [176] o subproductos de la industria de zumos de manzana [182], además del uso de ingeniería genética para aumentar su producción, ya sea por mutaciones al azar [183,184] o por mutaciones dirigidas [94].

Uno de los factores más importantes para promover la producción de ácidos orgánicos en *R. oryzae* es una proporción alta de C:N (120: 1- 150: 1) [185]. Agregar un agente neutralizante como el carbonato cálcico y mantener un alto nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación, también son estrategias posibles para mejorar el rendimiento [186-188]. Niveles altos de oxígeno limitan la cantidad de etanol producido y, por lo tanto, conducen a mayores rendimientos de ácidos orgánicos, obteniéndose rendimientos de hasta 0,9 g de láctico/g de azúcar y 0,85 g de fumárico/g azúcar en condiciones óptimas [80].

El aumento de la viscosidad del medio y la disminución del pH durante el proceso de fermentación hace que la producción de ácidos orgánicos disminuya [189,190], debido a una inhibición del hongo. Con el objetivo de mejorar estas condiciones se han planteado soluciones para inmovilizar las cepas *Rhizopus* durante el proceso de fermentación para evitar un aumento de viscosidad del medio [191,192] y el uso de procesos de fermentación extractiva como alternativa a la adición de sales alcalinas para el mantenimiento del pH [193].

### **1.5.2 Fungal bio-protein (FBP)**

A las células secas de los microorganismos (algas, bacterias y hongos) para su uso como alimento o pienso se les conoce como “single cell protein” (SCP). En el caso de hongos también se utiliza el término “fungal bio-protein” (FBP) [194]. Estos productos son ricos en proteína y es por ello que podrían utilizarse como suplementos de la dieta humana o animal [195]. Los hongos filamentosos son ricos en vitaminas del grupo B y aportan un porcentaje elevado de proteína (30-70%) mientras que el aporte de ácidos nucleicos no es muy elevado (9,7%) en comparación con otros microorganismos [196]. Además aportan un perfil aminoacídico de acuerdo a lo aconsejado por la FAO [197], una fácil separación del medio y sabor y olor agradable [155].

Siguiendo lo publicado por Upadhyaya *et al.* [194], los microorganismos utilizados con esta finalidad deberían de poseer las siguientes características.

- Gran afinidad al sustrato.
- Requerimientos nutricionales bajos.
- Habilidad para utilizar sustratos complejos.

- Habilidad para obtener gran densidad de biomasa.
- Capacidad para una multiplicación estable.
- Capacidad para modificaciones genéticas.
- Buena tolerancia a cambios de temperatura y pH.
- Composición equilibrada de proteínas y lípidos.
- Bajo contenido en ácidos nucleicos, buena digestibilidad y que no produzca compuestos tóxicos.

Teniendo en cuenta todas las características mencionadas y los aspectos destacados en el apartado anterior, *R. oryzae* puede considerarse un buen candidato para la producción de FBP. Además, hasta ahora no se ha descrito producción de micotoxinas por parte de esta especie.

La biomasa de hongos comestibles puede ser utilizada como fuente de proteínas alternativa a la proteína animal o a otros ingredientes vegetales habitualmente utilizados en piensos para acuicultura y ganado como la soja, el trigo o el maíz, ya que pueden llegar a presentar un contenido de proteínas en torno al 30-70% [105,155,156].

El valor alimenticio y la utilidad depende del contenido de nutrientes y la composición de la biomasa obtenida. Los componentes principales son proteínas, carbohidratos, AG, componentes de la pared celular, ácidos nucleicos y vitaminas y la composición de la proteína siempre debe ser analizada [196].

La biomasa de *Rhizopus* ya ha sido testada como sustitutivo de harina de pescado en alimentación de peces [198,199], donde se han obtenido respuestas fisiológicas similares y buenas tasas de crecimiento en comparación con la alimentación a base de harina de pescado. Por lo tanto, la biomasa de *Rhizopus* podría presentar una alternativa a las grandes cantidades de harina de pescado necesarias para la acuicultura.

### 1.5.3 Quitosano y quitina

La quitina es un polisacárido ( $\beta$ -(1,4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranos) donde cada residuo individual es *N*-acetil-D -glucosamina, y se utiliza como agente coagulante en el tratamiento de agua, agentes de revestimiento de semillas de plantas en agricultura y para formación de biomateriales en biomedicina [173].

El quitosano es un polisacárido hidrofílico lineal compuesto de cadenas de glucosamina  $\beta$ - 1,4- D con menor grado de acetilación que la quitina (<30-40%). Se produce

por desacetilación de la quitina que se encuentra en el exoesqueleto de algunos crustáceos e insectos, aunque también puede aislarse de la pared celular de los hongos *Zygomycetes* [200] ya que presenta funciones protectoras y de soporte en las paredes celulares de los *Zygomycetes* [201]. El quitosano tiene muchas más aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, propiedades formadoras de película y quelantes, junto con su actividad antimicrobiana [174].

El uso de hongos filamentosos para la producción de quitosano mediante SmF de diversos subproductos agroindustriales ha sido ampliamente estudiado. Entre los subproductos encontramos lactosuero [70,71], paja de maíz [174], descartes de manzana [202] y descartes de cítricos [203] entre otros.

#### **1.5.4 Péptidos bioactivos**

Los péptidos bioactivos son definidos como fragmentos de proteínas específicas que ejercen una función reguladora en el organismo humano, resultando en un impacto positivo en las funciones biológicas y en la salud [204]. Los péptidos bioactivos tienen un amplio espectro de funciones biológicas y pueden clasificarse como antimicrobianos, antitrombóticos, antihipertensivos, opioides, inmunomoduladores, antitumorales y antioxidantes, entre otros [205-207]. Estas funciones están asociadas a ciertos péptidos, con un tamaño de entre 2 a 20 AA y pesos moleculares menores de 6000 Da [208].

El interés por alimentos funcionales con un efecto positivo en la salud está aumentando notablemente, es por ello, que existen infinidad de estudios científicos sobre la obtención y caracterización de péptidos activos derivados tanto de proteínas de origen animal como vegetal [209,210].

Muchos alimentos pueden ser fuentes potenciales de estos péptidos bioactivos, pero no son funcionales debido a que se encuentran como parte de la secuencia proteica y resultan de la hidrólisis que se da durante el procesamiento de los alimentos, como por ejemplo la fermentación [211-214], o mediante el uso de enzimas comerciales [215,216].

El uso de compuestos antioxidantes y antibacterianos es de vital importancia en la industria alimentaria para poder preservar los alimentos por más tiempo, sin embargo, el uso de compuestos sintéticos está limitado por su posible efecto adverso [217]. En consecuencia, muchos investigadores están buscando antioxidantes naturales en los alimentos que puedan retardar su deterioro.

Numerosos estudios han analizado las propiedades antioxidantes de hidrolizados enzimáticos de diversas fuentes de proteína vegetal, como el salvado de arroz, la semilla de cáñamo, la soja, semilla de lino, semilla de girasol, cebada, avena y la proteína de microalgas entre otros [209,217], utilizando enzimas comerciales como pepsinas, pancreatinas, alcalasas y tripsinas. Además, se han determinado actividades antioxidantes y antimicrobianas en diversos extractos de setas [218].

Existen diferentes factores que afectan la actividad antioxidante de los hidrolizados, como el peso molecular, la concentración, el grado de hidrólisis (GH) y la composición de AA. A diferencia de los péptidos con actividad antihipertensiva, las propiedades antioxidantes también son comunes en las proteínas y no solo se limitan a los péptidos [217].

Una de las maneras de obtener nuevas moléculas activas puede ser mediante la fermentación microbiana de diversos subproductos ricos en proteínas. *Rhizopus* sp. es conocido productor de proteasas extracelulares [219,220] de tal manera que su acción fermentativa podría producir péptidos bioactivos de interés. Existen diversos estudios sobre el efecto de la SSF en la liberación de compuestos bioactivos debido al efecto de las proteasas producidas por el propio hongo [213]. En concreto, Meinlschmidt *et al.* [212] mostraron propiedades inmunológicas, sensoriales y fisicoquímicas de las proteínas de soja fermentada por *R. oryzae*.

Además, la biomasa de *Rhizopus* sp. al ser rica en proteína (30-60%) puede ser sometida a un proceso de extracción proteica para poder así obtener un concentrado proteico y someterlo a la acción de enzimas para la liberación de posibles péptidos bioactivos [215].

### 1.5.5 Enzimas

Dada la gran diversidad metabólica de los hongos del género *Rhizopus*, estos organismos se han usado ampliamente para la producción de varias enzimas industriales, principalmente hidrolasas (E.C. 3)

Así, las especies de *Rhizopus* son conocidas por ser capaces de utilizar el almidón como fuente de carbono debido a la producción de enzimas amilasas, entre ellas la  $\alpha$ -amilasa, isoamilasa y glucoamilasa. El uso comercial de *Rhizopus* para la producción de amilasas [221-223] es de gran interés en la industria alimentaria para la producción de glucosa y jarabe de glucosa.

También es conocida la habilidad de degradar pectinas [224-228]. Estos heteropolisacáridos complejos formados por una cadena de ácido galacturónico unido por enlaces de  $\alpha$ -1,4 y monómeros de azúcar son constituyentes de las paredes celulares de las plantas por lo que las pectinasas se usan para aumentar el rendimiento y clarificación de los zumos.

Otro polisacárido de las paredes celulares de las plantas es la celulosa. El complejo de enzimas celulasas necesaria para la hidrólisis completa de la celulosa está compuesto por tres enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -D-glucosidasas. Diversos estudios se han centrado en la producción de este tipo de celulasas por parte de *Rhizopus* [229-233].

Otra de las enzimas con gran interés en el sector agroalimentario son las fitasas. La fitasa es una enzima importante en la industria de alimentos o piensos porque cataliza la hidrólisis del fitato, un compuesto antinutricional presente en cereales, granos y plantas, eliminando así la necesidad de un suministro adicional de nutrientes y proporcionando y aumentando la biodisponibilidad del fósforo y otros suplementos vitales presentes en los alimentos [234]. Diferentes publicaciones describen la utilización de *Rhizopus* en el sector de piensos [235-241].

Teniendo en cuenta el uso de *Rhizopus oryzae* en la producción de alimentos proteicos y su habilidad para mejorar la digestibilidad como en el caso del tempeh [242], no cabe duda de que es un gran productor de proteasas [243-248]. Las proteasas son de gran interés debido a su variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica [243].

Las lipasas tienen una gran importancia en la industria debido a su amplio espectro de especificidad de sustrato. Pertenecen a un grupo de enzimas hidrolíticas cuya función es catalizar la hidrólisis de los triglicéridos en AG libres, glicerol y mono y diacilgliceroles. Sin embargo, en solventes no acuosos, estas enzimas son capaces de sintetizar enlaces éster, que facilitan la transesterificación de los triglicéridos [249,250]. Las lipasas son biocatalizadores versátiles en la industria farmacéutica, de alimentos, biocombustibles, cosméticos, detergentes, cuero, textiles y papel [251]. De gran interés es la producción de lipasas comerciales mediante hongos, entre los cuales se encuentra *Rhizopus* [252-257].

### **1.5.6 Antioxidantes**

Diferentes extractos de plantas y cereales contienen moléculas con capacidad antioxidante que reducen los radicales libres, incluidos los compuestos fenólicos. Sin embargo, la mayoría de los compuestos fenólicos están unidos a los polisacáridos de la pared celular por lo que su biodisponibilidad es escasa [258,259], por lo que las enzimas (celulasas, pectinasas y  $\alpha$ -amilasas entre otras) producidas por microorganismos pueden liberar compuestos fenólicos ligados a la matriz de plantas y cereales y, de esta manera, aumentar la capacidad antioxidante de los alimentos o subproductos de la industria alimentaria [147].



En los últimos años ha ganado interés el uso de la SSF de subproductos agroindustriales para la liberación de estos compuestos con capacidad antioxidante mediante la acción de enzimas producidas por hongos filamentosos [260] con el objetivo de aumentar el valor de los subproductos. Entre los subproductos estudiados se encuentran el bagazo de cerveza, el salvado de arroz y diversas plantas [59,260-263].

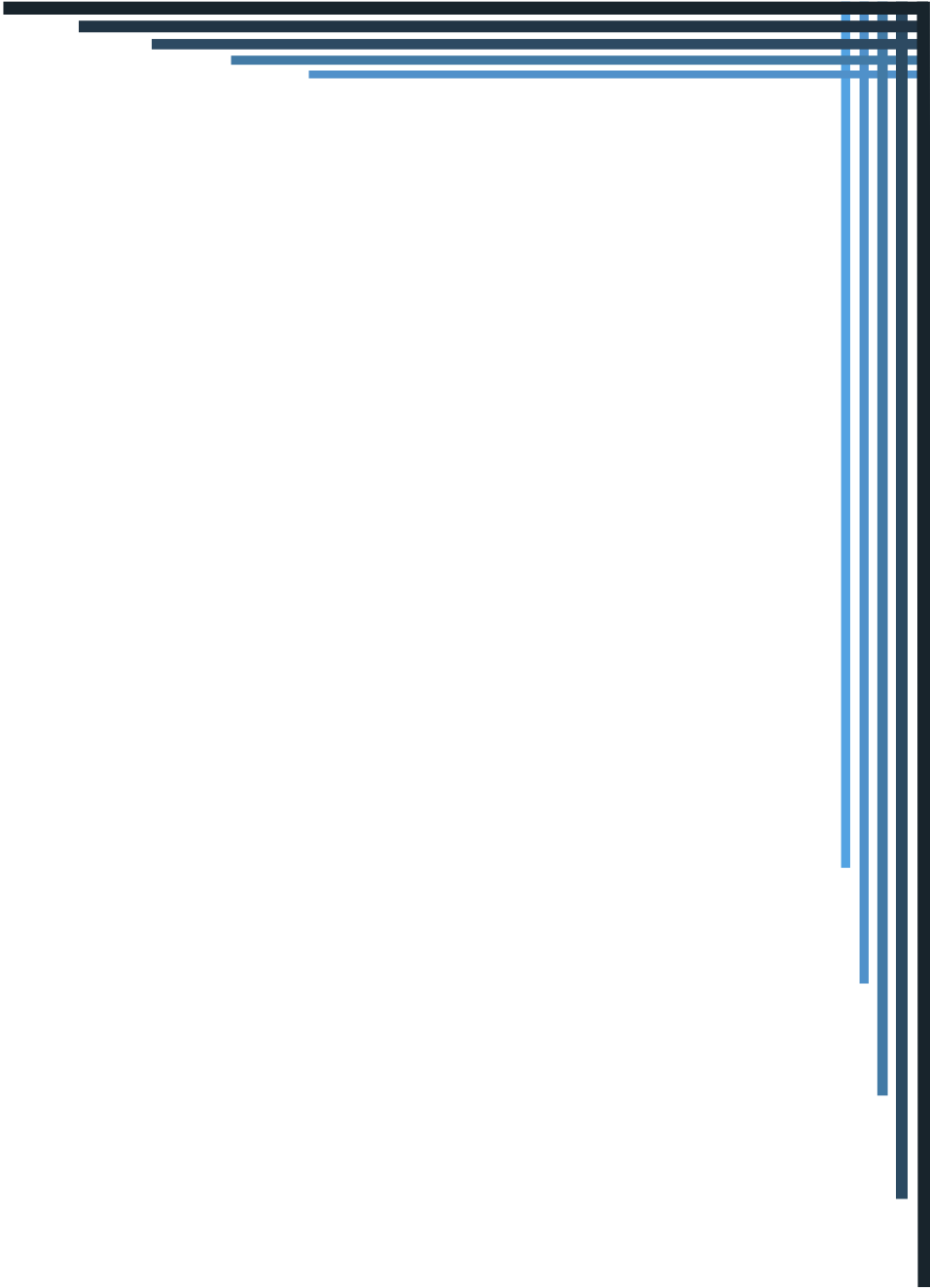
### **1.5.7 Otros**

El uso de *Rhizopus oryzae* se ha estudiado también para la producción de aromas y etanol mediante SSF y SmF. Entre los trabajos cabe destacar la producción de aromas mediante SSF de diversos descartes agroindustriales, soja, grano de amaranto y aceite de soja [169,264] y en residuos de las almazaras [265].

La capacidad de *Rhizopus* para producir etanol en condiciones de oxígeno limitado [266,267] se ha aprovechado con diferentes subproductos agroindustriales como pulpa de mandioca, residuos de la industria del papel y la madera, paja de arroz y descartes de cítricos [203,268-272].



## 2. OBJETIVOS





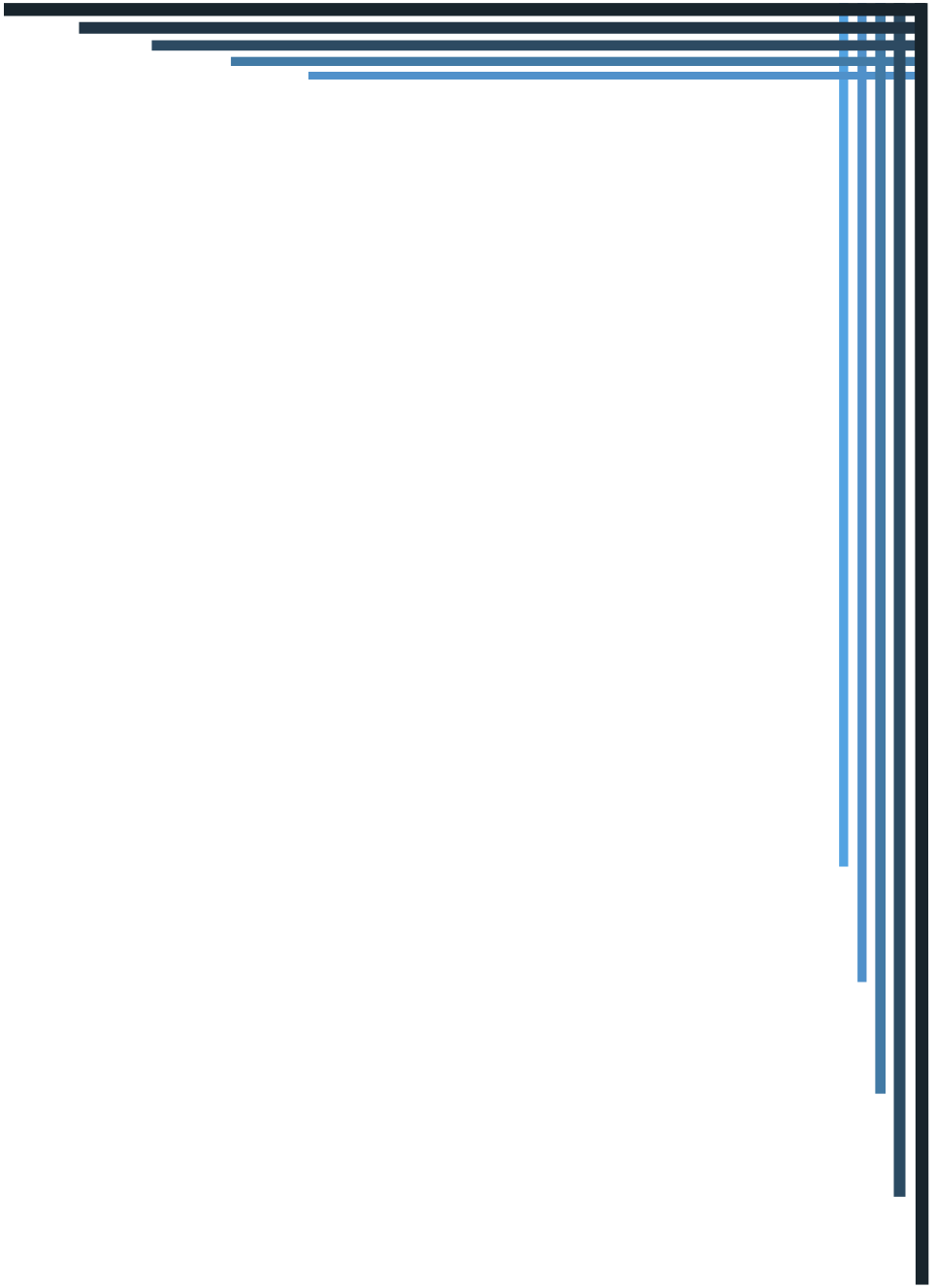
Dentro de una estrategia general de disminuir el impacto ambiental y económico debido al tratamiento de residuos de la industria alimentaria, se pretende generar productos de interés que aporten ingresos económicos en la cadena alimentaria y estén destinados como materias primas para piensos y/o alimentación humana. Así pues, el objetivo general de esta tesis es desarrollar procesos biotecnológicos mediante fermentaciones con el hongo filamentoso *Rhizopus* sp. que permitan la valorización integral de diversos subproductos de la industria alimentaria y la generación de compuestos de alto valor.

Para la consecución de este objetivo se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar e identificar cepas ambientales de *Rhizopus* sp., caracterizando y mejorando si es posible, sus capacidades metabólicas para la producción de ácidos orgánicos, biomasa y proteína.
2. Desarrollar modelos de crecimiento y optimizar las condiciones de crecimiento y producción de proteína durante la fermentación en estado sólido utilizando sustratos modelo y subproductos de la industria alimentaria.
3. Desarrollar modelos de crecimiento y optimizar las condiciones de crecimiento y producción de proteína durante la fermentación sumergida utilizando sustratos modelo y subproductos de la industria alimentaria.
4. Obtener biomasas fúngicas y harinas con alto valor nutricional para su uso en alimentación humana y/o animal, incluidos hidrolizados de proteína con bio-actividades de interés.
5. Proponer un pre-escalado y estimar la viabilidad técnico-económica preliminar del proceso de fermentación en estado sólido.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS







### 3.1 Subproductos utilizados

Durante la elaboración de los trabajos presentados en esta tesis se ha utilizado una gran diversidad de subproductos. La Tabla 5 resume los subproductos y los apartados de resultados y discusión donde son utilizados como sustratos.

*Tabla 5. Resumen de subproductos y apartados de resultados y discusión en los que son utilizados como sustrato.*

Ingrediente	Apartado (s)
Peladuras de patatas	4.2
Frutas	4.2
Alperujo	4.2
Posos de café	4.2
Lactosuero	4.3
Melaza de naranja	4.3
Bagazo de cerveza (BSG)	4.4 y 4.6
Mix frutas y verduras modelo	4.5
Mix real frutas y verduras	4.5 y 4.6
Mezcla de ensilado	4.6

Las peladuras de patata fueron suministradas por Natuber S.L (Vitoria, España) como resultado del proceso de producción comercial de patatas fritas. Se almacenaron a -18 °C en las instalaciones de AZTI y justo antes de su uso, se blanquearon a 98-100 °C durante 1 minuto.

Las manzanas, peras y naranjas fueron proporcionadas por tiendas locales. Se trituraron durante 4 minutos a baja potencia y alta temperatura en una Thermomix (Vorwerk, Alemania) hasta obtener un puré. La temperatura máxima durante la mezcla fue entre 85-93 °C. La cáscara de naranja se cortó en trozos de 1 mm (aprox.) mediante un tratamiento similar, pero sin aumento de temperatura. Las muestras se almacenaron a -18 °C hasta su uso. Justo antes de su uso se descongelaron en un baño de agua a 45 °C hasta su total descongelación.

El alperujo se recolectó tras la campaña de extracción de aceite de 2011 de la Cooperativa La Milagrosa De Monterrubio (Monterrubio de la Serena, España). La muestra se almacenó a -18°C hasta su utilización y se descongeló justo antes de usarla a 4 °C durante 24 h. Después de la descongelación, las muestras se diluyeron agregando agua destilada hirviendo en una proporción de 1:2 (peso agua/peso sustrato) y se ajustó el pH a pH =6,5 con NaOH 1 M.

Los posos de café fueron proporcionados por el gestor de residuos Ekogras (Etxarri-Aranaz, España) y se congelaron a -18 °C hasta su uso. Se descongelaron justo antes de usarlos a 4 °C

durante 24 h. Después de la descongelación, las muestras se diluyeron agregando agua destilada hirviendo en una proporción de 2:1 (peso agua/peso sustrato) y se ajustó el pH a pH=6,5 con NaOH 1M.

La muestra de lactosuero vacuno se obtuvo de una fábrica de quesos comercial (Vascolac S.L. Zamudio, España) y se almacenó a -18 °C en bidones de 5 litros. Se descongeló en un baño de agua a 45 °C y se calentó a 110 °C durante 1 minuto para eliminar las proteínas precipitadas.

La melaza de naranja deriva del proceso industrial de extracción de zumo de naranja (Indulleida S.A. Vilanova de Segrià, España). La melaza se almacenó a -18 °C en bidones de 5 litros y se descongeló justo antes de su utilización en un baño de agua a 45 °C. Tanto el lactosuero como la melaza de naranja se esterilizaron (121 °C, 15 min) antes de la inoculación.

El BSG fue proporcionado por la cooperativa Boga (Mungia, España) como subproducto del proceso de elaboración de cerveza de cebada. La muestra se congeló a -18 °C hasta su uso. Después de la descongelación (18 horas, 4 °C), la muestra se esterilizó a 110 °C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente en condiciones estériles antes de la inoculación.

En algunos casos, se consideró interesante utilizar como sustrato de fermentación un mix de frutas y verduras. En primer lugar, se utilizó una mezcla modelo de frutas y verduras. Este sustrato estaba compuesto por 19,3% de tomate, 40,3% de manzana, 10,5% de ciruela, 24,6% de pepino y 5,3% de vaina. La mezcla se trituró hasta obtener un puré y se extrajo el agua utilizando una malla. La muestra se trató por exposición a UV durante 1 h. Cuando se utilizó una mezcla real de frutas y verduras, esta fue suministrada por Mercabilbao (Basauri, España). La mezcla (48 kg) estaba compuesta por 28,6% de frutas cítricas (53,6% mandarina, 43,5% naranja y 2,9% limón), 34,7% de otras frutas (28,7% nectarina, 19,2% manzana, 19,2% pera, 15,6% sandía, 15,0% granada y 2,4% plátano) y 36,7% de verduras (16,9% tomate, 13,0% calabaza, 11,9% cebolla, 11,3% vaina, 7,3% pimiento, 6,2% berenjena, 5,6% puerro, 5,6% alcachofa, 5,6% berza, 5,1% zanahoria, 2,8% brócoli, 2,3% patata, 2,3% espárragos, 2,3% acelga y 1,7% lechuga). Las muestras se trituraron hasta un tamaño aproximado de 1 cm (Robot coupe R 10 v.v, Vicennes, Francia), se centrifugaron en una centrífuga de eje vertical con filtro (Comteifa 1950 RPM, Barcelona, España) y se obtuvieron 13,4 litros de lixiviado de los 48 kg de muestra inicial. Se utilizó la parte sólida (sólidos de frutas y verduras, FVS) para los procesos de SSF desarrollados en los apartados 4.5 y 4.6 de resultados y discusión y el lixiviado (FVL, lixiviado de frutas y verduras), para la SmF del apartado 4.5 de resultados y discusión. No se requirió ningún ajuste para estos sustratos. La

muestra sólida se secó a 60 °C durante 2 horas. Las muestras sólidas y líquidas se esterilizaron (121 °C, 15 min) antes de la inoculación.

Las pruebas de ensilados (apartado 4.6 de resultados y discusión) se realizaron en una mezcla comercial preparada en las propias instalaciones de la empresa de acuerdo con las especificaciones de los especialistas y compuesta por restos de brócoli (30%), un mix de descartes de vegetales congelados (25%), descartes de alcachofa (20%), cascarilla de avena (12%) y paja de cebada (13%).

### **3.2 Recuento de hongos y bacterias**

Durante los análisis microbiológicos se utilizó agar PDA (Potato dextrose agar, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para la propagación y el recuento de hongos y medio TSB (Tryptone soya broth, Oxoid Basingstoke, Reino Unido) y agar PCA (Plate count agar, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para la propagación y el recuento de bacterias. En todos los casos se utilizó agua de peptona tamponada (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para realizar las diluciones.

Cuando fue necesario se añadió suplemento selectivo de cloranfenicol (Thermo Scientific, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a las placas de agar PDA para inhibir el crecimiento bacteriano.

En la prueba de ensilados del apartado 4.6 de resultados y discusión el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales se llevó a cabo en agar TSA (Tryptone soya agar, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y en agar TSA + cloranfenicol para la determinación de levaduras y hongos.

Todos los medios se prepararon según lo recomendado por el fabricante y se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos. La determinación fúngica y bacteriana total se realizó a 30 °C durante 48 h.

La suspensión de esporas para los procesos de fermentación se preparó mezclando el micelio formado en una placa de agar PDA inoculada (después de 5 días de incubación a 30 °C), con 20 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01% v/v (Merck, Darmstadt, Alemania). Esta solución se mantuvo durante 24 horas a 30 °C. y se filtró por filtro estéril de 300 µm para obtener la suspensión de esporas.

### 3.3 Cepas fúngicas: aislamiento, identificación y selección

La cepa comercial de *Rhizopus oryzae* (código interno ROR001) fue proporcionada por Top Cultures (Zoersel, Bélgica). El inóculo se recibió en formato polvo y se almacenó a 4 °C. La hoja de especificaciones indica 8,000,000 de esporas por gramo.

Para el proceso de aislamiento de cepas de *Rhizopus* sp., se recolectaron frutas y verduras en proceso de degradación (uva, pimiento rojo, 3 piezas de higo, aguacate, plátano, manzana, kiwi y una pera). Se mezclaron diez gramos de cada muestra con agua de peptona tamponada (1:9 p/p) durante 1 minuto en un homogeneizador (Masticator IUL, Barcelona, España). Las muestras se inocularon en agar PDA + cloranfenicol y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Las colonias con morfología similar a *Rhizopus* sp. (Figura 18) fueron seleccionadas y propagadas en agar PDA. A partir de cada aislamiento se extrajo el ADN por shock térmico y se diluyó en 10 µl de agua estéril. Para la identificación genética, se amplificaron los fragmentos ITS mediante los cebadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) en un termociclador TProfessional (Biometra GmbH, Gotinga, Alemania). La mezcla de reacción contenía 10 µl de muestra, 15 µl de agua estéril,

2,5 µl de cada cebador (20 µM) y 30 µl de Mezcla maestra (Taq DNA polimerasa 2x MasterMix RED de Amplicon, Odense, Dinamarca) con una concentración final de MgCl<sub>2</sub> de 1 mM. El protocolo de PCR incluyó un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (60 s, 92 °C), alineamiento (60 s, 60 °C) y elongación (90 s, 72 °C) y un período de elongación final de 5 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa y se purificaron utilizando un kit de purificación GFX<sup>TM</sup> PCR DNA y de banda de gel (GE Healthcare, Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido). La secuenciación de nucleótidos de los genes se realizó en Secugen S.L. (Madrid, España) y las secuencias se analizaron utilizando el algoritmo BLAST en comparación con la base de datos Genbank.



Figura 18. Colonia de *Rhizopus* sp. en agar PDA.

#### 3.3.1 Actividad celulasa

Para identificar cepas productoras de celulasas se utilizó un protocolo en placa tal y como se describe en la literatura [273]. La detección de los productores de celulasas se realizó en agar completo con carboximetilcelulosa (CMC) (g/l; 2,5 extracto de levadura, 5 triptona, ambos de

Pronadisa Madrid, España, 4 CMC sódico de Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido y 9 g de agar bacteriológico, Scharlau, Sentmenat, España) y agar CMC (g/l; 4 CMC sódico y 9 g de agar bacteriológico).

Se inocularon diez microlitros de solución de esporas ( $10^7$  ufc/ml) de las cepas ROR001, ROR003 y ROR004 (2 puntos por cada placa Petri) en agar CMC completo y agar CMC y se incubaron en diferentes combinaciones de tiempo y temperatura (1 día 30 °C, 15 días 9 °C y 20 días 5 °C). Tras la incubación, las placas se tiñeron con reactivo yoduro (2,0 g de KI y 1,0 g de yodo en 300 ml de agua destilada, ambos de Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), durante 3-5 minutos y se midió el radio del halo formado alrededor de cada punto de inoculación.

### **3.4 Mutación y caracterización de cepas**

Se consideró la cepa salvaje ROR004 para los procesos de mutación. Brevemente, este microorganismo se expuso a luz UV (Atom A/70 N°557, Barcelona, España), 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG, Tokyo chemical industry, Zwijndrecht, Bélgica) y bromuro de etidio (BE, Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido) a temperatura ambiente para inducir mutagénesis. Para el tratamiento con UV, se colocaron 10 ml de la suspensión de esporas (4 log ufc/ml) en una placa Petri estéril (90 mm de diámetro) y se expusieron a luz UV (254 nm) durante 60 y 90 minutos a 20 cm. Para el tratamiento con MNNG, se trató 1 ml de la suspensión de esporas (4 log ufc/ml) con 5 ml de MNNG (0,1 mg/ml) durante 30 y 50 minutos. Finalmente, para la mutagénesis con BE, se mezclaron 7,4 ml de suspensión de esporas (4 log ufc/ml) con 600 µl de solución de BE (1 mg/ml) durante 90 y 100 minutos. Después del tratamiento con MNNG y BE, la solución de esporas se lavó dos veces, mediante centrifugación (11330 g, 5 min), eliminando el sobrenadante y lavando el pellet con 1 ml de agua destilada estéril. En todos los casos, la suspensión final de esporas se cultivó en placas de agar PDA durante 48 horas a 20 °C para obtener colonias aisladas.

#### **3.4.1 Producción de ácidos orgánicos**

Se utilizó agar y caldo púrpura de bromocresol (PBC) para realizar una criba de las cepas aisladas después del proceso de mutación de acuerdo a la bibliografía [274]. El caldo PBC contiene (g/l); 10 peptona de caseína (Panreac Química SA, Barcelona, España), 5 NaCl, 5 glucosa (ambas de Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido), 1 extracto de carne (Pronadisa, Madrid, España) y 0,015 de indicador PBC (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania). La producción de ácido modifica el color del medio, cambio que puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 460 nm. Cuando fue necesario, se preparó agar PBC agregando 14 g/l de agar

bacteriológico al caldo. Las cepas se incubaron a 30 °C durante 24 horas y el cambio de color (que indica la producción de ácido) se midió cada 2 horas. La producción de ácido se estimó calculando el diámetro total del área amarilla menos el diámetro de la colonia (zona púrpura).

### **3.5 Fermentación en estado sólido**

#### **3.5.1 Frutas, peladuras de patata, posos de café y alperujo**

La SSF de estos sustratos se llevó a cabo en placas Petri estériles de 135 mm de diámetro durante 72 horas a 30 °C (área de 143,1 cm<sup>2</sup>). Para la optimización de la superficie de incubación y la densidad del sustrato, la fermentación se realizó en bandejas de plástico esterilizadas con diferentes tamaños (desde 9,6 hasta 561,6 cm<sup>2</sup>) a 30 °C durante 72 h. Para la caracterización del producto final (n=2), el área de incubación fue de 2340 cm<sup>2</sup> y la densidad del sustrato fue de 0,10 g/cm<sup>2</sup> de fruta seca. Se añadió 1% (v/p húmedo) de suspensión de esporas (10<sup>6</sup> ufc/ml) como inóculo en todos los sustratos.

Cuando se consideró necesaria, la suplementación con nitrógeno de las frutas se realizó en dos niveles, 1,2 y 2,4 g de nitrógeno/100 g de sustrato seco y tres fuentes de nitrógeno: urea (Panreac Química SA, Barcelona, España), proteosa peptona y sulfato de amonio (Oxoid Basingstoke, Reino Unido). La adición de nitrógeno a los sustratos se realizó al mismo tiempo que la inoculación.

#### **3.5.2 BSG y generación del modelo en SSF**

Todos los experimentos de SSF con BSG se llevaron a cabo en una placa estéril de 135 mm de diámetro (área de superficie de 143,1 cm<sup>2</sup>) a 30 °C. El proceso de SSF se realizó con la cepa ROR004 y todas las variables se monitorizaron de 0 a 192 horas (n=4 en todos los casos, excepto a tiempo 0 horas, donde n=2). La proteína, se determinó en la biomasa fermentada y no fermentada, y la proteína soluble, azúcares reductores, grado de hidrólisis (GH) de las proteínas, la capacidad antioxidante, la capacidad antimicrobiana y los compuestos fenólicos en los extractos solubles de ambas muestras.

Se utilizó un diseño factorial para la determinación de las condiciones óptimas de la SSF del BSG. El diseño factorial consistió en dos factores continuos (tiempo y temperatura) y un factor categórico (cepa fúngica). Las ejecuciones consideradas incluyeron un diseño factorial de 2<sup>3</sup> (8 ejecuciones) y puntos centrales (4 ejecuciones) para determinar la mejor combinación entre el tiempo de incubación (72, 144 y 216 h) y la temperatura (20, 25 y 30 °C) y el efecto de la cepa usada (ROR004 y ROR004 G) en varias variables respuesta (proteína, proteína soluble, GH, capacidad antioxidante y polifenoles totales). La proteína, los lípidos totales, el perfil AA

y el perfil AG se determinaron en la biomasa fermentada y no fermentada a las condiciones óptimas. En todos los casos, la densidad del sustrato fue de 0,09 g de BSG/cm<sup>2</sup> (ES) y se añadió 10% (v/p húmedo) de suspensión de esporas (10<sup>7</sup> ufc/ml) a los sustratos de fermentación.

### **3.5.3 Mezcla de frutas y verduras**

Todos los experimentos de SSF se llevaron a cabo a 30 °C en placas estériles de 135 mm de diámetro (área de superficie de 143,1 cm<sup>2</sup>), con una densidad de sustrato estimada de alrededor de 0,09 g de fruta seca/cm<sup>2</sup>. Durante la SSF, se utilizaron dos sustratos de fermentación: el sustrato modelo (puré de frutas y verduras) y la mezcla de subproductos de frutas y verduras sólidas (FVS). El sustrato modelo se inoculó con un 1% (v/p húmedo) de suspensión de esporas (10<sup>6</sup> ufc/ml) y el FVS se inoculó con un 10% (v/p húmedo) de suspensión de esporas (10<sup>7</sup> ufc/ml).

Durante la validación del proceso desarrollado en el apartado 4.2 de resultados y discusión, se incubaron tres cepas fúngicas (cepas ROR001, ROR003 y ROR004) durante 3 días en el sustrato modelo y el rendimiento de biomasa obtenido se comparó con la biomasa predicha con el modelo para frutas. El proceso de SSF con FVS se llevó a cabo durante 8 días con la cepa ROR004.

### **3.5.4 Mezcla de vegetales para ensilados**

La prueba siguió el protocolo habitual para una producción comercial de ensilados. Se combinaron 5200 kg de mezcla vegetal en una mezcladora industrial y se trataron durante 3 minutos. A continuación, la mezcla se embaló en balas de 720-740 kg forradas en plástico y se depositaron en una explanada adjunta al almacén. Cada bala tenía unas dimensiones de 1,25 m<sup>3</sup>. En este caso, cuando quedaban 2565 kg de mezcla sin embalar, se inoculó el microorganismo mediante un sistema de vaporización en la propia mezcladora y se agitó durante 30 minutos para asegurar una distribución homogénea. A continuación, se procedió a envasar la mezcla y almacenarla en las mismas condiciones que las balas sin tratar. El peso de cada bala sin inóculo fue entre 720-740 kg, mientras que las inoculadas (n=3) pesaron 780 kg de media. Las balas estuvieron a la intemperie durante todo el proceso de ensilado (un total de 43 días). Como control se depositó muestra inoculada en bandejas de plástico y se incubaron en condiciones aerobias. El peso de la masa vegetal en las bandejas (1590 cm<sup>2</sup>) fue de 2628 g en las no inoculadas (n=2) y de 1887 g en las inoculadas (n=4). Dos de estas bandejas se incubaron en el laboratorio a T<sup>a</sup> controlada (20 °C) y otras dos se guardaron a temperatura ambiente (Figura 19).

La Tabla 6 recoge el diseño experimental realizado. Se analizaron dos muestras de cada condición.

Tabla 6. Condiciones experimentales de ensilado y fermentación de mezclas vegetales.

Condición	Inoculado	Formato	Ambiente	Temperatura	Tiempo fermentación (días)
1	No	Ensilado	Anaerobio	Ambiente	43
2	Si	Ensilado	Anaerobio	Ambiente	43
3	Si	Bandeja	Aerobio	Ambiente	8
4	No	Bandeja	Aerobio	20 °C	8
5	Si	Bandeja	Aerobio	20 °C	8

Las muestras a temperatura controlada se incubaron en las estufas de los laboratorios de AZTI a 20 °C. Las muestras a temperatura ambiente se dejaron en las instalaciones del gestor de subproductos. El perfil de la temperatura ambiente recogida por el registro oficial de la estación automática Funes INTIA [275] cercana a la empresa de gestión de residuos está recogido en la Figura 19. La temperatura media diaria estuvo comprendida entre los 13 °C y los 28 °C, con picos diarios de 36 °C y mínimas de 9 °C.

Las balas de ensilado y las muestras en bandejas se inocularon con un 0,3% (v/p húmedo) de

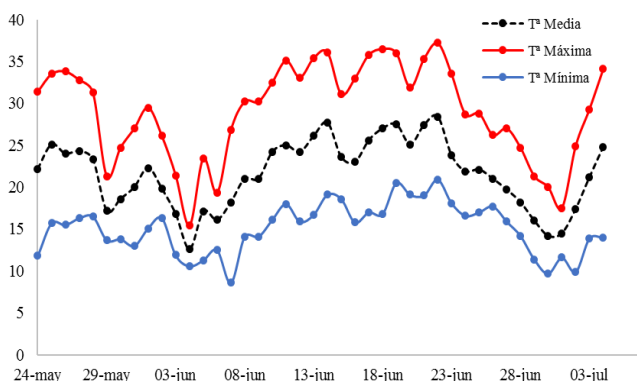


Figura 19. Condiciones de temperatura ambiente, mínimas, medias y máximas recogidas en la estación automática de Funes INTIA [366].

una solución de  $5,5 \cdot 10^6$  ufc/ml de la cepa ROR003. La concentración final estimada fue de  $1,5 \cdot 10^4$  ufc/g. Tras la inoculación, y pasado el tiempo de incubación, las muestras se evaluaron de forma visual para observar la formación de micelio y se enviaron a AZTI, donde se congelaron hasta su análisis.



### 3.5.5 SSF en reactor tipo tambor con mezclado

En este proceso se utilizaron como sustrato las muestras de BSG y FVS descritos en los apartados anteriores. En cada proceso se utilizó BSG (1,0 kg húmedo,  $70,7 \pm 0,15\%$  humedad) y FVS (1,7 kg húmedos,  $77,7 \pm 0,4\%$  humedad) termostatizados parcialmente en una estufa a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.

La fermentación se llevó a cabo en un fermentador tipo tanque (Trallero and Schlee, 10 L, Llagosta, España, Figura 20) con agitación, el cual fue modificado para su uso como fermentador tipo tambor (Figura 21). Se elaboró una plataforma de sujeción para poder colocarlo en posición horizontal y se ajustó la agitación (motor Heidolph RZR2020, Schwabach, Alemania) con un cambio de varilla

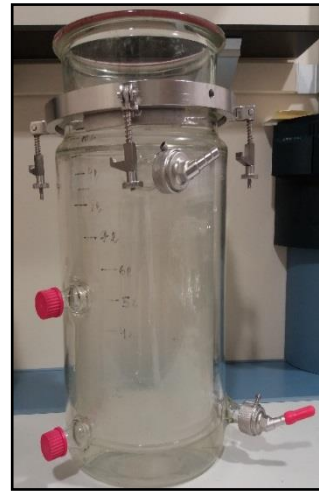


Figura 20. Fermentador tipo tanque de 10 L.

(Helice MK, Goldspray, Torrent, Valencia) para productos sólidos. Para que la mezcla fuese lo más homogénea posible se soldaron dos varillas para facilitar el agitado en todo el volumen del tanque. Este fermentador de cristal está equipado con camisa de agua y baño termostático de circulación (Huber compatible control D77656, Offenburg, Alemania) conectado a una sonda de temperatura. Para poder introducir aire al sistema se utilizó una bomba de aire (Resun LP-60, Longgang, China) conectada con una entrada y una salida equipadas ambas con filtros estériles de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ .

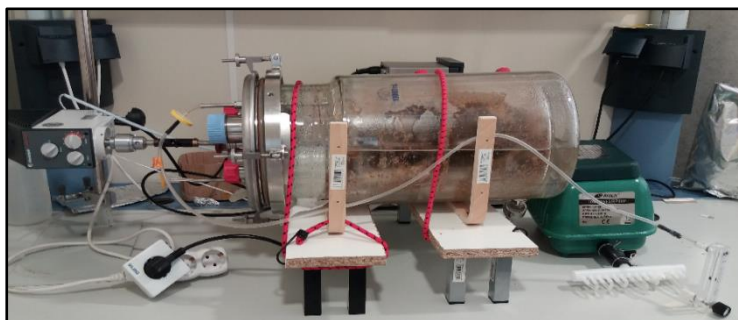


Figura 21. Fermentador de tanque adaptado a la fermentación de tipo tambor en estado sólido.

El fermentador y el sustrato se esterilizaron a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos en un autoclave de pie. Una vez enfriado el sustrato dentro del fermentador (relación 1:10 y 1,7:10 peso

sustrato/volumen fermentador para el BSG y la FVS), se inoculó con *Rhizopus* sp. (cepa ROR004,  $1 \times 10^7$  ufc/ml en un ratio 10:1 p/v sustrato: inóculo) mediante la puerta estéril y se colocó el sistema de manera horizontal ajustando el agitador al motor. Antes de comenzar con el proceso de fermentación, se mezcló durante 1 minuto a 320 rpm para homogenizar la mezcla con el inóculo, se llenó la camisa, se ajustó la temperatura a 30 °C y se conectó la bomba para la introducción del aire (entrada 3 L/min). y salida de aire por filtro estéril.

La fermentación se llevó a cabo durante 8 días en el caso de las FVS y 9 días en caso del BSG, con agitación de 1 minuto (320 rpm) cada 24 horas.

Para la obtención de harinas, las muestras fermentadas se secaron a 60 °C en estufa durante 18 horas hasta una humedad menor al 10% (Analizador de humedad termogravimétrico Sartorius MA100, Gotinga, Alemania). Las muestras se trituraron con un molinillo (MC300132 Moulinex, Barcelona, España) para obtener prototipos de harina de BSG fermentado y FVS fermentadas (Figura 22). Se



llevó a cabo el mismo proceso en las muestras sin fermentar para tener un control para su comparación.

*Figura 22. Harinas de BSG fermentado (izquierda) y FVS fermentadas (derecha).*

### **3.6 Fermentación sumergida**

#### **3.6.1 Fermentación sumergida en matraz de agitación**

Durante la selección de mutantes, la producción de ácido orgánico y biomasa se midió en procesos de SmF en diferentes medios de cultivo y condiciones. El medio de fermentación para la producción de ácidos orgánicos incluyó una fermentación en “dos fases”. La primera fase se utiliza para la producción de la biomasa del hongo en un “medio de proliferación” y, en la segunda, esta biomasa se inocula en un medio pobre en nitrógeno con alto contenido de glucosa. El medio de proliferación incluyó (g/l): 30 glucosa, 2,5 proteosa peptona (Oxoid, Basingstoke, England), 0,6  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Panreac Química SA, Barcelona, España), 0,5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania). La fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer estériles de 150 ml (50 ml de medio), cultivados a 30 °C con agitación

orbital (170 rpm) durante 24 horas. Una vez concluida la primera fase, se transfirió 1 g de cada biomasa a los medios de cultivo para la producción de ácidos orgánicos. El medio para la producción de ácidos orgánicos incluyó (g/l): 80 glucosa, 0,6  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 18  $\text{CaCO}_3$  (Panreac Química SA, Barcelona, España). La SmF se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer estériles de 150 ml (40 ml de medio) a 30 °C con agitación orbital (170 rpm) durante 137 h.

El proceso de SmF para la producción de biomasa y proteínas se llevó a cabo en un medio de crecimiento distinto al anterior, que incluyó (g/l): 20 glucosa, 3,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5  $\text{FeSO}_4$  (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y 0,5 KCl (Merck, Darmstadt, Alemania). El nitrógeno fue 0,75 g/l (proteosa peptona). La SmF se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer estériles de 150 ml (medio de 100 ml) con agitación orbital (170 rpm) incubados a 30 °C durante 72 horas en condiciones de oscuridad. Las suspensiones de esporas fúngicas se ajustaron a  $10^7$  ufc/ml justo antes de la inoculación y se usaron para inocular el medio con 1% v/v.

### **3.6.2 Fermentación sumergida con flujo de aire**

La SmF con flujo de aire se utilizó durante la caracterización de las cepas salvajes y las cepas seleccionadas del proceso de mutación. En este experimento se utilizó un medio sintético que incluyó (g/l): 32 glucosa, 3,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5  $\text{FeSO}_4$ , 0,5 KCl y 0,2 % (v/v) de aceite de oliva como antiespumante. Se añadió 3,75 g nitrógeno/l (proteosa peptona). El pH inicial del cultivo se ajustó con NaOH 1M estéril y HCl 1M (ambos de Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido) a pH = 6,1. La fermentación se llevó a cabo en botellas pirex estériles de 1 l (500 ml de medio), con un flujo de aire estéril de 2,0 v/v por minuto y se incubaron a 30 °C durante 5 días. Las botellas se inocularon con una suspensión de esporas al 0,1% v/v en condiciones de oscuridad y sin agitación. Las suspensiones de esporas se ajustaron a  $10^7$  ufc/ml justo antes de la inoculación.

### **3.6.3 Modelado de condiciones para la fermentación sumergida**

Se realizó una optimización de las condiciones de SmF con la cepa ROR001 para maximizar la producción de biomasa (g/l), producción de proteínas (% ES), consumo de glucosa (%), rendimiento de biomasa (g biomasa ES/g de glucosa consumida), producción de quitosano (% ES) y producción de ácido fumárico (g/l).

La optimización se realizó en medio de cultivo sintético compuesto por (g/l): glucosa 7,5-82,5, 3,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5  $\text{FeSO}_4$ . El nitrógeno en el medio iba de 0,75 a 3,75 g/l

(proteosa peptona) y se añadió 0,2 % v/v de aceite de oliva como antiespumante. El pH inicial del cultivo se ajustó con NaOH 1 M y HCl 1M. La SmF se llevó a cabo en botellas pirex estériles de 1 l (500 ml de medio) con un flujo de aire estéril de 2,0 v/v por minuto, incubado a 30 °C, inoculado con una suspensión de esporas al 0,1% (v/v) en condiciones de oscuridad y sin agitación. La suspensión de esporas se ajustó a  $10^7$  ufc/ml justo antes de la inoculación.

Se llevó a cabo un diseño compuesto central rotativo (Central Composite Rotary Design, CCRD) compuesto por 27 ensayos experimentales (material complementario Tabla 1). Se usaron 5 niveles de los 4 factores variables (glucosa, nitrógeno, pH y tiempos de incubación) en el diseño central compuesto (Tabla 18). Las pruebas contemplaron  $2^4$  diseños factoriales (16 experimentos), puntos estrella (8 experimentos) y puntos centrales (3 experimentos). Los resultados se expresaron como una ecuación de segundo orden, presentada como la ecuación 2:

$$Y = B0 + AX_1 + BX_2 + CX_3 + DX_4 + ABX_1X_2 + ACX_1X_3 + ADX_1X_4 + BCX_2X_3 + BDX_2X_4 + CDX_3X_4 + AAX_1^2 + BBX_2^2 + CCX_3^2 + DDX_4^2. (eq. 2)$$

donde Y es el parámetro de respuesta, X1, X2, X3 y X4 son las variables independientes, A, B, C y D son coeficientes lineales, AA, BB, CC y DD son coeficientes cuadráticos y AB, AC, AD, BC, BD y CD son los coeficientes interactivos. Se utilizó ANOVA (análisis de varianza) para el análisis estadístico del modelo (paquete de software Statgraphics Centurion XVI). Los factores se consideraron significativos cuando su probabilidad (valor p) fue inferior a 0,05.

Como subproductos de la industria alimentaria se utilizaron el lactosuero y la melaza de naranja. El lactosuero se suplementó con nitrógeno (proteosa peptona 0,25 g/l), glucosa (9,96 g/l) y micronutrientes (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g/l, KCL 0,5 g/l, MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 0,5 g/l, FeSO<sub>4</sub> 0,5 g/l y aceite de oliva 0,8 % (v/v) como antiespumante). El suero y los nutrientes se esterilizaron (121 °C, 15 min) por separado y se mezclaron en condiciones estériles. Se inocularon con la cepa original (ROR001, n = 2).

El pH original de la melaza de naranja se ajustó con NaOH 4 M antes del autoclavado (121 °C, 15 min) El pH final del sustrato fue de  $5,4 \pm 0,1$ . Cuando fue necesario, el medio se suplementó hasta 2 g/l de nitrógeno con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido) antes del autoclavado. Las muestras se inocularon con *Rhizopus* sp. cepa ROR004. Las condiciones de los experimentos se encuentran detalladas en la Tabla 19.

### 3.7 Determinaciones analíticas

#### 3.7.1 Determinación de ácidos orgánicos en el medio de cultivo

Los ácidos orgánicos producidos en el medio de cultivo se determinaron por GC/MS. Debido a la baja solubilidad del ácido fumárico en agua (6,3 g/l a 25°C), la muestra se calentó en un baño de agua (80 °C) [187]. Brevemente, se agitó vigorosamente 1 ml de muestra, se añadieron 39 ml de etanol/agua al 50% (v/v) (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido) y se incubaron en un baño a 70 °C durante 15 minutos (mezclando el tubo cada 3 minutos). La muestra se trató por ultrasonidos durante 15 minutos (mezcla manual cada 5 minutos) y se centrifugó a 1450 g durante 10 minutos. El sobrenadante (900 µl) del extracto se agregó a un tubo Mi Vac y se agregaron 100 µl de estándar interno (xilitol Fluka Biochemika 1500 ppm). Las muestras se deshidrataron en un evaporador rotatorio (miVAC Duo Genevac, Ipswich, Reino Unido) (Tª 60 °C, disolvente H<sub>2</sub>O, presión 50 mbar, tiempo 1 hora y 30 minutos), se agregó 1 ml de solución de clorhidrato de hidroxilamina en piridina (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido), se cubrió y se agitó durante 1 minuto en vortex. Las muestras se incubaron en el bloque calefactor a 60 °C durante 30 minutos y, después de enfriar, se añadió 1 ml de HMDS (1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano 98%, Acros Organics, Nueva Jersey, EE.UU.) y 0,1 ml de TMCS (triclorometilsilano 98%, Acros Organics, Nueva Jersey, EE. UU.), Se cubrieron, se agitaron durante 1 minuto en vortex y se incubaron nuevamente en el bloque calefactor a 60 °C durante 1 hora. Después de dejarlas enfriar, las muestras se centrifugaron (1450 g, 10 min) y el sobrenadante se recogió en viales cromatográficos. Se realizó un análisis por CG/MS (CG Agilent 6890, columna capilar Teknokroma TRB-1MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, detector MS 5873 Agilent, Santa Clara, EE.UU.). El programa fue de 140 °C durante 2 minutos, un gradiente de 10 °C/min hasta 250 °C, un segundo gradiente de 5 °C/min hasta 300 °C y 8 minutos a 300 °C. Se utilizó helio como gas portador (1 ml/min) y el volumen de inyección fue de 1,0 µl (temperatura del inyector a 300 °C). Se cuantificaron los ácidos orgánicos comparando con los valores de calibración (ácido láctico, VWR Fontenay-sous-Bois, Francia; ácido fumárico, Sigma Aldrich, San Luis, EE.UU.; ácido málico, Acros Organics, Nueva Jersey, EE.UU. y ácido cítrico, Panreac Química SA, Barcelona, España).

#### 3.7.2 Determinación de azúcares reductores en el medio de cultivo

Los azúcares reductores se determinaron mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) [276] ajustado al procedimiento de ensayo de microplaca. El reactivo de DNS se preparó disolviendo 8 g de NaOH en 100 ml de agua destilada. Se mezclaron 5 g de DNS (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido), 250 ml de agua destilada y 150 g de tartrato de potasio sódico tetrahidrato (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y se completaron hasta

un volumen de 500 ml. Se agregaron 25  $\mu$ l de las muestras, blanco o estándar (diferentes concentraciones de glucosa) y 25  $\mu$ l de reactivo DNS a cada pocillo y se incubó la placa durante 10 minutos a 100 °C. La microplaca se enfrió rápidamente en un baño de hielo y se agregaron 250  $\mu$ l de agua destilada a cada pocillo. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.).

### **3.7.3 Determinación de biomasa**

Al crecer en fermentación sumergida (SmF), la biomasa del hongo se determinó pasando el contenido total del medio de cultivo por filtro de metal estéril de 300  $\mu$ m y el retenido se consideró el micelio fúngico. Los micelios fúngicos se lavaron con agua destilada (1:2 v/p) en el mismo filtro y se eliminó al máximo los restos de agua por presión. En SSF en cambio, la producción de biomasa se determinó separando el micelio del sustrato (en el caso de sustratos puros) y se eliminaron los restos del sustrato limpiando la biomasa dos veces con agua destilada (2:1 v/p). EL proceso se realizó en filtro de 300  $\mu$ m y se retiró el máximo de agua por presión.

### **3.7.4 Composición nutricional**

La materia seca (MS) se calculó secando la muestra a 60 °C durante 24 h, hasta peso constante. El contenido de proteínas de la biomasa en SmF se determinó mediante el método de Biuret propuesto por Satari *et al.* [203]. Brevemente, aproximadamente 100 mg de muestra se mezclaron con 3 ml de NaOH 1 M y se incubaron a 100 °C durante 10 minutos. Después del enfriamiento inmediato en un baño con hielo, se realizaron diluciones de las muestras con NaOH 1 M, se agregó  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (2,5% p/v) (Merck, Darmstadt, Alemania) a los tubos de ensayo (volumen final de 25% v/v) y se mezclaron vigorosamente durante 5 minutos. El sobrenadante se recogió después de centrifugar las muestras (6714 g, 5 min) y la absorbancia se midió a 555 nm en un lector Varioskan Flash. Se usaron diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) disueltas en NaOH 1 M para la curva de calibrado.

La grasa total de la biomasa del hongo obtenida en los procesos de SmF se determinó basándose en el método de Bligh, Dyer [277]. Se mezcló la biomasa (500-1000 mg) con 3 ml de metanol, 1,5 ml de cloroformo (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido) y 1,2 ml de agua y se homogeneizó (Ultra-turrax IKA T18 Basic, Staufen, Alemania) durante 1 minuto. Se añadieron otros 1,5 ml de cloroformo y 1,2 ml de agua, se homogeneizó nuevamente y se centrifugó (1450 g, 15 min). Se eliminaron las fases acuosas y proteicas y se determinó la fase lipídica (en la parte inferior del tubo) en cloroformo. La humedad y las impurezas se eliminaron al pasar a través de  $\text{NaSO}_4$  (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido). Se

recogió la fase grasa en un matraz de metilación y el disolvente se evaporó por corriente de nitrógeno.

En el proceso de SSF la proteína total, la grasa total y los azúcares totales se determinaron mediante los métodos de Kjeldahl, Soxhlet y Luff Schoorl y las cenizas gravimétricamente [278].

La fibra ácido detergente (FAD) [279] y neutro detergente (FND) [280] se determinaron por gravimetría. La proteína no digerible se determinó a partir del cálculo de proteína total (método Kjeldahl) y la proteína soluble en ácido clorhídrico y pepsina [281]. Los carbohidratos no fibrosos (CNF) se determinaron por resta de grasa, proteína, cenizas y FND.

La suma de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 se determinó por ELISA directo tras extracción con etanol 70%. Se utilizó un patrón comercial para la cuantificación. Los análisis de FAD, FND, proteína no digerible y suma de aflatoxinas se encargaron a los laboratorios OFICE S.L., Laboratorio de investigación cerealista (Castellgalí, España).

Respecto a los minerales, la determinación de fósforo se realizó mediante método espectrofotométrico (reactivo molibdato-vanadato). La determinación de sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro y zinc se realizó por espectroscopía de atomización por llama.

### **3.7.5 Perfil de aminoácidos (AA) e índice de aminoácidos esenciales (EAAI)**

El perfil de AA se determinó mediante cromatografía líquida y detección de fluorescencia después de la derivatización de la muestra utilizando el kit AccQ-Fluor (WAT052880, Waters, Milford, EE.UU). Las muestras se mezclaron con HCL 6 N y se dejaron durante 24 horas a 100 °C. La derivatización se realizó según lo especificado en el kit. El análisis de HPLC-FPLC se ajustó con una columna AccQ.Tag para el análisis de aminoácidos hidrolizados de Agilent Technologies (3,9 x 150, 4 µm, base de sílice unida con C18), detector de fluorescencia (Ex=250 nm; Em = 396 nm) y realizado en un sistema de gradiente (60% de acetonitrilo, 40% de tampón acuoso Waters AccQ.Tag (10% v/v) 5 minutos, 100% tampón acuoso Waters AccQ.Tag (10% v/v) durante los siguientes 9 minutos. Los AA se identificaron comparando los tiempos de retención con los estándares y se expresaron como porcentajes de AA totales.

La calidad de la proteína se evaluó mediante el índice de aminoácidos esenciales (EAAI) como se ha descrito anteriormente [282]. El EAAI se basa en la comparación del perfil de aminoácidos esenciales (EAA) con una proteína de referencia o con unos requisitos específicos como los recomendados por la FAO para la nutrición humana [197]. Este sistema se puede

utilizar como un método rápido para evaluar y optimizar el contenido de AA de las formulaciones de alimentos y piensos. La ecuación de EAAI se describe a continuación.

$$EAAI = \sqrt[n]{\sum n \frac{\text{mg de aminoácido en 1 g de proteína}}{\text{mg de aminoácido en 1 g de la proteína de referencia}}} \text{ (eq. 3)}$$

n: número de EAA

### 3.7.6 Perfil de ácidos grasos (AG)

El perfil de AG se determinó mediante metilación y análisis GC-FID utilizando patrones internos. La derivatización comienza con la adición de 5 ml de metóxido de sodio (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido, 0,2% p/v en metanol) a la fracción lipídica extraída previamente y la reacción se forzó tras hervir la mezcla durante 10 minutos en un sistema de reflujo. Las muestras se enfriaron introduciéndolas en hielo, se neutralizaron mediante la adición de HCL (5% v/v) en metanol y se volvieron a hervir durante 10 minutos, se enfriaron en hielo y se mezclaron con 5 ml de n-hexano (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido). Se añadió cloruro de sodio saturado (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido) forzando la separación del hexano de la parte inorgánica. En ese punto, los ésteres metílicos se disolvieron en la parte de hexano, se evaporó el disolvente y disolvieron en éster metílico del AG C19 como patrón interno. El análisis CG-FID se desarrolló en columna DB-23 de Agilent Technologies (60 m x 0,25 mm). El programa fue de 150 °C durante 1 minuto, un gradiente de 5 °C/min hasta 200 °C, un segundo gradiente de 2 °C/min hasta 230 °C y 20 minutos a 230 °C. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se identificaron comparando los tiempos de retención con los estándares y se expresaron como porcentajes de ésteres metílicos de ácidos grasos totales.

En el apartado 4.2 de resultados y discusión se utilizó el mismo método para la determinación del perfil graso con leves modificaciones. Se añadieron 10 ml de metóxido de sodio a 0,10-0,15 g de grasa y se hirvió durante 15 minutos en un sistema de reflujo. Las muestras se enfriaron introduciéndolas en hielo. Después de eso, se neutralizaron mediante la adición de ácido sulfúrico (5% v/v) en metanol y se volvieron a hervir durante 10 minutos, se enfriaron en hielo y se mezclaron con 15 ml de n-hexano. Se añadió cloruro de sodio saturado forzando la separación del hexano de la parte inorgánica. En ese punto, los ésteres metílicos se disolvieron en la parte de hexano y se pusieron en un vial de GC. El análisis GC-FID se equipó con una columna DB-WAX 122-7032 de Agilent Technologies (30 m x 0,25 mm). El programa fue de 50 °C durante 2 minutos, con un gradiente de 10 °C/min hasta 240 °C y 9 minutos a 240 °C. Cuando se determinaron los ácidos grasos n3, el programa fue de 50 °C



durante 2 minutos, con un gradiente de 5 °C/min. Hasta 240 °C y 5 minutos a 240 °C. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se identificaron comparando el tiempo de retención con los estándares (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y se expresaron como porcentajes de ácidos grasos totales.

### 3.7.7 Quitosano

La extracción y precipitación de quitosano se realizó como se describió anteriormente por Zamani *et al.* [283]. El micelio húmedo se trató con NaOH 0,5 M (30 ml de NaOH por g de peso seco de micelio) a 90 °C durante 2 horas. El material insoluble en medio alcalino (AIM) se separó por centrifugación (4000 g, 10 min), se lavó 4 veces con agua destilada y se almacenó a 4 °C hasta su uso. El rendimiento de AIM a partir de biomasa se midió después de secarlo a 60 °C hasta peso constante. Se mezcló con ácido sulfúrico (1% v/v) (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido) (100 ml/g de AIM), la mezcla se calentó a 121 °C durante 20 minutos, y seguidamente se filtró en caliente (> 90 °C). Las muestras se mantuvieron durante 2 horas en un baño con hielo para la precipitación del quitosano, se centrifugaron (4000 g, 10 min) y el pellet se secó hasta peso constante.

### 3.7.8 Otras determinaciones

La producción de ácido fumárico se determinó mediante el kit de ensayo de fumarato (Sigma Aldrich, San Luis, EE. UU.) como se describe en el procedimiento de ensayo de microplacas.

El pH del cultivo se determinó utilizando un potenciómetro (Crison micropH 200, Hach Lange Spain S.L.U., España).

La DQO se determinó utilizando los kits de prueba de demanda química de oxígeno (COD spectroquant cell test, Merck, Darmstadt, Alemania) y la lectura se realizó con un lector NOVA60 Spectroquant (Merck, Darmstadt, Alemania).

## 3.8 Extracción y caracterización de compuestos tras los procesos de SSF

Los compuestos se extrajeron con agua para determinar la disponibilidad real y el efecto de la SSF en la liberación de los mismos. Se mezclaron 10 g de muestra con 25 ml de agua destilada en un Erlenmeyer y la mezcla se colocó en un agitador rotatorio (1 h, 180 rpm, 37 °C). Posteriormente, se centrifugó la muestra (10000 g, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante, que contendría los metabolitos solubles en agua, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Esos extractos se utilizaron para la determinación de proteínas solubles, GH, actividad antioxidante,

contenido fenólico total (TPC), actividad antibacteriana y determinación de azúcares reductores.

### 3.8.1 Grado de hidrólisis (GH)

El GH (%) se determinó con el método de *o*-ftalaldehído (OPA) [284]. El reactivo de OPA se preparó de la siguiente manera: 3,7% p/v de tetraborato de sodio decahidrato (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y 0,58% p/v de Na-dodecilsulfato (SDS 99%, Fischer Scientific, Nueva Jersey, EE.UU.) disuelto en agua desionizada. Se preparó también una disolución de OPA (4% p/v, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) en metanol y ambas soluciones se mezclaron en una proporción de 51,5:1. Finalmente, se añadió a la solución un 0,38% v/v de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania). Se utilizó N $\alpha$ -acetil-L-lisina (250  $\mu$ M, Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania) en agua destilada (10-200  $\mu$ M) como estándar. La solución de la muestra se ajustó a 0,05 g de proteína/l y se agregaron 60  $\mu$ l de muestra o estándar a los pocillos de la microplaca. Se añadió 180  $\mu$ l de reactivo de OPA a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos. La medición se realizó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm en un lector Varioskan Flash. El GH se calculó de la siguiente manera:

$$GH (\%) = \frac{h}{htot} * 100 \quad (eq. 4)$$

donde *htot* es el número total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína, y *h* es el número de enlaces hidrolizados. Según lo descrito por Nielsen *et al.* [284], para propósitos generales el *htot* se establece como 0,8 g meqv/g prot. Para calcular la *h*, la ecuación descrita es:

$$h(meqv/g \text{ proteina}) = \frac{\text{lisina NH}_2 - \beta}{\alpha} \quad (eq.5)$$

cuando la materia prima no ha sido examinada previamente, entonces se estima que  $\alpha$  y  $\beta$  son 1 y 0,4 respectivamente, y Lisina-NH<sub>2</sub> es:

$$Lisina \text{ NH}_2 = \frac{meqv \text{ lisina}}{P} \quad (eq.6)$$

donde *P* es la proteína (g/l) en la muestra (0,05 g/l) y meqv lisina son los miliequivalentes de lisina estimados en la muestra usando la curva estándar.

### 3.8.2 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los extractos se determinó mediante el método de difusión en agar [285]. Se utilizaron dos especies bacterianas como microorganismos diana,

*Salmonella enterica* (CECT 4156) y *Escherichia coli* (CECT 516), y se cultivaron en agar Mueller-Hinton (caldo Mueller Hilton + 14 g/l agar bacteriológico) a 37 °C durante 24-48 horas. Las cepas se inocularon en 10 ml de caldo Mueller-Hilton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) hasta que la densidad óptica alcanzó 0,50 (aproximadamente 10<sup>8</sup> ufc/ml) y se incubaron a 30 °C durante 1 hora. Se añadieron 100 µl de suspensión bacteriana a 4 ml de agar Mueller Hilton blando (0,7% agar bacteriológico p/v) mantenido a 48 °C, se agitó y se vertió rápidamente en una placa de agar Mueller Hilton. Después de la solidificación, se depositaron dos discos (filtro Whatman n° 1 de 5 mm de diámetro) por placa sobre los que se añadieron los extractos a ensayar (10 µl por cada disco). Las placas se incubaron a 30 °C durante 24-48 horas y la actividad antibacteriana se midió como el diámetro de la zona de no crecimiento del patógeno en comparación con un control antibacteriano positivo (1 g/l tetraciclina Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y un control negativo (tampón fosfato de sodio, 0,01 M, pH 7,5).

### 3.8.3 Actividad antioxidante (actividad de captación de radicales DPPH)

La actividad antioxidante de las muestras se midió utilizando el método de la actividad de captación de radicales DPPH. Se preparó una disolución de 25 ppm del reactivo DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) en metanol y se agregaron 280 µl de esta solución a 20 µl de solución de muestra añadida previamente a cada pocillo de la placa. La mezcla se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. La absorbancia se midió a 515 nm en un lector Varioskan Flash. El estándar estaba compuesto por agua-metanol (50% v/v) y diferentes concentraciones de Trolox (Acros Organics, Nueva Jersey, EE. UU.). La capacidad antioxidante se expresó como capacidad equivalente de Trolox (TEAC µg de equivalentes de Trolox/g ES) mediante la curva de calibración. También se calculó la inhibición del DPPH (porcentaje de reducción de DPPH):

$$\text{Reducción DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs blanco}} * 100 \text{ (eq. 7)}$$

### 3.8.4 Contenido total de compuestos fenólicos (TPC)

El TPC se midió utilizando el método de Folin-Ciocalteu. Se añadieron 30 µl de solución de Folin-Ciocalteu (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido) a 140 µl de muestra, blanco o estándar y 140 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% (p/v) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania). La mezcla se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 hora y la absorbancia se midió a 750 nm en un lector Varioskan Flash. Se usó ácido gálico (Sigma Aldrich, Steinheim,

Alemania) como estándar en un rango de concentración de 1,4-20 ppm y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de muestra (ES).

### 3.8.5 Proteína soluble

La proteína soluble se determinó mediante el método BCA (ácido bicinónico) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, EE.UU.) ajustado al procedimiento de ensayo de microplacas. Brevemente, se mezclaron 10 µl de muestra o estándar (0-2,5 mg/ml BSA) con 200 µl de reactivo de trabajo BCA (50:1, Reactivo A: B) y se incubaron 30 minutos a 37 °C. La absorbancia se midió a 550 nm en un lector Varioskan Flash.

## 3.9 Extracción, hidrólisis y caracterización de proteínas de la biomasa de *Rhizopus*

### 3.9.1 Proceso de extracción

Se probaron tres métodos (denominados A, B y C) de extracción básica de proteína. El método A y B se basan en el protocolo descrito por Connolly *et al.* [286] para la extracción de proteína de BSG. El método C es el descrito por Safi *et al.* [287] utilizado para la extracción de proteína de microalgas mediante ultrasonidos. En todos los casos la biomasa se limpió con agua destilada (1:2 p/v) y se extrajo el agua pasándola por filtro de 300 µm. El flujo de trabajo y las condiciones de extracción están recogidas en la Figura 23.

En el método A se mezcló la biomasa con agua destilada (1:5,3 p/v) y se homogeneizó (25 segundos, 19500 rpm, Ultra-turrax IKA T18 Basic). Se dejó en agitación magnética durante 1 hora a Tª ambiente, se centrifugó (10000 g, 10 min, 10 °C) y se desechó el sobrenadante. Se mezcló el pellet con NaOH 0,1 M (1:5,3 p/v) a 50 °C, 1 hora y 30 minutos, se centrifugó (10000 g, 10 min, 10 °C) y se guardó el sobrenadante. Se bajó el pH del sobrenadante a pH=3,8 con HCL 4 M para que precipitasen las proteínas. Se centrifugó (10000 g, 10 min, 10 °C) y se recogió el pellet. Se disolvió el pellet con 30 ml de agua destilada y se ajustó a pH 7 con NaOH 4 M.

En el método B se mezcló la biomasa con agua destilada (1:5,3 p/v) y se homogeneizó (25 segundos, 19500 rpm, Ultra-turrax IKA T18 Basic). Se dejó en agitación magnética durante 1 hora a Tª ambiente, se centrifugó (10000 g, 10 min, 10°C) y se desechó el sobrenadante. Se mezcló el pellet con NaOH 0,1 M (1:5,3 p/v) a 50 °C, 1 hora, se centrifugó (10000 g, 10 min, 10°C) y se guardó el sobrenadante. Se realizó una segunda etapa de extracción mezclando el pellet con NaOH 0,1 M (1:5,3 p/v) 50 °C, 1 hora y se centrifugó

(10000 g, 10 min, 10°C). Se bajó el pH de los sobrenadantes a pH=3,8 con HCL 4 M para que precipitasen las proteínas. Se centrifugaron las muestras (10000 g, 10 min, 10 °C) y se recogió el pellet. Se disolvió el pellet en agua destilada y se ajustó a pH 7 con NaOH 4 M.

En el método C la biomasa se mezcló con agua a pH 12, se trató por ultrasonidos durante 3 minutos a 20 kHz (Sonics, Vibra-Cell Ultrasonic Processor, VC 750, Newtown, EE.UU.) y se realizaron dos extracciones consecutivas a 50 °C durante 1 hora, el resto del procedimiento no difiere.

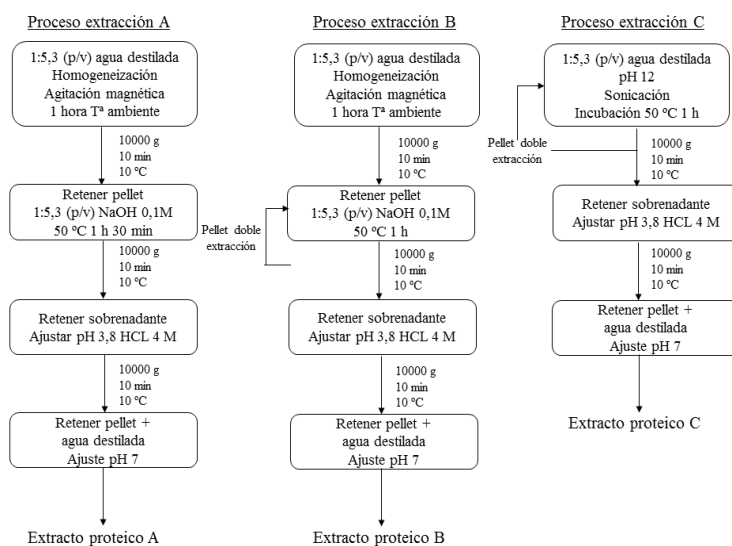


Figura 23. Esquema de los procesos A, B y C de extracción proteica.

Los extractos proteicos de las biomásas obtenidas a partir de la fermentación de melaza de naranja, lactosuero y lixiviado de frutas y verduras se obtuvieron mediante los procesos de extracción B.

### 3.9.2 Proceso de hidrólisis

Los extractos proteicos se centrifugaron (3000 g, 5 min, 10 °C), se estimó la proteína soluble mediante el método de BCA y se añadió la enzima (115 U/mg proteína). El pH de reacción se ajustó a pH  $7,5 \pm 0,2$  con 10% (v/v) con tampón fosfato potásico 5 M (Panreac Química SA, Barcelona, España) y la hidrólisis se llevó a cabo a 37 °C con agitación magnética tras la adición de la pancreatina (Pancreatina de páncreas porcino, 8 x USP, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania). Después de 0, 30, 60, 120 y 240 minutos, la enzima se inactivó por

inmersión en un baño a 85 °C durante 15 minutos, se centrifugó a 10000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se recogió como el hidrolizado proteico.

### 3.9.3 Determinaciones analíticas en los hidrolizados

Se utilizaron los métodos descritos anteriormente para determinar la proteína soluble (método BCA), el GH (método *o*-ftalaldehído), la actividad antibacteriana (método por difusión en agar) y la actividad antioxidante (actividad de captación de radicales DPPH) de los hidrolizados proteicos obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis.

El perfil de pesos moleculares se determinó mediante análisis por HPLC (columna Agilent Technologies, AdvancedBio SEC 130 Å, 2,7 µm 7,8 x 150 mm) en condiciones isocráticas (0,5 ml/min, 20 min, tampón fosfato 150 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 2 µl de muestra) y con un detector DAD (220 nm). El estándar de proteínas AdvancedBio SEC 130 (5190-9416, una mezcla de ovoalbúmina, mioglobina, aprotinina, neurotensina, angiotensina II) se utilizó como estándar de pesos moleculares según lo descrito por el fabricante (Agilent Technologies). El perfil molecular de los hidrolizados del extracto proteico de la biomasa crecida en lactosuero no se pudo determinar por falta de muestra.

## 3.10 Viabilidad técnico-económica

### 3.10.1 Factores técnicos y de mercado

Se realizó un análisis teórico sobre la adecuación nutricional de las harinas obtenidas de BSG y FVS (resultados y discusión apartado 4.6) a partir de la fermentación con *Rhizopus* sp. respecto a los niveles recomendados para alimentación en animales rumiantes, monogástricos y en acuicultura.

Tras el análisis teórico, se realizó un primer contraste con el sector de piensos para determinar la especie (o especies) animal a la que mejor se adaptan las características nutricionales del producto, la aceptación por parte del sector de piensos y el porcentaje de inclusión del nuevo producto en los piensos compuestos. Para ello se envió una ficha técnica de los productos fermentados a dos empresas de elaboración de piensos para su valoración.

### 3.10.2 Factores económicos

Para el estudio de viabilidad económica del plan de acción propuesto se tuvieron en cuenta los costes de inversión previstos en equipos e instalaciones y su puesta en marcha, gastos de personal, operación, transporte, control de calidad y marketing, ventas e ingresos esperados y subvenciones e impuestos. Estos datos se obtuvieron a partir de consultas con suministradores

de equipos, búsqueda en bases de datos, bibliografía o documentación recopilada previamente por el área de Procesos Eficientes y Sostenibles de la Fundación AZTI en diversos proyectos de investigación: Cleanfeed (LIFE09 ENV/ES/000473), Valorlact (LIFE11 ENV/ES/639) y Sumo (ELAC2014/BEE-0364).

En el caso de no disponer de precios reales de mercado, se estimaron teniendo en cuenta precios de equipos similares y/o aplicando fórmulas de cálculo de coste de producción por capacidad de tratamiento del equipo [288].

$$\frac{C}{C_0} = \left(\frac{V}{V_0}\right)^{(1-\alpha)} \text{ (eq. 8)}$$

Donde C es el coste de construcción, V es la capacidad de tratamiento para ese coste y  $\alpha$  es un índice de escala. La ecuación muestra que el coste de construcción es proporcional a la potencia  $(1-\alpha)$  de la capacidad de la instalación. Si  $\alpha = 0$ , C es proporcional a V, es decir, no hay beneficio de escala. De lo contrario, a medida que se aproxima a 1 (es decir, cuando  $1 - \alpha$  se acerca a cero), la economía de escala aumenta. En general, el valor de  $(1-\alpha)$  es aproximadamente 0,6-0,7 [289,290].

Para conocer los costes asociados a la gestión de los descartes se solicitó información al Director de Operaciones e Ingeniería de Mercabilbao quien nos proporcionó información detallada de dicha gestión.

La vida útil de la línea se estimó en 10 años y la tasa de descuento y el incremento anual en costes e ingresos se fijó en 5% y 3% respectivamente.

Como indicadores económicos para evaluar la viabilidad económica del proceso se utilizaron el beneficio bruto (EBIDTA), el beneficio neto, el valor actual neto (VAN), la tasa interna de retorno (TIR) y el periodo de retorno.

Muy brevemente, el beneficio bruto es la diferencia entre el ingreso anual y el costo de operación anual, mientras que el beneficio neto también tiene en cuenta los impuestos, intereses de los préstamos y las amortizaciones. El VAN determina si el escenario es rentable en un cierto periodo de tiempo (vida útil del escenario) al descontar los flujos de caja del valor presente.

Un VAN positivo indica que el proceso es rentable. El TIR es la tasa de descuento a la cual el valor de VAN es cero. El TIR se usa comúnmente para indicar la eficiencia o el rendimiento de una inversión y el periodo de retorno es el tiempo requerido para recuperar el costo de la inversión [291].

Asimismo, debido a la posible fluctuación de variables como los gastos de procesado, la inversión, los precios de venta y los precios de gestión de residuos, se realizó un análisis de sensibilidad para evaluar el impacto de cada variable en el desempeño económico del proceso planteado. Para ello se establecieron unos máximos y unos mínimos para cada variable, fijados en un  $\pm 20\%$  [291] respecto al valor estimado como más probable. El objetivo principal de estas simulaciones es conocer las variables que mayor impacto tienen en los indicadores económicos estudiados.

### **3.10.3 Factores legislativos**

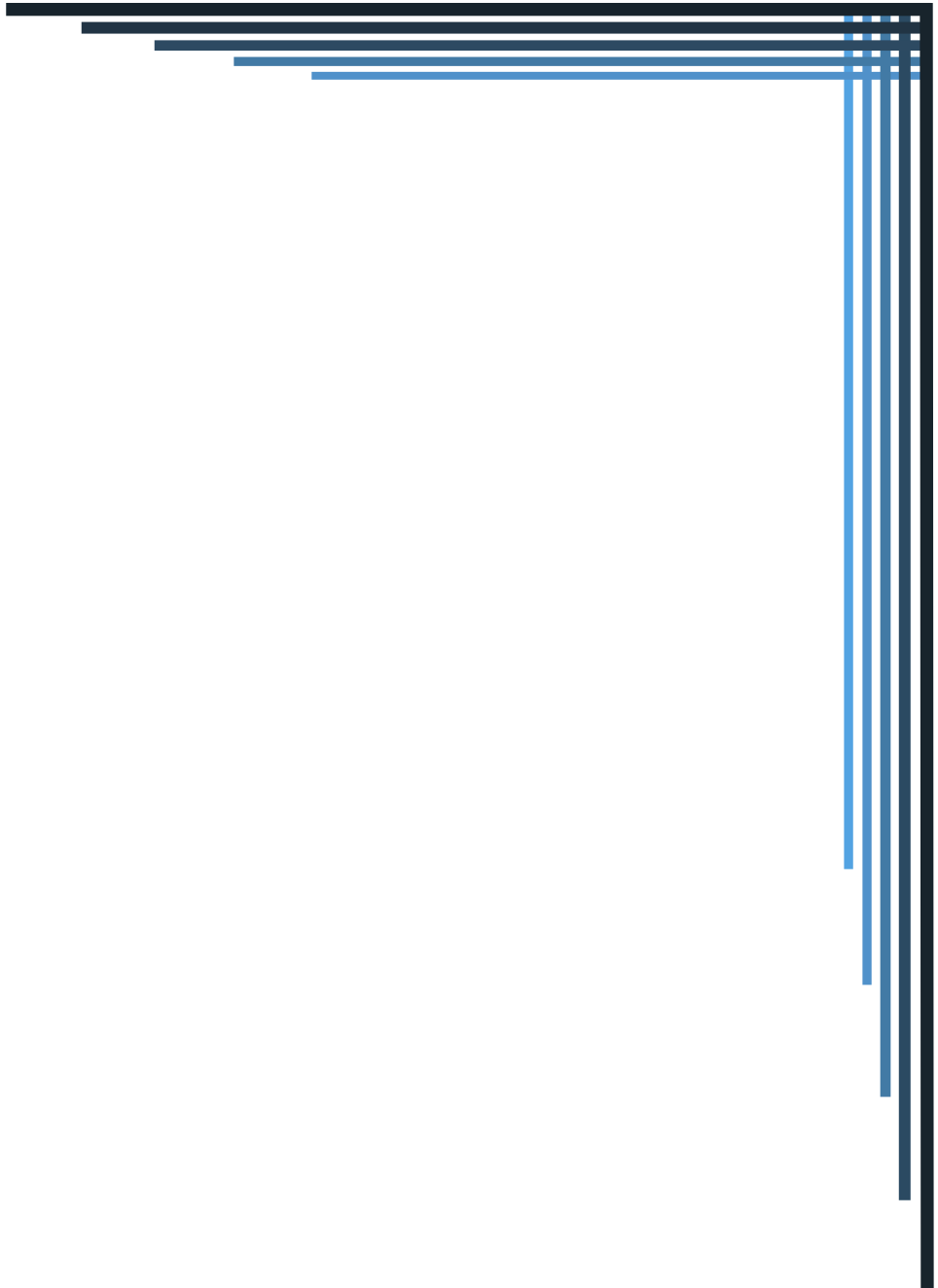
Se consultó al panel FEEDAP (The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed) para solicitar información acerca de la inclusión de una nueva materia prima al catálogo de materias primas para piensos regulada por el reglamento (UE) 2017/1017 [16].

### **3.11 Análisis estadístico**

Las diferencias entre los grupos fueron establecidas mediante el test ANOVA de una vía (análisis de la varianza) y mediante el Test de la t de Student en función de los grupos a comparar. La normalidad de los datos se determinó mediante el test de Shapiro Wilk. En los casos en los que las varianzas no eran iguales (calculado a través del Test de Levene), se empleó el estadístico robusto de comparación de medias de Welch. La obtención de estos resultados se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS (IBM Corp. V 24.0, Nueva York, EE.UU.).



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN





La sección de resultados de esta tesis está dividida en 7 apartados. Cuatro de ellos están pensados como publicaciones científicas independientes (del 4.2 al 4.5) y han sido aceptadas (apartado 4.2), enviadas (apartados 4.3 y 4.4) o están en proceso de ser enviadas (apartado 4.5) a revistas científicas. Los tres restantes (apartados 4.1, 4.6 y 4.7) están escritos en castellano y están pensados como informes con sus resultados y su discusión. Los apartados 4.1, 4.2 y 4.3 se solaparon en el tiempo y explican los resultados de los experimentos desarrollados como apertura de una nueva línea de investigación para evaluar el potencial de las cepas seleccionadas en los procesos de fermentación. Los apartados 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7 se desarrollan en el último periodo de la tesis, y se plantearon como la aplicación de los conocimientos adquiridos en los apartados anteriores. A modo de guía, esta es la estructura de la sección de resultados y discusión.

- El **apartado 4.1** describe el aislamiento de cepas ambientales, su identificación y caracterización y los procedimientos para aislar cepas mutantes con capacidades mejoradas. Además, es una primera búsqueda de productos de valor a partir de fermentaciones con *Rhizopus* sp.
- El **apartado 4.2** describe la generación de un primer modelo de SSF con *Rhizopus oryzae*. Se identifica el rango óptimo de temperatura, el efecto del tiempo, la adición de fuentes de nitrógeno y el efecto de la densidad de sustrato. Se obtiene una primera ecuación de productividad.
- El **apartado 4.3** recoge la utilización de un diseño compuesto central rotativo (Central Composite Rotary Design) y el análisis mediante superficie de respuesta (Response Surface Methodology, RSM) para la generación de un modelo de SmF y su validación en diferentes subproductos, como son el lactosuero y las melazas de naranja. La biomasa de hongo se muestra como un producto adecuado para la alimentación animal y cuya producción es predecible en base a parámetros tecnológicos.
- En el **apartado 4.4** se utiliza un diseño factorial y RSM para identificar las mejores condiciones de valorización del BSG mediante SSF. Este subproducto, presente en grandes cantidades, se ve muy enriquecido tras la fermentación.
- A lo largo del **apartado 4.5**, se agrupa lo aprendido hasta el momento sobre el metabolismo de *Rhizopus* y se aplica a una valorización integral de restos de frutas y verduras, combinando SmF y SSF. Los resultados muestran que un aprovechamiento

completo es posible, y que la fermentación con *Rhizopus* sp. puede utilizarse como una estrategia completa de valorización.

- En el **apartado 4.6** se explican las diferentes pruebas preliminares de escalado del proceso de SSF y el estudio de la viabilidad técnico-económica. Una primera aproximación muestra un resultado positivo desde el punto de vista económico.
- El **apartado 4.7** explica los resultados obtenidos mediante hidrólisis de las diferentes biomásas obtenidas, los péptidos resultantes y sus posibles aplicaciones. La proteína se extrae de manera eficaz y se hidroliza en péptidos de tamaño pequeño, si bien no se han encontrado péptidos con actividad antibacteriana y antioxidante.
- Finalmente, se incluye una discusión general de los resultados de la tesis, intentando aportar una visión general de los resultados obtenidos durante los procesos anteriores y aportando lo que, a mi entender, pueden ser líneas de continuación del trabajo presentado.

## **4.1: Selección de cepas de *Rhizopus* sp.: herramienta biotecnológica para la producción de compuestos de valor añadido**



La mutagénesis al azar es una herramienta poderosa para alterar la funcionalidad de un gen o para aumentar la productividad de los procesos metabólicos. Esta técnica se ha aplicado en cepas de *Rhizopus* sp. utilizando agentes mutágenos químicos, como la N-metil-N-nitro-nitroso-guanidina [93], y mutágenos físicos, por ejemplo, luz UV y radiación gamma con  $^{60}\text{Co}$ , para aumentar la producción de ácido láctico [184]. Tanto las técnicas basadas en agentes físicos como químicos requieren métodos de detección eficientes para facilitar la selección de los mutantes deseados [273,292,293]. En este apartado se muestran los resultados de un programa de mutaciones al azar enfocado a obtener cepas con mayor producción de biomasa, mayor proporción de proteínas y mayor producción de ácidos orgánicos durante la fermentación.

### 1 Aislamiento y selección preliminar de cepas

Tal y como se describe en materiales y métodos se realizaron tres pases de aislamiento para aislar las colonias similares a *Rhizopus* y se seleccionaron las colonias aisladas de manzana y una de las muestras de higo como posibles cepas de *Rhizopus* sp. Tras la identificación genética, las colonias aisladas de higo (Figura 24) y manzana se identificaron con un 100% de probabilidad como *Rhizopus* sp.



Figura 24. Pieza de higo utilizada para el aislamiento de la cepa ROR003.

La cepa aislada de la muestra de higo se identificó internamente como ROR003 y la de manzana como ROR004.

Cuando se cultivaron las cepas ROR001, ROR003 y ROR004 a 30 °C, la capacidad de crecimiento (medida como el diámetro de la hifa en PDA) es similar entre todas las cepas (resultados no mostrados). A 9 °C, en cambio, la cepa ROR003 parece crecer más rápido

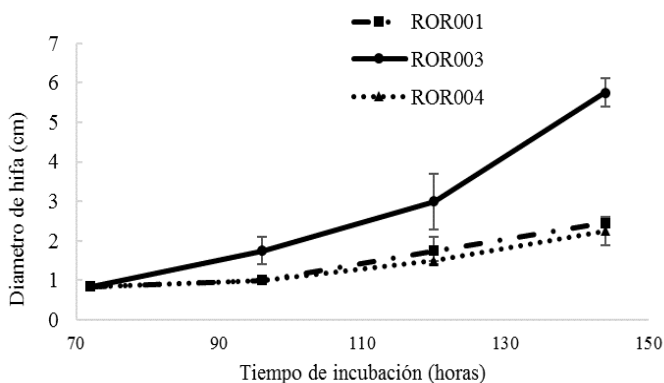


Figura 25. Diferencias en la capacidad de crecimiento de las cepas ROR001, ROR003 y ROR004 en agar PDA a 9 °C y diferentes tiempos de incubación. Las barras de error representan DE (n=2).

que las cepas ROR001 y ROR004 (Figura 25), dando como resultado un crecimiento 3 veces mayor en este tiempo. Ninguna de las cepas aisladas puede crecer a 5 °C en PDA.

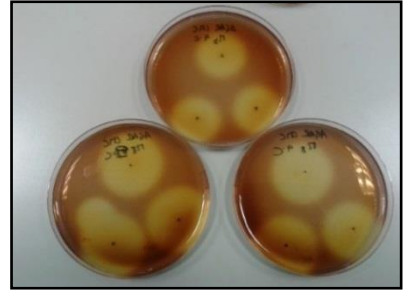


Figura 26. Diferencias en la producción de celulasas de ROR001, ROR003 y ROR004 en agar CMC (5 °C día 20).

Al crecer en agar CMC, se observa un claro halo cuando se producen las celulasas (Figura 26). En medio CMC completo, (CMC + extracto de levadura y triptona), todas las cepas muestran una actividad celulasa similar a 9 °C, pero la cepa ROR001 tiene una actividad significativamente menor a 5°C (Figura 27).

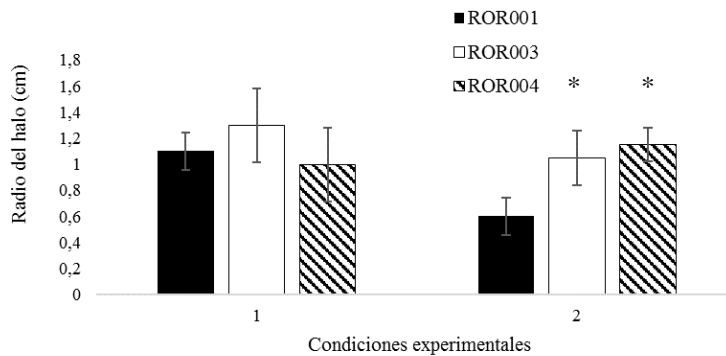


Figura 27. Diferencias en la actividad celulasa de las cepas ROR001, ROR003 y ROR004 en agar CMC completo en la condición 1 (9 °C, día 15) y en la condición 2 (5 °C, día 20). Las barras de error representan la DE (n=2). \* Representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En medio pobre (solo CMC), las cepas ROR001 y ROR004 tienen mayor actividad celulasa que la cepa ROR003 a 9 °C y todas ellas presentan una producción de celulasas similar a 5 °C (Figura 28). La actividad celulasa es un parámetro importante cuando se utilizan subproductos vegetales como fuente de carbono. La cepa ROR004 ha demostrado una buena relación entre el crecimiento a bajas temperaturas y actividad celulasa en un medio pobre y, por lo tanto, se considera la más adecuada para las siguientes aplicaciones.

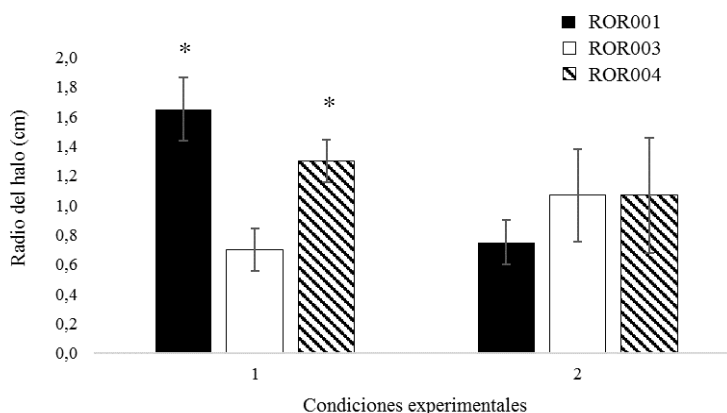


Figura 28. Diferencias en la actividad celulasa de las cepas ROR001, ROR003 y ROR004 en agar CMC en la condición 1 (9 °C, día 15) y en la condición 2 (5 °C, día 20). Las barras de error representan la DE (n=2). \* Representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

## 2 Proceso de mutación

Se seleccionó la cepa ROR004 para el proceso mutagénico, tanto con tratamientos físicos como con químicos durante diferentes tiempos de exposición. Tras la exposición a los diferentes mutágenos, las células viables se recuperaron en un cultivo en PDA durante 48 horas a 20 °C. La tasa de supervivencia (Figura 29) muestra que la exposición a MNNG llega a una mayor reducción de ufc en el tiempo de exposición más corto (50 min) en comparación con la exposición a UV y BE. Se consideraron 91 posibles mutantes para un análisis adicional: 23 colonias aisladas después de la exposición con BE durante 90 minutos, 23 colonias después del tratamiento con BE durante

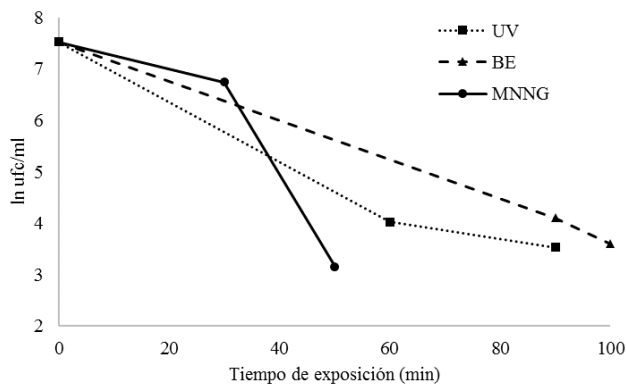


Figura 29. Curva de supervivencia de la cepa ROR004 sometida a agentes mutágenos (MNNG, UV y BE).

100 minutos, 15 colonias después de la exposición con UV durante 60 minutos, 10 colonias después de la exposición con UV durante 90 minutos, 18 colonias después del contacto con MNNG durante 30 minutos y 2 colonias después del contacto con MNNG durante 50 minutos.



Cada colonia aislada (91 mutantes + la cepa control ROR004) se cultivó en caldo PBC durante 24 horas a 20 °C con agitación (140 rpm). De esas cepas, 15 (nombradas de la A a la O) produjeron un cambio de color púrpura a color amarillo (demostrando una alta capacidad de producción de ácido) antes o al mismo tiempo que la cepa salvaje y se seleccionaron para continuar con el proceso. En una segunda ronda, las cepas más prometedoras fueron reevaluadas en caldo PBC (100 µl del inóculo anterior en 3 ml de caldo fresco) durante 24 horas a 20 °C con agitación (140 rpm).

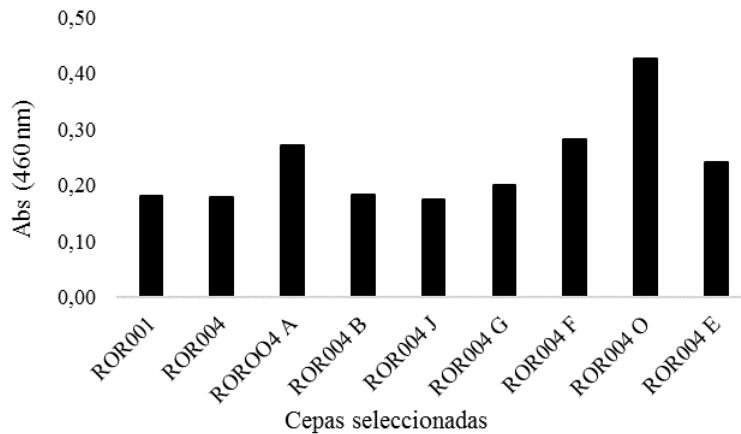


Figura 30. Desarrollo de color amarillo (Abs 460 nm) en caldo PBC.

De esas cepas, las cepas ROR004 A, ROR004 B, ROR004 E, ROR004 F, ROR004 G, ROR004 J y ROR004 O se seleccionaron para una caracterización adicional debido al rápido desarrollo del color amarillo en el caldo. La intensidad de color amarillo durante la SmF se midió por absorbancia a 460 nm. La cepa ROR004 O parece tener una absorbancia mayor a 460 nm (Figura 30). La producción de ácido en sustratos sólidos se controló en agar PBC. Las cepas seleccionadas se cultivaron en agar PBC (2 puntos de inoculación de 10 µl) y se midió el diámetro del halo producido tras 24 horas a 20 °C (Figura 31). Las cepas ROR004 A, ROR004 B, ROR004 F y ROR004 O parecen producir mayores halos que el control (Figura 32), si bien no se

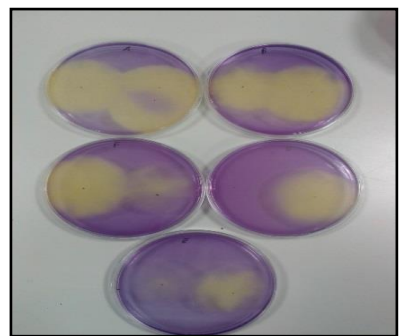


Figura 31. Producción de halo amarillo en agar PBC debido a la producción de ácido.

encuentran diferencias estadísticamente significativas. Las cepas ROR004 J y ROR004 G no produjeron halos en agar PBC.

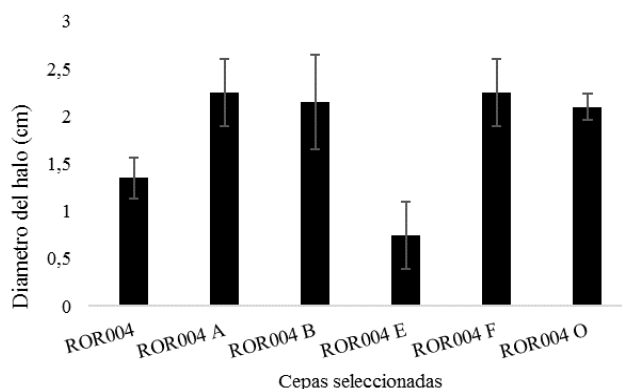


Figura 32. Producción de halo amarillo (cm/24 h) en agar PBC. Las barras de error representan la DE (n=2).

La tasa de crecimiento fúngico en medio sólido se midió como la tasa de producción de hifas (diámetro) en PDA. La cepa salvaje ROR004 y las posibles cepas mutantes ROR004 G, ROR004 J y ROR004 E mostraron las mayores tasas de crecimiento (resultados no mostrados).

### 3 Caracterización bioquímica

Las cepas mutantes seleccionadas y las cepas salvajes se sometieron a una caracterización profunda para evaluar su capacidad industrial.

En primer lugar, se determinó la capacidad de la cepa comercial (ROR001), las cepas salvajes (ROR004 y ROR003) y las cepas mutantes (ROR004 A, ROR004 B, ROR004 O, ROR004 F, ROR004 G, ROR004 E y ROR004 J) para producir ácidos orgánicos (ácido cítrico, láctico, fumárico y málico) [185,294]. Los resultados demuestran que las cepas de *Rhizopus* seleccionadas son productoras de ácido fumárico y málico y que no producen ácido láctico o cítrico a un nivel significativo. (Tabla 7). Esto está de acuerdo con lo publicado con Abe *et al.* [295], que dividieron las cepas de *R. oryzae* en dos grupos, las cepas LA (productoras de ácido láctico) y las cepas FMA (productoras de ácido fumárico-málico). Como explican Saito *et al.* [296], esta situación se debe a la ausencia de dos genes, *ldhA* y *ldhB*, que codifican la lactato deshidrogenasa, una enzima clave en la ruta de producción de ácido láctico. A nivel estadístico, la cepa ROR004 produce un contenido de ácido fumárico significativamente mayor (g/l) que la cepa ROR004 G, pero no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre

otras cepas con respecto a la producción de ácidos orgánicos (Tabla 7). La cepa ROR004 y los posibles mutantes ROR004 A, ROR004 B y ROR004 O son las cepas más prometedoras, ya que parecen producir un contenido mayor de ácido fumárico ( $53,8 \pm 3,2$ ,  $48,6 \pm 10,2$ ,  $40,6 \pm 4,2$ ,  $40,2 \pm 5,8$  g/l respectivamente).

La producción de ácido fumárico obtenida, siempre mayor a 26,7 g/l, es superior a la obtenida por otros autores [186,297], pero baja en comparación con las productividades obtenidas cuando se optimizan los parámetros de producción en medios sintéticos. Otros autores han publicado estudios para optimizar las condiciones de producción de ácido fumárico, obteniendo rendimientos de 14,7 a 107,0 g/l en medios sintéticos optimizados [189,298-301]. En este medio de crecimiento para la producción de ácidos orgánicos, no se agregó nitrógeno adicional y el nitrógeno disponible fue el derivado de la biomasa recolectada del cultivo inicial. Esta escasez de nitrógeno da como resultado una alta producción de ácido fumárico. Según lo descrito por otros autores, el factor más importante para promover la producción de ácido fumárico en *R. oryzae* es una alta relación C:N (120: 1- 150: 1) [185]. Agregar un agente neutralizante como  $\text{CaCO}_3$  o desarrollar un proceso simultáneo de fermentación y separación que evite el uso de agentes neutralizantes mientras previene la inhibición del producto y mantiene un alto nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación también son estrategias posibles para mejorar el rendimiento [186,187]. En condiciones anaeróbicas, *R. oryzae* forma etanol y otros subproductos de fermentación no deseados [17], alejando el carbono de la vía del fumarato. Los niveles más altos de oxígeno limitarían la cantidad de etanol producido y, por lo tanto, conducirían a mayores rendimientos de fumarato.

La producción de ácido fumárico se ha aplicado a la fermentación de desechos orgánicos, como el hidrolizado de salvado de trigo [302], recursos de la producción de biodiesel y de la producción de azúcar de caña [303], residuos de comida de restaurantes, cocinas y cafeterías [304], material lignocelulósico [173], aguas residuales de cervecería [305] y subproductos de la industria de frutas [182]. En estos casos, la producción final de ácido fumárico osciló entre 25 y 40 g/l. Nuestras cepas más prometedoras producen un contenido alto de ácido fumárico en condiciones de matraz de agitación (40,2 - 53,8 g/l) y, por lo tanto, podrían ser posibles candidatas para los procesos de optimización como herramienta biotecnológica para el tratamiento de residuos y producción de ácido fumárico.

La concentración de proteína no difiere significativamente entre las cepas estudiadas en este medio, aunque tiende a ser mayor en ciertos casos (ROR004 G, ROR004 E y ROR004 J, Tabla 7). Las cepas ROR004 G y ROR004 J producen una cantidad de biomasa

significativamente mayor que las cepas ROR004 E y ROR004 F, y la cepa ROR004 J, un rendimiento de proteína significativamente mayor (g/l) en comparación con la cepa ROR004 F. Buscando la aplicación en la industria alimentaria, la concentración de proteína de la biomasa es un parámetro muy importante y, por lo tanto, las cepas mutantes más prometedores son las cepas ROR004 J y ROR004 G, con una alta producción de biomasa y una alta concentración de proteínas, lo que resulta en un alto rendimiento proteico (Tabla 7).

Cuando se utiliza un medio optimizado con las cepas mutantes, la cepa ROR004 G es la que tiene un rendimiento de biomasa y una producción de biomasa significativamente mayor ( $0,30 \pm 0,03$  g ES/g de glucosa consumida y  $5,1 \pm 0,3$  g ES/l respectivamente) (Tabla 8). La cepa ROR003 produce un contenido de proteína significativamente mayor ( $34,4 \pm 2,8\%$  ES) que la cepa ROR001 ( $18,0 \pm 1,6\%$  ES), si bien no hay diferencias significativas entre el contenido de proteínas del resto de cepas (Tabla 8). El rendimiento de proteína (g proteína/l) es significativamente mayor en la cepa ROR004 G ( $1,5 \pm 0,3$  g / l) y mínimo en ROR001 ( $0,6 \pm 0,1$  g / l). En este caso, una fuente de nitrógeno en el medio es vital y se necesita una relación C:N más baja, con un medio balanceado que tenga una relación C:N de 10:1 o inferior para garantizar un alto contenido de proteínas [306]. En todos los casos, la glucosa presente

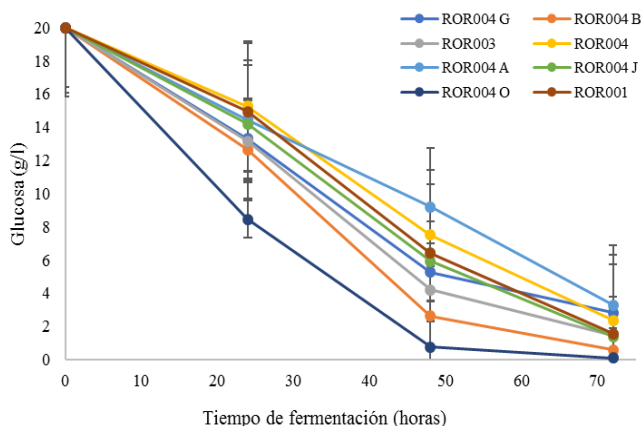


Figura 33. Concentración de glucosa (g/l) en el medio de fermentación durante las condiciones de producción de biomasa y proteína en. Las barras de error representan DE ( $n=3$ ).

en el medio después de 72 horas está por debajo de 4 g/l, lo que implica una reducción de al menos el 75% de la concentración inicial. El consumo de glucosa durante la fermentación difiere significativamente entre las cepas (Figura 33), aunque esas diferencias son menores a las 72 horas, donde el consumo de

glucosa solo difiere significativamente entre la cepa ROR004 A y ROR004 B.

En este caso, las cepas ROR004 J y ROR004 G son las cepas seleccionadas cuando la SmF se enfoca a la producción alta de biomasa y proteínas.

Tabla 7. Producción de biomasa (g ES/l), proteína (% ES), rendimiento proteico (g/l), consumo glucosa (%) y producción de ácidos orgánicos (g/l; ácido fumárico, ácido málico, ácido láctico y ácido cítrico) en las cepas seleccionadas durante la SmF ajustada a la producción de ácidos orgánicos.

Cepa	Biomasa	Proteína	Rendimiento proteico	Consumo glucosa	Ácido fumárico	Ácido málico	Ácido láctico	Ácido cítrico
ROR001	3,7 ± 1,2 <sup>ab</sup>	13,2 ± 2,8 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>	96,1 ± 3,6 <sup>a</sup>	41,2 ± 15,7 <sup>ab</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	<0,05	<0,05
ROR003	5,2 ± 1,9 <sup>ab</sup>	11,1 ± 1,0 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>ab</sup>	97,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	38,6 ± 0,0 <sup>ab</sup>	ND	ND	ND
ROR004	5,9 ± 1,4 <sup>ab</sup>	9,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>ab</sup>	95,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	53,8 ± 3,2 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	<0,05	<0,05
ROR004 A	5,9 ± 1,1 <sup>ab</sup>	13,1 ± 2,6 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>ab</sup>	97,3 ± 1,8 <sup>a</sup>	48,6 ± 10,2 <sup>ab</sup>	3,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	<0,05	<0,05
ROR004 B	4,6 ± 0,2 <sup>ab</sup>	13,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,0 <sup>ab</sup>	93,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	40,6 ± 4,2 <sup>ab</sup>	2,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	<0,05	<0,05
ROR004 O	3,7 ± 0,0 <sup>ab</sup>	13,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>ab</sup>	93,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	40,2 ± 5,8 <sup>ab</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	<0,05	<0,05
ROR004 F	2,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	11,9 ± 2,8 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	93,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	30,6 ± 0,0 <sup>ab</sup>	ND	ND	ND
ROR004 G	5,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	16,0 ± 5,6 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,3 <sup>ab</sup>	95,7 ± 2,1 <sup>a</sup>	26,7 ± 6,2 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
ROR004 E	3,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	17,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>ab</sup>	96,4 ± 2,8 <sup>a</sup>	29,0 ± 0,2 <sup>ab</sup>	ND	ND	ND
ROR004 J	6,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	15,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	92,1 ± 1,8 <sup>a</sup>	27,1 ± 4,8 <sup>ab</sup>	ND	ND	ND

ND: no determinado; misma letra en la misma columna significa que no hay diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza; los valores se expresan como el valor medio ± DE (n= 2).

*Tabla 8. Consumo de glucosa (%), producción de biomasa (g ES/l), rendimiento de la biomasa (g ES/g glucosa consumida), proteína (% ES) y rendimiento proteico (g/l) en las cepas seleccionadas durante la SmF ajustada a la producción de proteína (C:N 10,7).*

Cepa	Consumo de glucosa	Biomasa	Rendimiento de la biomasa	Proteína	Rendimiento proteico
ROR001	92,1 ± 5,4 <sup>ab</sup>	3,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	18,0 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>
ROR003	92,6 ± 7,7 <sup>ab</sup>	3,9 ± 0,9 <sup>ab</sup>	0,21 ± 0,06 <sup>ab</sup>	34,4 ± 2,8 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>bc</sup>
ROR004	88,1 ± 8,2 <sup>ab</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>a</sup>	25,1 ± 9,6 <sup>ab</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>ab</sup>
ROR 004 A	83,5 ± 9,5 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	24,6 ± 3,8 <sup>ab</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>abc</sup>
ROR 004 B	98,2 ± 3,4 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,04 <sup>a</sup>	24,3 ± 5,8 <sup>ab</sup>	0,9 ± 0,3 <sup>abc</sup>
ROR 004 G	85,9 ± 4,8 <sup>ab</sup>	5,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>b</sup>	28,7 ± 3,3 <sup>ab</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>c</sup>
ROR 004 J	93,1 ± 5,7 <sup>ab</sup>	3,9 ± 0,2 <sup>ab</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	28,6 ± 2,3 <sup>ab</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>abc</sup>
ROR 004 O	99,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>a</sup>	24,5 ± 1,6 <sup>ab</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>ab</sup>

Misma letra en la misma columna significa que no hay diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza; los valores se expresan como el valor medio ± DE (n= 3).

La SmF con aireación forzada se llevó a cabo en las mismas condiciones que las óptimas para producción de biomasa y proteínas del apartado 4.3 de resultados y discusión (Tabla 19, condición 10) El suministro insuficiente de oxígeno aumenta la demanda nutricional y, por lo tanto, disminuye el crecimiento de hongos [306]. Los resultados demuestran que no hay diferencias significativas en el consumo de glucosa (hasta el 99% en todos los casos) y la producción de biomasa entre las cepas (Tabla 9). La producción de proteínas y el rendimiento proteico, de lo contrario, son más altos en las cepas salvajes (Tabla 9).

*Tabla 9. Consumo de glucosa (%), producción de biomasa (g ES/l), rendimiento de la biomasa (g ES/g glucosa consumida), proteína (% ES) y rendimiento proteico (g/l) en las cepas seleccionadas durante la SmF con aireación forzada (C:N 3,4).*

Cepa	Consumo glucosa	Biomasa	Rendimiento de biomasa	Proteína	Rendimiento proteico
ROR003	99,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	10,8 ± 6,2 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,20 <sup>a</sup>	31,6 ± 1,9 <sup>ab</sup>	3,4 ± 0,2 <sup>ab</sup>
ROR004	99,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,0 ± 1,9 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,06 <sup>a</sup>	42,1 ± 5,2 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,5 <sup>b</sup>
ROR004 J	99,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,06 <sup>a</sup>	32,9 ± 6,2 <sup>ab</sup>	2,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
ROR004 G	99,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	28,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,0 <sup>a</sup>

Misma letra en la misma columna significa que no hay diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza; los valores se expresan como el valor medio ± DE (n= 2, excepto ROR004 n=6).

Si se comparan las tres diferentes condiciones de fermentación sumergida utilizadas en este apartado.(condición 1: SmF con agitación, medio para producción ácidos orgánicos; condición 2: SmF con agitación, medio producción biomasa y proteína; condición 3 SmF con flujo aire, medio producción biomasa y proteína, Tabla 10), se observa que la biomasa recolectada es mayor en la mayoría de los casos en la condición 3, donde la relación C:N es 3,4 y el tiempo de fermentación es de 120 horas. Se puede especular que el mayor tiempo de incubación en la condición 1 compensa el menor ratio C:N de la condición 2. En general, la concentración de proteína es significativamente mayor en las condiciones 2 y 3 en comparación con la condición 1, excepto en la cepa ROR004 G, si bien se observa como tiempos largos de incubación incrementan el rendimiento proteico. El consumo de glucosa siempre es mayor que 83,5 ± 9,5 % y no hay diferencias significativas entre las distintas condiciones, excepto en la cepa ROR004 O (Tabla 10). A modo de conclusión, se puede afirmar que el tiempo de fermentación es crítico para una alta producción de biomasa y su efecto es mayor que la composición del medio. Sin embargo, la composición del medio es crítica para la producción de proteínas y, en este caso, el tiempo no es un factor clave, ya que el período de incubación más alto no conduce a una mayor producción de proteínas.

Tabla 10. Efecto de las condiciones de fermentación en la biomasa (g ES/l), rendimiento de la biomasa (g ES/g glucosa consumida), proteína (% ES), rendimiento proteico (g/l) y consumo de glucosa (%).

	Condición	ROR004	ROR004 A	ROR004 B	ROR004 O	ROR004 G	ROR004 J	ROR003
Biomasa	1	5,9 ± 1,4 <sup>ab</sup>	5,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,2 ± 1,9 <sup>a</sup>
	2	3,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,9 <sup>a</sup>
	3	9,0 ± 1,9 <sup>b</sup>				9,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	8,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	10,8 ± 6,2 <sup>a</sup>
Rendimiento biomasa	1	0,07 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>
	2	0,19 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,06 <sup>a</sup>
	3	0,28 ± 0,06 <sup>b</sup>				0,29 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,20 <sup>a</sup>
Proteína	1	9,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	13,1 ± 2,6 <sup>a</sup>	13,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	13,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,0 ± 5,6 <sup>a</sup>	15,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	11,1 ± 1,0 <sup>a</sup>
	2	25,1 ± 9,6 <sup>b</sup>	24,6 ± 3,8 <sup>b</sup>	24,3 ± 5,8 <sup>b</sup>	24,5 ± 1,6 <sup>b</sup>	28,7 ± 3,3 <sup>a</sup>	28,6 ± 2,3 <sup>b</sup>	34,4 ± 2,8 <sup>b</sup>
	3	42,1 ± 5,2 <sup>c</sup>				28,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	32,9 ± 6,2 <sup>b</sup>	31,6 ± 1,9 <sup>b</sup>
Rendimiento proteico	1	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
	2	0,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>a</sup>
	3	3,8 ± 0,5 <sup>b</sup>				2,7 ± 0,0 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,2 <sup>b</sup>
Consumo de glucosa	1	95,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	97,3 ± 1,8 <sup>a</sup>	93,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	93,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	95,7 ± 2,1 <sup>a</sup>	92,1 ± 1,8 <sup>a</sup>	97,7 ± 1,1 <sup>a</sup>
	2	88,1 ± 8,2 <sup>a</sup>	83,5 ± 9,5 <sup>a</sup>	98,2 ± 3,4 <sup>a</sup>	99,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	85,9 ± 4,8 <sup>a</sup>	93,1 ± 5,7 <sup>a</sup>	92,6 ± 7,7 <sup>a</sup>
	3	99,6 ± 0,1 <sup>a</sup>				99,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	99,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	99,1 ± 0,5 <sup>a</sup>

Misma letra en la misma columna significa que no hay diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza; los valores se expresan como el valor medio ± DE (condición 1 n=2, condición 2 n=3 y condición 3 n=2 excepto ROR004 n=6).



Finalmente, se analizó el perfil de AG de la biomasa fúngica, ya que también es un factor importante en su aplicación como materia prima de alto valor (Tabla 11). No se ha realizado el análisis estadístico debido a que los resultados son replicación de análisis (3) y no experimentales. Los AG más comunes son el ácido oleico (C18:1), el ácido palmítico (C16:0), el ácido esteárico (C18:0) y el ácido linoleico (C18: 2n-6), de acuerdo con estudios previos [307,308]. La cepa ROR001 produce, aparentemente, una menor proporción de C16:0 (14%) y C18:0 (8,3%) y una mayor proporción de C18:1 (58,7%) y C18:2n-6 (9,1%) que el resto de las cepas. Además, los resultados conducen, aparentemente, a diferencias en la proporción total de SFA, siendo esta proporción 1,5 veces menor en la cepa ROR001 que en el resto de las cepas.

Parece claro que la selección de la cepa es un paso crítico dependiendo del producto deseado. Las cepas de tipo salvaje, ROR003 y ROR004, son las seleccionadas como prometedoras por su capacidad de crecimiento a bajas temperaturas y bajas condiciones de nutrientes para la SSF. Las cepas expuestas al proceso mutagénico no producen mayores cantidades de ácidos orgánicos, aunque las cepas ROR004, ROR004 A, ROR004 B y ROR004 O son las cepas más prometedoras con una producción de ácido fumárico superior a 40 g/l. Para la producción de biomasa y proteínas, las cepas de tipo salvaje (ROR003 y ROR004) y ROR004 G y ROR004 J son las cepas más prometedoras con una producción de biomasa fúngica de más de 8 g/l, si bien la mayor concentración y mejor rendimiento proteico final se obtienen con la cepa salvaje ROR004.

La biomasa y las proteínas se ven claramente afectadas por el tiempo de incubación y la proporción C:N. El alto tiempo de fermentación y una relación C:N de 10,7 o menor conducen a una mayor producción de biomasa (g/l), una mayor concentración de proteína (%) y un mayor rendimiento proteico (g/l). Sin embargo, la producción de ácidos orgánicos se debe hacer con un alto C:N mayor.

De cara a un enfoque real, y dependiendo de la composición de los residuos orgánicos, la estrategia podría dirigirse a la producción de ácido fumárico (alto contenido de carbono y bajo contenido de nitrógeno) o la producción de biomasa y proteínas (menor relación C:N). También debe estudiarse el tiempo de fermentación, equilibrando los costes operacionales y los productos químicos producidos, la productividad final de la biomasa y la calidad del perfil.

Tabla 11. Perfil de AG (% total AG) de las cepas estudiadas.

FA	ROR001	ROR003	ROR004	ROR004 A	ROR004 B	ROR004 G	ROR004 J	ROR004 O
14:0	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,3
16:0	14, ± 0,0	20,6 ± 0,1	20,5 ± 0,1	21,5 ± 0,3	23,5 ± 0,4	22,9 ± 0,2	23,4 ± 0,1	23,7 ± 0,2
16:1	2,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1	<LD	0,8 ± 0,0	2,1 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,7 ± 0,0
18:0	8,3 ± 0,0	21,8 ± 0,1	22,9 ± 0,0	24,0 ± 0,1	18,4 ± 0,1	22,7 ± 0,1	23,0 ± 0,1	21,1 ± 0,1
18:1	58,7 ± 0,0	42,0 ± 0,1	42,1 ± 0,2	41,8 ± 0,2	37,9 ± 0,2	39,5 ± 0,2	38,9 ± 0,2	38,4 ± 0,3
18:2n-6	9,1 ± 0,0	6,5 ± 0,0	6,7 ± 0,1	5,4 ± 0,0	7,9 ± 0,1	5,4 ± 0,0	6,2 ± 0,0	6,9 ± 0,0
18:3n-6	3,8 ± 0,0	2,2 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0	4,2 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,8 ± 0,0	2,6 ± 0,0
18:3n-3	0,7 ± 0,0	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
20:0	0,5 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0
20:1n-9	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0
22:0	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0
24:0	1,3 ± 0,0	2,1 ± 0,0	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,0	2,9 ± 0,1	2,5 ± 0,0	2,9 ± 0,0
SFA	25,5 ± 0,0	47,6 ± 0,1	48,2 ± 0,1	50,6 ± 0,2	47,7 ± 0,2	51,5 ± 0,1	51,8 ± 0,2	50,2 ± 0,3
MUFA	61,0 ± 0,0	43,6 ± 0,1	43,4 ± 0,2	43,0 ± 0,2	40,2 ± 0,2	41,3 ± 0,1	40,3 ± 0,2	40,4 ± 0,3
PUFA	13,6 ± 0,1	8,8 ± 0,0	8,3 ± 0,1	6,5 ± 0,0	12,1 ± 0,1	7,2 ± 0,0	7,9 ± 0,0	9,5 ± 0,0

LD: límite de detección; los valores se expresan como el valor medio ± DE; los datos son promedios de tres análisis. .

## 4.2: *Rhizopus oryzae* as fermentation agent in food derived sub-products



PUBLICATION Ibarri, J. & Hernández, I. Waste Biomass Valor (2018) 9: 2107.  
<https://doi.org/10.1007/s12649-017-0017-8>

Article with full reproduction permit for this Ph.D. Thesis

Publisher: Springer Nature

License Agreement provided by CCC (Copyright Clearance Center)

License Number: 4463570703388

License Date: November 2018

## 1 Abstract

The present research describes the use of *Rhizopus oryzae* as bioconversion agent of different agro-industrial by-products (fruit wastes, olive pulp cake, coffee grounds and potato peels) by Solid State Fermentation (SSF) at different experimental conditions to enhance their value as animal feed. Results showed that *Rhizopus oryzae* grows better at fruit wastes than in other by-products. Fermentation process produced a protein and fat rich mycelia (respectively,  $7.8 \pm 1.2$  and  $9.0 \pm 0.4\%$  of dry matter (DM)) and reduced the carbohydrates content of considered by-products from  $60.6 \pm 0.4$  to  $40.1 \pm 0.3\%$  DM in 3 days. Supplementation with different nitrogen sources increases dramatically the protein concentration in the mycelia up to  $46.8 \pm 0.7\%$  of DM. After fermentation, amino acid profile changed in the fermented product, with significant enrichment of several essential amino acids like valine, leucine, threonine, isoleucine and arginine and lower aspartate concentration. In conclusion, obtained product can be a high value alternative for animal feed.

## 2 Introduction

In Europe, estimated food-derived waste is close to 87 million tons per year, with a high proportion coming from processing facilities [3]. Among of the ethical and economic consequences, reducing wasting is a key factor in the food supply chain sustainability. Farmers, processors and food manufacturers are great “waste” producers who demand alternatives to reuse/revalorize their non-using products. One of the most evident alternatives is bioconversion of these agro-industrial residues by microbial fermentation, transforming poor-nutrients wastes into higher nutritive valuable animal feeds, human food ingredients or enzymes [124,141,309] .

Among others, *Rhizopus* genus (phylum *Zygomycota*, class *Zygomycetes*, family *Mucoraceae*) is a fungal genus broadly used as bioconversion organism in SSF. This genus, composed of 10 species, includes food related species (*R. oligosporus* and *R. oryzae*) [310] which are used for tempeh production in South-East Asia, for nuts, grains, legumes and fruits fermentation [100,101] or rice wine production [102].

Several characteristics make this genus interesting for massive application in biotechnology industry, like wide growth temperature interval (from 25 to 45 °C), wide growth and survival pH range (at least, from 4.5 to 7.5), board fermentative substrates and the range of by-products produced. *R. oryzae* can grow using as carbon source pentose sugars and agricultural wastes

such as cassava, potato pulp, potato starch, corn straw, apple industry waste, rice bran, orange peel, dairy industry wastes, wheat gluten, wheat bran, barley bran, walnut wastes, soybean, xylose, lignocellulosic materials and so on. This fungus encodes a diverse repertoire of CAZymes (Carbohydrate active enzyme), including amylases [223,311], xylanases [312], pectinases [165,224], and cellulases [167,313].

Due to these broad metabolism capabilities and, to the best of our knowledge, the lack of toxins production, *R. oryzae* has become a powerful biotechnological tool for industrial production of lactic acid and fumaric acid [173,176,182,302], chitin and chitosan polymers [173]. several enzymes (cellulases, lipases, proteases...) [129,167,247] esters and volatile compounds [264], nutritionally enriched products [145,314] and long chain fatty acids [315,316]. Moreover, it has been used for aflatoxin (B1, B2, G1, G2 and M1) reduction after between 96-120 h of incubation with an efficiency of 100% [109].

Solid State Fermentation (SSF) is a fermentation process especially appropriate for filamentous fungi, mainly because they have a special ability to penetrate into the mass of solids and due to the high oxygenation ratio that is possible [124]. SSF is receiving more and more interest, as studies have demonstrated superior product yields and simplified downstream processing [129,130] than submerged fermentation (SmF) and has been successfully exploited for food production [122].

This paper deals with developing a bioconversion process of agro-industrial by-products using *Rhizopus oryzae* as the bioconversion agent in SSF. In order to obtain the most suitable process we optimized some fermentation characteristics, such as type of sub-product, substrate density (gram of substrate per cm<sup>2</sup>), incubation T<sup>a</sup>, time, and nitrogen addition. We also evaluated the nutritional composition and amino acid and fatty acid profile value of the final by-products for using it as animal feed.

### 3 Materials and methods

#### 3.1 Microorganism and culture media

Commercial *R. oryzae* culture (internal code ROR001) was provided by Top Cultures, (Belgium). The inoculum was received as a powder and stored at 4 °C until use. The specification sheet claims 8,000,000 spores per gram of starter when it was packaged.

ROR003 and ROR004 (internal code) were isolated from rot fig and apple. For the isolation process of *Rhizopus* sp. several rot fruits and vegetables were collected. 10 g of each sample

was mixed with buffered peptone water (1:10) during 1 minute in a stomacher. The samples were inoculated in PDA with chloramphenicol and incubated at 30 °C for 48 h. Colonies with similar appearance of *Rhizopus* sp. were selected and inoculated in PDA agar for their identification by internal transcribed spaces (ITS) analysis. ITS rDNA of the isolates was amplified using primers ITS1 and ITS4. The amplified gene products were purified using GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare). Nucleotide sequencing of the genes was done in Secugen S.L. (Madrid, Spain). The BLAST program of the National Center for Biotechnology Information (ncbi) was used for homology searches with the standard program default and both were identified with a 100% of probability as *Rhizopus* sp. Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid CM0129, Basingstoke, Hampshire, England), Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid CM0139, Basingstoke, Hampshire, England), and Plate Count Agar (PCA, Oxoid CM0325, Basingstoke, Hampshire, England) were used for bacterial and fungal propagation and count. Buffered Peptone Water (Oxoid CM1049, Basingstoke, Hampshire, England) was used for sample dilution when required. All media were prepared as recommended by the producer and sterilized at 121 °C for 15 min. The total microbial and fungal determination was done at 30 °C for 48 h.

Urea (Panreac Química SA, Barcelona, Spain), protease peptone (Oxoid LP0085, Basingstoke, Hampshire, England) and ammonium sulfate (Panreac Química SA, Barcelona, Spain) were added to samples for nitrogen supplementation when required.

### **3.2 Solid substrates**

Potato peels were supplied by Natuber S.L (Vitoria, Spain) as a result of the commercial French-fries production process and they were stored at -18 °C until use. Just before use, potato peels were blanched at 98-100 °C for 1 minute using a strainer. Apple, pear and orange wastes were provided by local markets. They were made purée by mixing for 4 minutes at low potency and high temperature in a Thermomix (Vorwerk). Maximal temperature during mixing was between 85-93 °C. Orange peel was cut into 1 mm pieces (approx.) by similar treatment but without temperature increase. The obtained purées were stored at -18 °C until use. Just before using, samples were defrosted in a water bath at 45 °C until complete defrost.

Olive pulp cake tested was collected from Sociedad Cooperativa “La Milagrosa” from the olive campaign of 2011 (Monterrubio de la Serena, Extremadura, Spain) after traditional oil extraction. Coffee grounds were provided by Ekogras, a waste manager located in Etxarri-Aranaz (Navarra, Spain). Both samples were stored at -18 °C and defrosted just before

using at 4 °C during 24 h. After complete defrost, samples were diluted adding distilled boiling water in a proportion of 1:2 w/w for olive pulp cake and 2:1 for coffee grounds and adjusted to pH 6.5. All cutting, blender and storage material was cleaned with ethanol (70% v/v) before use.

### 3.3 SSF process

SSF was carried out on 135 mm diameter sterile petri plates for 72 h at 30 °C (surface area 143.1 cm<sup>2</sup>). When incubation area and substrate density were tested, fermentation was done on plastic trays with different sizes (from 9.6 up to 561.6 cm<sup>2</sup>) at 30 °C for 72 h. For final product characterization, the incubation area was 2340 cm<sup>2</sup> and substrate density was 0.10 dry fruit g/cm<sup>2</sup>. 1% of spore suspension (10<sup>6</sup> cfu/ml) was added to the fermentation substrates. Spore suspension was prepared as done before by Ferreira *et al.* [161].

#### *Nitrogen supplementation*

Nitrogen supplementation was done in two levels, 1.2 g and 2.4 g nitrogen/100 g substrate. After inoculation of the fermented samples corresponding nitrogen source was added (urea, ammonium sulfate and protease peptone) in the necessary proportion to supply the exact nitrogen.

### 3.4 Analytical determinations

Mycelia production was determined by separating the mycelium formed from the product and calculating the Dry Matter (DM). From SSF fermentation of solid substrates, formed mycelia was removed from the substrate, washed twice with distilled water (2:1 v/w) and filtered through 300 µm metal filter. Retentate was considered as mycelium. DM was calculated by drying the sample at 60 °C during 24 h, until constant weight.

Total protein, total fat and total sugars were determined by Kjeldahl, Soxhlet and Luff Schoorl methods and moisture and ash gravimetrically as recommended by the official methods of the “Centro de Investigación y Control de Calidad, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain”[278].

Fatty acid profile was determined by adding 10 ml of sodium methylate to 0.10-0.15 g of fat and boiled for 15 minutes in a reflux system. Samples were cooled introducing them in ice. After that, they were neutralized by adding sulfuric acid (5%) in methanol and again boiled during 10 minutes, cooled in ice and mixed with 15 ml of *n*-hexane. Saturated sodium chloride was added forcing the separation of the hexane from the inorganic part. On that point, the methyl esters were dissolved in the hexane part and put in a GC vial. GC-FID analysis was

fitted with a DB-WAX 122-7032 column of Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm). Program was 50 °C for 2 minutes, a 10 °C/min gradient up to 240 °C and 9 minutes at 240 °C. When n3 fatty acids were determined the program was 50 °C for 2 minutes, a 5 °C/min gradient up to 240 °C and 5 minutes at 240 °C. Fatty acid methyl esters were identified by comparing the retention time with standards and were expressed as percentages of total fatty acids.

Amino acid profile was determined by liquid chromatography and fluorescence detection after sample derivatization using AccQ Fluor Reagent Kit (Waters WATO52880). For the derivatization, samples and standards were neutralized by adding HCL 0.6 N and left for 24 h at 100 °C. The derivatization was done as specified in the kit. The HPLC- FPLC analysis was fitted with a AccQ.Tag for hydrolysate amino acid analysis column of Agilent Technologies (3.9 x 150, 4 µm, Silica base bonded with C18), fluorescence detector (Ex=250 nm; Em=396 nm) and performed in gradient system (60% Acetonitrile-40% Buffer Accq.tag (10% v/v) 5 minutes- 100% Buffer Waters Accq.tag (10% v/v) for next 9 minutes. Amino acids were quantified comparing the mean value of the peak area with the calibration values.

### **3.5 Statistical analysis**

All the experiments and analyses were duplicated and analyzed using the software package Statgraphics Centurion XVI. Factors were considered significant when their probability (p-value) was less than 0.05 and were analyzed with one-way ANOVA (analysis of variance) models.

## **4 Results and discussion**

### **4.1 Strain and substrate selection**

ROR001, ROR003 and ROR004 strains were tested for their fermentation capability using a mixture of fruit wastes (apple and pear) as substrate. After 3 days of incubation at 30 °C, there were no significant differences between the growth of the three strains. Yield mycelia were  $21.1 \pm 0.9$ ,  $21.6 \pm 2.1$  and  $23.9 \pm 6.7$  g of DM/ 100 g of dry fruit wastes by ROR001, ROR003 and ROR004 strains, respectively. ROR001 was selected as the best strain for further analysis, especially due to its commercial availability and stability.

ROR001 was grown in different substrates: pear wastes, a mixture of pear and apple wastes, orange wastes, orange peel, potato peel, olive pulp cake and coffee grounds. Fruit wastes, (whole orange, pear and apple and pear mixture) were the best substrates for the fungus as a



result of the density of the mycelium formed (Table 12). The potato peel was also a good substrate, but produced mycelium was more difficult to be removed than from the fruit matrix.

Table 12. Composition (DM %) and pH of tested food derived substrates and mycelium formation during SSF.

Substrate	Humidity	pH	Sugar	Protein	Lipids	Mycelium formed
Pear	86.7 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>	11.7 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	5
Fruit mixture (apple + pear)	84.0	4.2	9.7	0.4	0.3	5
Whole orange	80.9	3.4	8.6	0.8	0.3	5
Orange peel	81.9 <sup>b</sup>	3.8 <sup>b</sup>	3.8 <sup>b</sup>	1.0 <sup>b</sup>	ND	1
Potato peel	81.9	5.6	<1.0	1.9	0.5	4
Olive pulp cake	62.4	5.6*	ND	2,9	4.4	2
Coffee grounds	56.4	5.6*	ND	6.1	8.8	1

Mycelium density was evaluated from 1 (very poor) to 5 (complete coverage of the surface, dense mycelia); \*pH adjusted to 6.5 before mycelium growth; ND: not determined a: [317] b: Carlos Bald, personal communication.

Probably because their high proportion of free sugars, fruit wastes samples are one of the best substrates for the fungus mycelia formation. Several attempts have been made in order to obtain value added products through microbial transformation of orange waste, apple pomace and grape pomace [115,182,318]. The little fungus mycelia formation in olive pulp cake, coffee grounds and orange peel can be due to the little free sugar available in the samples or due to a growth inhibition as consequence of high polyphenols concentration, but further experiments must be done to confirm this point and also to evaluate the bio-fermentation as part of a strategy of reducing the polyphenol content [319] in those samples.

#### 4.2 Incubation time and temperature

ROR001 multiplied up to  $10^7$  cfu/ml in first 72 hours and became stable up to 148 hours (Figure 34) in a board fermentation temperature range (25-35 °C) using mixture of fruit wastes (apple and pear), and potato peels (1:1). Over 35 °C, samples became dehydrated

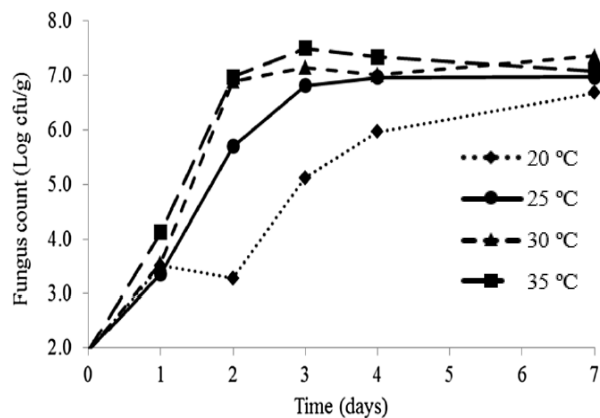


Figure 34. Fungal count after different time and temperature conditions of fruit waste ad potato peel fermentation by SSF.

rapidly, and fungal growth was consequently reduced (results not shown). 72 hours of incubation at 30 °C were selected as best relation between fungal growth and humidity losses. ROR001 was able to growth at 20 °C and 15 °C at very low rates and required more than 120 hours to show a significant mycelia growth (results not shown).

Fungal multiplication in food matrix is reflected as fungal mycelia formation. At 30 °C, maximal productivity arrived after 3 days ( $22.2 \pm 1.5$  g of DM/100 g), after that the mycelia formation decreased significantly in a  $19.7 \pm 8.9\%$  in the next 24 h. Hereby determined optima temperature (30 °C) agree with published results for fumaric acid production during apple pomace fermentation [19] rice bran fermentation and protein production [144,145] and it is determined as the best temperature for the growth of *Rhizopus* sp. [80]. In our experimental conditions, 72 hours were necessary for maximal mycelia production. This is very dependent on the fermentation process and on the final objective, and other authors refereed 12-16 h as the maximum biomass formation period followed by a biomass reduction phase in potato starch wastewater fermentation at 30 °C [170]. Hamdy [314] otherwise concluded that the maximum biomass formation occurred after 144 h of fermentation period of orange peels. This time needed to obtain the highest amount of mycelia depends on the substrate, where its composition and the availability of the nutrients have a great importance.

### 4.3 SSF substrates optimization

Because of the higher productivity and practical consideration (lower contamination problems, no supplement requirements and no pH adjust required), fruit wastes were selected as the best candidate for SSF process optimization.

The importance of the incubation area and the substrate density (gram of substrate per  $\text{cm}^2$ ) were considered for optimization. When similar amount of substrate

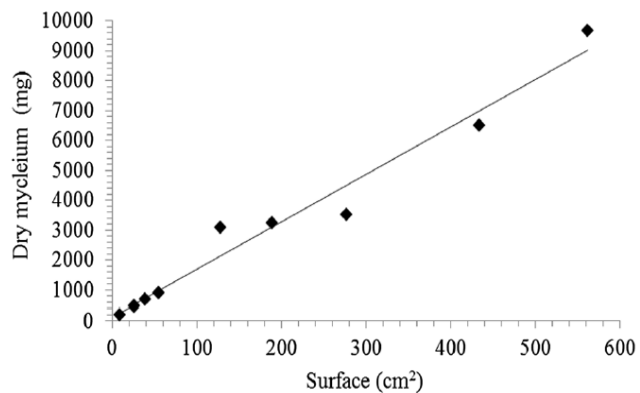


Figure 35. Dry mycelium formation after fruit wastes fermentation (72 h, 30 °C) in different surfaces.

(50-60 g of dry fruit wastes) was extended in different tries, there was a linear ( $R^2=0.9685$ ) relation between surface and obtained mycelium (Figure 35). In all cases, sample covered studied surface completely.

Considering substrate density (g of substrate/cm<sup>2</sup>) and yield (mg of mycelia/g of substrate), highest productivity after 72 hours was observed when density was close to 100 mg/cm<sup>2</sup> (Figure 36).

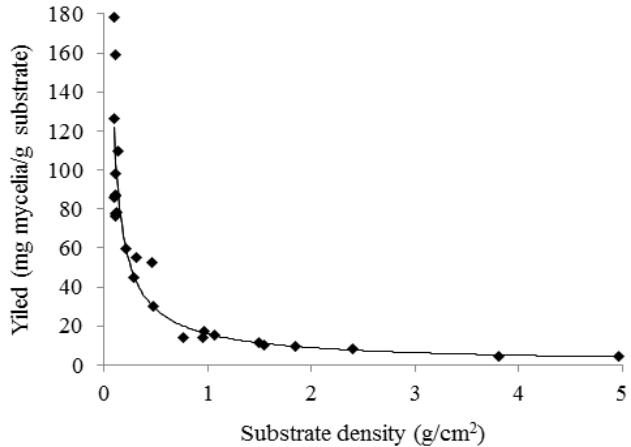


Figure 36. Relation between substrate density and yield after fermentation (72 h, 30 °C) of fruit wastes.

Experimental equation obtained from Figure 36 can be used for mycelium production prediction if substrate density is known in between 0.09 and 5.0 g/cm<sup>2</sup>. Obtained equation was:

$$Y = 15.9xD^{-0.84} \text{ (eq 9)}$$

Where  $Y$  is fermentation yield (mg mycelia/g substrate) and  $D$  is substrate density (g substrate/cm<sup>2</sup>).

This equation (9) was used to predict the biomass formed in independent fermentation processes with similar fermentation conditions.

Obtained results showed a good relation between predicted and obtained yield

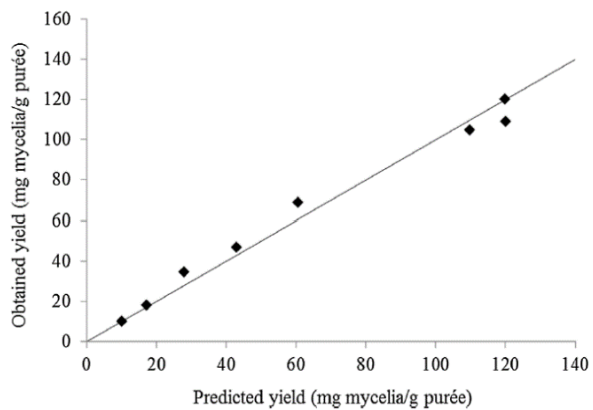


Figure 37. Relation between predicted and obtained yield after fermentation (72 h, 30 °C) of fruit wastes. Line represents optimal correlation.

(Figure 37), and as expected, highest yield (12 g of mycelia/100 g substrate) was obtained at 0.090 mg substrate/cm<sup>2</sup>.

#### 4.4 Final product characterization

In the results presented hereby, as in all manuscript, sample analyzed under “mycelium” term includes part of the fruit adhered to mycelia. During harvesting method, authors attempted to remove as much fruit as possible. “Fermented fruit wastes” term refers to the mixture product of fruit wastes and mycelia after the fermentation process.

After 72 h, fermented fruit protein and fat content increased significantly in 31% and 166%, compared with the original substrate ( $2.6 \pm 0.1\%$  protein and  $1.6 \pm 0.2\%$  fat) (Table 13). At the same time, total sugar concentration was significantly reduced from  $60.6 \pm 0.4\%$  to  $40.1 \pm 0.7\%$  (Table 13). Using *Rhizopus oryzae* as biotransformation agent, when rice bran was fermented [144,145] protein content increased 56.5%, while fat content was reduced in both cases. In the case of the cassava tubers [320], the protein content of the fermented cassava increased between 64 and 87% and the fat content between 155 and 305% in low cyanide and high cyanide cassava samples.

In general, the amino acid profile of the fermented product differs from the not fermented one (Table 14), with a significant increase in several essential amino acids like valine, leucine, threonine, isoleucine and arginine (respectively 40, 37, 40, 39 and 47%). As far as we know, this is the first work describing the amino acid composition of fruits fermented by *Rhizopus oryzae*. By contrast, mango kernel cake fermented with *Rhizopus oligosporus* decreased in valine, leucine and arginine proportion after fermentation [149].

Table 13. Dry Matter (DW g/100 g wet product) and chemical composition (DM%) of fruit wastes, fruit remains, fermented fruit wastes and mycelia based product (72 h, 30 °C).

	DM	Protein	Fat	Ash	Sugar
Fruit wastes	$16.0 \pm 0.6$	$2.6 \pm 0.1^a$	$1.6 \pm 0.2^a$	$3.4 \pm 0.4^a$	$60.6 \pm 0.4^a$
Fermented fruit wastes	$13.4 \pm 0.8$	$3.4 \pm 0.2^b$	$4.3 \pm 0.0^b$	$4.0 \pm 0.6^a$	$40.1 \pm 0.7^b$
Fruit remains	$12.4 \pm 0.6$	$2.5 \pm 0.1^a$	$2.7 \pm 0.0^b$	$4.4 \pm 0.4^a$	$41.4 \pm 0.3^b$
Mycelia product	$15.5 \pm 1.4$	$7.8 \pm 1.2$	$9.0 \pm 0.4$	$3.0 \pm 0.0$	$24.2 \pm 0.3$

Same letter in the same column mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means  $\pm$  SD (n=2).

Comparing with substrate, produced mycelium was rich in protein and fat, ( $7.8 \pm 1.2\%$  and  $9.0 \pm 0.4\%$  respectively) and poor in reducing sugar ( $24.2 \pm 0.3\%$ ) (Table 13). Similar values have been obtained in successive batches (results not shown). Despite of the nitrogen chemical form, nitrogen supplementation (1.2%) had a significant effect in the fungal growth.

Table 14. Amino acid profile (%) of fruit wastes and fermented fruit wastes (72 h, 30 °C).

AA	Fruit wastes	Fermented fruit wastes
Asp	34.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	10.9 ± 1.7 <sup>b</sup>
Ser	5.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	6.5 ± 0.6 <sup>a</sup>
Glu	10.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	13.6 ± 1.8 <sup>a</sup>
Gly	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.2 <sup>b</sup>
His	2.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>a</sup>
Arg	4.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.4 <sup>b</sup>
Thr	3.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.0 <sup>b</sup>
Ala	4.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.3 <sup>b</sup>
Pro	3.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.1 <sup>b</sup>
Tyr	2.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.4 <sup>a</sup>
Val	4.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.3 <sup>b</sup>
Met	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.6 <sup>a</sup>
Lys	5.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	7.7 ± 0.1 <sup>a</sup>
Ile	3.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.3 <sup>b</sup>
Leu	6.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.9 ± 0.5 <sup>b</sup>
Phe	3.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
Total ppm	30379 ± 966 <sup>a</sup>	36746 ± 8462 <sup>a</sup>

Same letter in the same row mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (n = 2).

However, when the supplementation was higher (2.4%), the effect was negative, and the growth did not increase (data not shown). Urea and ammonium sulfate significantly increased the mycelium biomass (g DM/g substrate) in 25.7 and 33.8% respectively, while protease peptone increased it in 115.6% (Table 15). The protein content was also higher with the supplementation. Urea had the highest effect increasing it from  $6.2 \pm 0.9$  until  $46.8 \pm 0.7\%$ . Ammonium sulfate and protease peptone increased the content with less efficiency,  $35.6 \pm 0.4$  and  $37.2 \pm 0.8\%$  respectively but significantly compared to the control. Protein content of the fermented product (fruit + mycelia) achieved the highest values when urea and protease peptone were used, with a final concentration of  $17.8 \pm 1.0$  and  $18.8 \pm 0.9\%$  (Table 15), an increase between 500 and 600% compared to the original product. As mentioned by other authors, the protein content was measured as the total nitrogen x 6.25 factor and part of the nitrogen supplemented fruit adhered to mycelia and nucleic acid nitrogen could lead to an overestimation of the protein content [161] (Table 14).

Table 15. Obtained mycelia (g/100 g DM substrate) and protein content (DM%) in mycelia and in fermented fruit with and without nitrogen supplementation (72 h, 30 °C).

Nitrogen supplementation	Mycelia (g/100g DM substrate)	Mycelia protein	Fermented fruit protein
No	22.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
Urea	27.7 ± 1.7 <sup>b</sup>	46.8 ± 0.7 <sup>c</sup>	17.8 ± 1.0 <sup>c</sup>
Ammonium sulfate	29.5 ± 1.4 <sup>b</sup>	35.6 ± 0.4 <sup>b</sup>	12.2 ± 0.3 <sup>b</sup>
Protease peptone	47.7 ± 3.1 <sup>c</sup>	37.2 ± 0.8 <sup>b</sup>	18.8 ± 0.9 <sup>c</sup>

Same letter in the same column mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (n=2).

As described in Table 16, *Rhizopus* biomass amino acid profile is dominated by Asp, Glu, Lys and Leu. Nitrogen supplementation also has an effect on the amino acid profile of the obtained biomass (Table 16). Protease peptone addition reduced significantly some of the essential amino acids such as lysine (50.5%), valine (20.3%), isoleucine (30.2%) and leucine (34.4%) and increased histidine (26.3%), arginine (30.0%), and phenylalanine (22.4%) compared with the control profile, however as the total amount of amino acids is significantly higher in the supplemented one, the total amount of each amino acid except for aspartate, lysine, isoleucine and leucine, where no differences have been found, is significantly higher than in the control. Urea supplementation, otherwise, has a less impact on the amino acid profile of the biomass, with just few differences in some essential amino acids; an increase in arginine (27.8%) and a slightly decrease of valine (2.9%), isoleucine (3.8%) and leucine (10.8%). The addition of ammonium sulfate has a higher impact than urea in the amino acid profile and as the total amount of amino acids has no differences with the control, the total content of valine, lysine and isoleucine significantly decreases, what leads to a decrease of its nutritional value when ammonium sulfate was used.

Fermentation modifies the fat fraction of the fruits. The fermented fruit showed predominantly 34.8% oleic (C18:1n-9), 18.8% palmitic (C16:0), 16.9% stearic (C18:0), 14.5% linoleic (C18:2n-6) and 3.5% stearidonic (C18:4n-3) FAs. 72 h of fermentation showed a significant increase in  $\gamma$  linolenic acid and a significant decrease in erucic acid compared to the unfermented fruit wastes. After fermentation process, MUFA arrived up to 37.7 ± 1.3%, PUFA decreases to 16.4 ± 0.5% and the SFA percentage does not change (Table 17). Although the proportion of some interesting FA is lower in the fermented product ( $\alpha$  linoleic), the higher fat content on it enriches the final fermented fruit in high-value FA. So, both products have a higher value of the three different FA groups, which increases the nutritive value of the final product.

Table 16. Amino acid profile (%) of mycelia biomass with and without nitrogen supplementation (1.2%) (72 h, 30 °C).

Nitrogen supplementation	Control	Urea	Ammonium sulfate	Protease peptone
Asp	10.3 ± 0.2 <sup>ab</sup>	7.9 ± 1.9 <sup>bc</sup>	11.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	6.9 ± 0.2 <sup>c</sup>
Ser	7.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.4 <sup>c</sup>	5.5 ± 0.1 <sup>c</sup>
Glu	10.6 ± 2.5 <sup>a</sup>	12.4 ± 1.2 <sup>a</sup>	9.0 ± 3.8 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.1 <sup>a</sup>
Gly	5.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	13.3 ± 0.0 <sup>b</sup>
His	2.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.1 <sup>ab</sup>	4.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>b</sup>
Arg	6.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	8.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	9.0 ± 1.0 <sup>b</sup>	9.0 ± 0.2 <sup>b</sup>
Thr	5.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.1 <sup>a</sup>
Ala	6.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>b</sup>
Pro	4.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	8.2 ± 0.2 <sup>c</sup>
Tyr	3.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.7 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.1 <sup>a</sup>
Val	6.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.2 ± 0.0 <sup>c</sup>	5.5 ± 0.0 <sup>d</sup>
Met	1.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>a</sup>
Lys	9.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.1 ± 0.7 <sup>aa</sup>	6.0 ± 0.9 <sup>b</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>b</sup>
Ile	5.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.0 <sup>c</sup>	3.7 ± 0.1 <sup>d</sup>
Leu	9.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	7.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>c</sup>
Phe	4.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.3 <sup>ab</sup>	6.8 ± 0.6 <sup>c</sup>	5.8 ± 0.0 <sup>b</sup>
Total ppm	66243 ± 4597 <sup>ab</sup>	88960±8358 <sup>bc</sup>	43649 ± 2889 <sup>a</sup>	127368±19142 <sup>c</sup>

Same letter in the same row mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (n = 2).

As described in Table 17, *R. oryzae* lipids were composed mainly of 39.8% oleic (C18:1n-9), 18.6% stearic (C18:0), 17.2% palmitic (C16:0), 13.4% linoleic (C18:2n-6) and 2.8%  $\gamma$  linolenic FAs. Similar FA profile has been reported for *Rhizopus oryzae* biomass grown in potato pulp and in whole rice bran [307,321], although a better n6/n3 ratio (6.2%) was obtained in our case. It must be mentioned that the strain used during the fermentation process and the fermentation conditions affects the final fatty acid profile [308].

This work aims to develop a strategy to valorize food industrial by-products for animal feed, focusing on apple and pear pomace. Previous works with same product [322,323] and nitrogen supplementation considered *Candida* as microorganism, increasing up to 19% protein content and 8% fat content. Comparing with these results, *Rhizopus oryzae* arrives to similar protein and lipid concentration when fermentation substrates are fruit wastes and increases the protein proportion in a more effective way (500%) with nitrogen supplementation compared to other sub-products. Moreover, *Rhizopus* requires shorter incubation periods and, to best of our knowledge, is toxin free, what makes it a suitable organism as bio-fermentation agent for the enrichment of food industry sub-products [194]. Among the total protein concentration, nutritional value of animal feed depends on the amino acid and fatty acid profile [324] and

obtained sub-product is rich in several functional amino acids, like arginine, glycine, leucine, isoleucine, valine and proline [325]. In any case, further experiments with animal trials are required to evaluate the benefit of this strategy.

Table 17. Fatty acid profile (%) of fruit wastes, fermented fruit wastes and mycelia based product (72 h, 30 °C).

FA	Fruit wastes	Fermented fruit wastes	<i>Rhizopus oryzae</i> biomass
C8:0	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	<0.1 <sup>a</sup>	BL
C10:0	BL <sup>a</sup>	<0.1 <sup>a</sup>	< 0.1
C12:0	0.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	< 0.1
C14:0	0.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.0
C14:1	ND	ND	BL
C16:0	21.7 ± 9.0 <sup>a</sup>	18.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	17.2 ± 0.0
C16:1	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.0
C17:0	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0
C18:0	8.4 ± 3.9 <sup>a</sup>	16.9 ± 1.5 <sup>a</sup>	18.6 ± 0.0
C18:1	20.1 ± 5.8 <sup>a</sup>	34.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	39.8 ± 0.1
C18:2	28.2 ± 13.5 <sup>a</sup>	14.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	13.4 ± 0.4
C18:3n-6	BL <sup>a</sup>	1.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.1
C18:3n3	2.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1
C18:4	7.7 ± 3.7 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.3
C20:0	2.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.0
C20:1	0.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0
C20:4n-6	ND	ND	BL
C20:4n-3	ND	ND	< 0.1
EPA C20:5	ND	ND	< 0.1
C22:0	1.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.0
C22:1	5.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	< 0.1
C22:5	ND	ND	< 0.1
C24:0	BL <sup>a</sup>	1.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.1
DHA C22:6	ND	ND	< 0.1
SFA	35.5 ± 13.1 <sup>a</sup>	41.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	40.8 ± 0.2
MUFA	26.0 ± 4.8 <sup>a</sup>	37.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	40.5 ± 0.0
PUFA	38.5 ± 17.9 <sup>a</sup>	20.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	18.7 ± 0.2
n3	9.4 ± 5.6 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.3
n6	28.2 ± 13.5 <sup>a</sup>	16.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	16.1 ± 0.5
n6/n3	3.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	6.2 ± 1.0

C4 and C6 were below quantification limits in all samples; BL: Below detection limit; ND: not determined; same letter in the same row mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (n = 2).

Along the paper, authors present a board range of possible substrates and evaluate their suitability for fungal growth, generating a novel growth model for *R. oryzae* in complex



conditions. Obtained biomass was characterized, reporting the first FA profile and AA profile in fermented fruit, comparable or even better than the ones described for other microorganisms.

## 5 Conclusions

Bioconversion of agro-industrial residues transforms poor-nutrients wastes into nutritionally value-added products enhancing their re-use in the agro-food industry. More specifically, fungal fermentation of nitrogen supplemented fruit wastes increases the protein and lipid concentration of final products (fermented fruit wastes and mycelia based product) and modifies the amino acid profile, increasing the proportion of essential amino acids like valine, isoleucine, leucine or arginine. *R. oryzae* is also able to ferment other agricultural sub-products with less efficiency, including potato peels.

\*Although this section is already published, some errors have been found. The X-axis of Figure 36 was incorrectly written as mg/cm<sup>2</sup> and the optimal relation between substrate and surface area was obtained at 0.090 mg substrate/cm<sup>2</sup>. A corrigendum has been sent to the Editor of the journal.



### **4.3: Valorization of cheese whey and orange molasses for fungal biomass production by submerged fermentation with *Rhizopus* sp.**



PUBLICATION

Article submitted to Bioprocess and Biosystems Engineering journal. Manuscript number BPBSE-18-0665. Under review.

## 1 Abstract

Using different *Rhizopus* sp. strains as fermentation agents, this paper describes a global strategy to identify interactions between cultivation parameters (pH 4.75-7.75, 7.5-82.5 g/l glucose, 0.75-3.75 g/l nitrogen, incubation time up to 5 days) for valorization of food-industry by-products. Selected parameters and/or their interactions are critical for most of the proposed resulting values, giving the opportunity to optimize the process depending on the objective and making an “*in silico*” pre-evaluation of the process conditions. Submerged fermentation (SmF) of orange molasses leads to a high biomass and protein yield (11.9 g biomass/l and 4.0 g protein/l), with  $43.1 \pm 0.1\%$  of essential amino acids and Chemical oxygen demand (COD) reduction of almost 50%. Experiments with cheese whey result in  $76.3 \pm 1.1\%$  of glucose consumption and a biomass production of  $5.6 \pm 2.2$  g/l with  $48.9 \pm 5.1\%$  of essential amino acids. SmF is an attractive biotechnological waste treatment for fungal bioprotein production from food industry by-products as an alternative protein source.

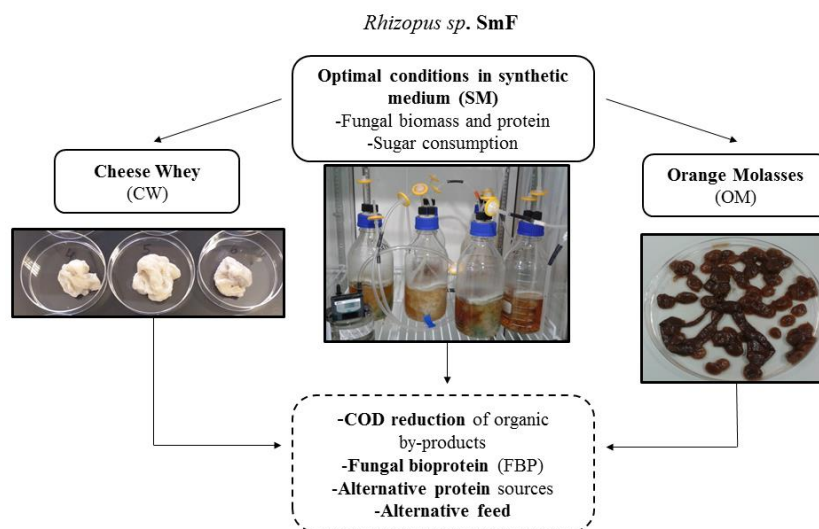


Figura 38. Graphical abstract section 4.3.

## 2 Introduction

Food processing industries produce billions of tons of organic by-products and wastewaters each year, which become, in a significant proportion, organic pollutants streams.

EU directive 2018/851 [2] establishes that food wastes cannot be disposed of in a landfill without a previous valorization, due to environmental and economic concerns.

Significant efforts have been made to use these organic pollutants as valuable resources for microbial bioconversion, removing organic material and generating valuable end products [326]. In this context, by-products from the dairy industry (mainly cheese whey) and from the fruit industry (molasses generated during juice production) are very relevant, both quantitative and qualitatively. Cheese whey (CW) is the liquid by-product portion produced by casein coagulation during cheese-making process. The current total worldwide production of whey is estimated at about 180 to 190 million tons/year, and only half of this by-product is used for food and feed production [65]. CW generates important environmental problems due to its large volume of production (9 l of whey per kg of cheese) [327] and high chemical oxygen demand (COD), approximately between 50-102 g/l [67]. Therefore, proper management, with a treatment or reuse, is mandatory before its elimination. Same problem is observed in the fruit industry. Worldwide production of citrus fruits in 2016 was close to 124 million tons, of which almost 70 million tons corresponded to oranges [72]. More than 18 million tons of those oranges were required for processing and over 50% were discarded as organic waste [74], including the orange molasses (OM) generated after product extraction from solid wastes. Considering the potential environmental problems caused by this huge quantity of organic material, efficient waste treatment is vital for food industries sustainability.

Several organisms can use these products as carbon and nutrient sources, generating high-value products and reducing their waste potential. This has been applied with several by-products and diverse organisms, including yeast, bacteria, fungi or insect [114,119]. Compared to yeast or bacteria, fungi are easy to be harvested, have low nucleic acid and high protein proportion [155]. Fungal fermentation reduces COD of pollutant in significant levels, [162,328], produces fungal biomass which can be used as a source of animal feed and, potentially, in human diets, and also a diverse of high-value end-products [78,156,158,160,329]. When the by-product is liquid, the use of *Rhizopus oryzae*, a filamentous fungus, is an attractive option to treat high-strength wastewater. This genus can use pentoses, hexoses and several agricultural wastes as carbon source and have been used for production of high-value products from food by-products, including organic acids (lactic acid and fumaric acid) [303,330,331], enzymes [164,165,167,332], and volatile compounds [264]. *Rhizopus* main biopolymer is chitosan, a polysaccharide composed by  $\beta$ -(1-4) D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine with high value due to its technological uses [333]. This

biopolymer is usually obtained from the crustacea, but *R. oryzae* has overcome an industrial feasible source in the last years [174,200]. Other authors have considered *Rhizopus* as a bioconversion agent to transform large volumes of liquid wastes into fungal bioprotein (FBP) as an alternative source of protein to animal protein or other vegetable ingredients commonly used in feed for livestock and aquaculture diets, such as soybeans, wheat, corn and fish meal [68,177,194,329,334,335]. The main components of the resulting biomass are proteins, carbohydrates, fatty acids, components of the cell wall, nucleic acids and vitamins, and their relative proportion and nutritional value must be analyzed case by case due to a dependence of the selected substrate [196].

The EFFPA (European Former Foodstuff Processor Association) states that 5 million tons of food products are used in animal feed [1], and that there is an upward trend to 7 million tons until 2025. The sustainability of feed production systems is being challenged due to factors such as scarcity of land, soil and water, competition between food and fuel, climate change, together with increased competition for arable land and non-renewable resources. One of the keys to sustainable livestock development, is the efficient use of available resources, including the reduction of food waste and the application of new resources for animal feed that do not compete with human food. Cereals and oilseeds are the fundamental component of feed, their impact on prices is very high and manufacturers need a continuous and guaranteed supply that allows them to cover the needs of livestock feed. The EU is totally dependent on imports to supply the internal market with protein intended for animal feed (mainly soya), therefore, new alternative sources of protein are urgently needed, which must have lower or similar prices to actual protein sources (soybean, fish meal), must be produced in sustainable manner, not exposed to fluctuations in the market and not dependent on geographical factors and climate variability. The price of soybean varied between 295-435 euros per ton in 2016 [336], so production of *Rhizopus* biomass should not exceed these amounts to be competitive in price and attractive to feed manufacturers. Therefore, the use of fungal biomass as an alternative to cereals for feed manufacturers could be an exceptional example of resource efficiency in the circular economy of the EU.

When fungal fermentation is considered for by-products treatment, carbon consumption (COD reduction) and biomass production are critical parameters. In order to maximize them, the effects of several process-variables like substrate composition, substrate concentration, medium pH, inoculation, nutrient addition, incubation time and temperature have been previously studied by many researchers [83,203,337], but optimization failed to evaluate

multiple parameters at a time. This multiparametric strategy has been considered by other authors to maximize enzyme production during *Rhizopus* growth, including Plackett-Burman design [338] and response surface methodology (RSM) [232].

In this paper, we consider *R. oryzae* to optimize industry waste treatment (organic carbon consumption) and high value product generation (mainly biomass, protein, chitosan and fumaric acid) with a global strategy that would identify interactions between cultivation parameters. Based on our preliminary results, Central composite rotary design (CCRD) and RSM were used to study the effect of nitrogen and glucose concentration, medium pH and culture time. Results obtained using synthetic medium were evaluated using real agro-industrial by-products, CW and OM, as substrate and the obtained biomasses' amino acid (AA) and fatty acid (FA) profiles were analyzed for using them as potential animal feed.

### 3 Materials and methods

#### 3.1 Microorganism and culture media

Top Cultures (Belgium) provided commercial *R. oryzae* culture (internal code ROR001). The inoculum was received as a powder and stored at 4 °C until use. The specification sheet claims, at least,  $8 \times 10^6$  spores per gram of starter when it was packaged. Two food-derived *Rhizopus* sp. strains isolated and characterized in our laboratory (ROR003 and ROR004) (results and discussion section 4.2) were used to validate the model and to compare the potential uses of our own strains for development of biotechnological strategies.

Potato dextrose agar and buffered peptone water (both from Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) were used for fungal propagation, count and dilution when required. Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany) was used for inoculum preparation. All media were prepared as recommended by the producer and sterilized at 121 °C for 15 min. Plates for total fungal counts were incubated at 30 °C for 48 h.

#### 3.2 Analytical determinations

Culture was filtered through 300 µm sterile metal filter and retentate was considered as fungal mycelium. Fungal mycelium was washed with distilled water (1:2 w/v). Dry matter (DM) was calculated by drying the sample at 60 °C during 24 h, until constant weight. Protein content of the substrates and the mycelia during CCRD development was determined by Kjeldahl [278]. Mycelia protein content during model validation and CW and OM fermentation was determined by Biuret method proposed by Satari *et al.* [203] due to its simplicity after a

comparison with Kjeldahl method as done before by Ferreira *et al.* [161]. Briefly, approximately 100 mg of sample was mixed with 3 mL of 1 M NaOH (Fischer Scientific, Loughborough, UK) and boiled for 10 minutes. After immediate cooling in an ice bath, required dilutions were prepared with 1 M NaOH,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (2.5% w/v) (Merck, Darmstadt, Germany) was added to the test tubes (25% v/v final volume) and mixed gently for 5 minutes. The clear supernatant was collected after centrifuging (6714 g, 5 min), and the absorbance was read at 555 nm. Different concentrations of bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) dissolved in 1 M NaOH were used as standards.

Total fat was determined as described previously [277]. Briefly, biomass (500-1000 mg) was mixed with 3 ml of methanol, 1.5 ml of chloroform (both from Fischer Scientific, Loughborough, UK) and 1.2 ml of water and homogenized for 1 minute. In addition, 1.5 ml of chloroform and 1.2 ml of water were added, homogenized again and centrifuged (1450 g, 15 min). Aqueous and protein phases were removed and the lipid phase (at the bottom of the tube) in chloroform was determined. Moisture and impurities were removed by passing through  $\text{NaSO}_4$  (Fischer Scientific, Loughborough, UK). The solvent was evaporated under nitrogen flush.

Total glucose and reducing sugars were determined by Dinitrosalicylic (DNS) acid reagent method [276] adjusted to microplate assay procedure. DNS acid reagent was prepared by dissolving 8 g of NaOH in 100 ml of distilled water. Then, 5 g of DNS (Fischer Scientific, Loughborough, UK), 250 ml of distilled water and 150 g of potassium sodium tartrate tetrahydrate (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were added and made up to volume (500 ml). 25  $\mu\text{l}$  of sample, blank or standard (different concentrations of D-glucose, Fischer Scientific, Loughborough, UK) and 25  $\mu\text{l}$  of DNS reagent were added to each well and incubated for 10 minutes at 100 °C. The microplate was rapidly cooled in an ice bath and 250  $\mu\text{l}$  of distilled water were added to each well. Absorbance was read at 540 nm.

Fumaric acid was determined by Fumarate Assay Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) as described in the microplate assay procedure. The pH of the culture was determined using a potentiometer (Crison micropH 200, Hach Lange Spain S.L.U., Spain).

COD was determined using the COD spectroquant cell test (Merck, Darmstadt, Germany).

Extraction and precipitation of chitosan was done as described previously by Zamani *et al.* [283]. Briefly, wet mycelium of *Rhizopus* was treated with 0.5 M NaOH (30 mL of sodium hydroxide per g of mycelium dry weight) at 90 °C for 2 h. Alkali-insoluble material



(AIM) was separated by centrifugation (4000 g, 10 min), washed 4 times with distilled water, and stored at 4 °C until use. The yield of AIM from biomass was measured after drying it at 60 °C until constant weight. Sulfuric acid (1% v/v) (Fischer Scientific, Loughborough, UK) was mixed with AIM (100 ml/g), the mixture was heated at 121 °C for 20 minutes, followed by hot filtration (> 90 °C) and chitosan was precipitated in an ice bath for 2 hours. The bottom phase was centrifuged (4000 g 10 min) and the pellet was dried until constant weight.

AA profile was determined as done before (results and discussion section 4.2). Protein quality was evaluated by the essential amino acid index (EAAI) as described before [282]. EAAI is based on the content of essential amino acids (EAA) compared to a reference protein or specific requirements for human nutrition [197] and it is used as a rapid method to evaluate and optimize the AA content of food and feed formulations. EAAI equation is described as follow:

$$EAAI = \sqrt[n]{\sum n \frac{\text{mg of EEA in 1 g of tested protein}}{\text{mg of EAA in 1 g of reference protein}}} \quad (eq.3)$$

n: is the number of essential amino acids referenced

FA profile was determined by adding 5 ml of sodium methoxide (Fischer Scientific, Loughborough, UK, 0.2% w/v in methanol) to previously extracted lipid fraction and boiled for 10 minutes in a reflux system. Samples were cooled introducing them in ice. After that, they were neutralized by adding HCL (5% v/v) (Fischer Scientific, Loughborough, UK) in methanol and again boiled for 10 minutes, cooled in ice and mixed with 5 ml of n-hexane (Fischer Scientific, Loughborough, UK). Saturated sodium chloride (Fischer Scientific, Loughborough, UK) was added forcing the separation of the hexane from the inorganic part. On that point, the methyl esters were dissolved in the hexane part, taken to dryness and dissolved in C19 methyl ester (internal standard). GC-FID analysis was fitted with a DB-23 column of Agilent Technologies (60 m x 0.25 mm). Program was 150 °C for 1 minute, a 5 °C/min gradient up to 200 °C, a second gradient of 2 °C/min up to 230 °C and 20 minutes at 230 °C. Fatty acid methyl esters were identified by comparing the retention times with standards and were expressed as percentages of total fatty acid methyl esters.

### 3.3 Parameters optimization via Central Composite Rotary Design (CCRD) and statistical analysis

An optimization of fermentation conditions was done with ROR001 strain in order to maximize biomass production (g/l), protein production (% DM), glucose consumption (%),

biomass yield (g biomass DM/g of consumed glucose), chitosan production (% biomass DM) and fumaric acid production (g/l).

Optimization was done in synthetic culture medium, which includes (g/l): 7.5-82.5 glucose, 3.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac Química SA, Barcelona, Spain), 0.5 MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, 0.5 FeSO<sub>4</sub> (both from Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and 0.5 KCl (Merck, Darmstadt, Germany). Nitrogen was 0.75-3.75 g/l (Protease peptone, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) and 1 ml of olive oil was added as antifoaming. Culture initial pH was adjusted with sterile 1M NaOH and 1M HCl. Submerged fermentation (SmF) was carried out on sterile 1 l pirez bottles (500 ml medium) with sterile air flux 2.0 v/v per minute, incubated at 30 °C, inoculated with 0.1% of spore suspension in dark conditions and without shaking. Inoculum spore suspension was prepared as described before (results and discussion section 4.2) and adjusted to 10<sup>7</sup> cfu/ml just before inoculation.

Based on preliminary experiences (not shown), a CCRD was carried out, which contained 27 experimental trials (supplementary material Table 1). Five (5) levels of the varying 4 factors (glucose, nitrogen, pH and incubation times) were used in central composite design (Table 18). Considered runs included 2<sup>4</sup> factorial design (16 runs), star points (8 runs) and central points (3 runs). Results were expressed as a second order equation, formally presented as eq 2:

$$Y = B0 + AX_1 + BX_2 + CX_3 + DX_4 + ABX_1X_2 + ACX_1X_3 + ADX_1X_4 + BCX_2X_3 + BDX_2X_4 + CDX_3X_4 + AAX_1^2 + BBX_2^2 + CCX_3^2 + DDX_4^2.$$

where Y is the response parameter, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> and X<sub>4</sub> are the coded independent variables, A, B, C and D are linear coefficients, AA, BB, CC and DD are quadratic coefficients and AB, AC, AD, BC, BD and CD are the interactive coefficients. ANOVA (analysis of variance) models were used for statistical analysis (Statgraphics Centurion XVI software package) of the model. Factors were considered significant when their probability (p-value) was lower than 0.05.

Table 18. Coded variables screened for five levels (-α, -, 0, +, +α).

Factor	- α	Low (-)	0	High (+)	+α
pH	4.75	5.50	6.25	7.00	7.75
Glucose (g/l)	7.5	15.0	37.5	60.0	82.5
Nitrogen (g/l)	0.75	1.50	2.25	3.00	3.75
Time (days)	1	2	3	4	5

### 3.4 Model validation

Model validation comprised two steps. First, independent runs were carried out using synthetic medium (SM) in order to compare the obtained values with the model. Different experimental conditions were carried out with the SM (Table 19, ROR001 (n=3), ROR003 (n=1) and ROR004 (n=2) in conditions 1-9).

Later, the model was validated at optimal conditions for protein and biomass production (SM, 3.75 g/l nitrogen, 32 g/l glucose, 5 incubation days and 6.12 initial pH, Table 19, condition 10) with a food-derived strain (ROR004). Twelve independent experiments (n=12) were run and compared with the predicted values.

Finally, CW and OM were used as food industry derived by-products for the model validation in different fermentation conditions (Table 19, conditions 11-16). Bovine CW samples were obtained fresh from commercial cheese factory (Vascolac S.L. Zamudio, Spain) and heated at 110 °C for 1 minute to remove the precipitated proteins. Extra nitrogen (Protease peptone 0.25 g/l), glucose (9.96 g/l) and micronutrients (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g/l, KCL 0.5 g/l, MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l, FeSO<sub>4</sub> 0.5 g/l and olive oil 0.8% v/v as antifoaming) were added. Each experimental condition included different percentage of partially deproteinized CW and SM (Table 19, conditions 11- 13). Whey and nutrients were sterilized (121 °C, 15 min) separately and mixed in sterile conditions and inoculated with the original strain (ROR001, n=2). Commercial OM was obtained from a fruit-processing factory in the production of orange juices (Indulleida S.A. Vilanova de Segrià, Spain). Original pH of the substrate was adjusted with NaOH 4 M before autoclaving (121 °C, 15 min) and the final substrate pH was 5.4 ± 0.1. When required, medium was supplemented up to 2 g/l nitrogen with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fischer Scientific, Loughborough, UK) (Table 19, conditions 14 and 15) before autoclaving. Samples were inoculated with a food-isolated *Rhizopus sp.* strain (ROR004).

### 3.5 Statistical analysis

Differences between fungal samples were determined by one-way ANOVA statistics analyzed using the software package SPSS (IBM Corp. V 24.0, New York, USA). When equal variances were not assumed (Levene test), Welch statistic was used to compare samples. The level of significance was set at p < 0.05.

Table 19. Experimental runs conducted to validate the model.

Experimental conditions	Strain	Medium	Glucose (g/l)	Nitrogen (g/l)	pH	Time (days)
1	ROR001	SM	37.5	2.25	6.25	3
2	ROR003	SM	37.5	2.25	6.25	3
3	ROR004	SM	37.5	2.25	6.25	3
4	ROR001	SM	37.5	3.75	6.25	3
5	ROR003	SM	37.5	3.75	6.25	3
6	ROR004	SM	37.5	3.75	6.25	3
7	ROR001	SM	37.5	0.75	6.25	3
8	ROR003	SM	37.5	0.75	6.25	3
9	ROR004	SM	37.5	0.75	6.25	3
10	ROR004	SM	32.0	3.75	6.12	5
11	ROR001	40% (v/v) CW	18.6 ± 1.0	0.78 ± 0.0	6.00	4
12	ROR001	18% (v/v) CW	13.8 ± 0.5	0.49 ± 0.0	6.00	4
13	ROR001	9% (v/v) CW	11.7 ± 0.2	0.36 ± 0.0	6.00	4
14	ROR004	OM	24.0 ± 0.3	0.20	5.50	5
15	ROR004	OM	23.0 ± 2.8	2.00	5.50	5
16	ROR004	OM	20.8 ± 4.5	2.00	5.40	2

SM: Synthetic medium; CW: Cheese Whey; OM: Orange Molasses.

## 4 Results and discussion

### 4.1 Influence of the studied variables on the considered products

Preliminary characterization of selected by-products shows that reducing sugars are  $21.5 \pm 2.6$  and  $22.6 \pm 0.7$  g/l in CW and OM respectively, nitrogen content is higher in CW ( $1.3 \pm 0.1$  g/l) and, as expected, quite lower in OM (0.20 g/l). Original pH is  $\text{pH}=6.1 \pm 0.1$  in CW and  $\text{pH}=4.7 \pm 0.1$  in OM.

CCRD was selected to predict interesting variables in such high different by-products. Based on the preliminary characterization, substrate conditions used for model development range were selected. These parameters include wide pH range (4.75-7.75), glucose concentration (7.5-82.5 g/l), nitrogen concentration (0.75-3.75 g/l) and usual incubation time (1-5 days) (Table 18). Nitrogen minimum concentration is higher than the present in OM, but preliminary experiments (not shown) and published results [105,162] suggested that OM would require nitrogen supplementation to maximize biomass production.

Statistical analysis of the results obtained after CCRD runs demonstrate that only few factor interactions have a significant effect in results. In order to simplify the number of parameters and their interactions for the prediction of the variable, those interactions with a p-value higher than 0.7 have been removed from the model and not considered in further analysis as recommended by Anderson, Whitcomb [339]. Obtained and predicted results during model generation are shown in supplementary material (Table 2). Statistical analysis of the results obtained after this purge shows that proposed model is significant for almost all the response factors considered (Table 20). The F test is used to analyze the statistical significance of proposed equations for each interesting parameter (*eq.3*) and the analysis of variance (ANOVA) for the response surface quadratic model. As an overview, equations derived from considered variables can predict positively biomass, biomass yield, protein concentration, fumaric acid and consumed glucose (p-values lower than 0.05, Table 20). The percentage of variation ( $R^2$ -value) that can be attributed to the dependent variables indicates that those selected variables explain between 70-95% of the final values (75.69, 81.96, 76.99, 94.55 and 70.64 for biomass, biomass yield, protein, fumaric acid and glucose consumption respectively). However, the proposed variables do not predict chitosan concentration in a significant way (p-value of 0.3208 and  $R^2$  value of 52.53) (Table 20); therefore, it is discharged for further analysis. Other authors found that chitosan production depends on different factors like dimorphism, obtaining higher productions when fungi are grown in filamentous form [83] and longer incubation periods [70]. Although our experimental conditions lead to filamentous growth form (results not shown) and some conditions include long incubation periods, obtained chitosan yields are lower than published results [203], obtaining concentrations between 1-3% of total fungal biomass (supplementary material, Table 2).

Table 20. Statistical parameters of the equations in each studied variable; biomass (g DM/l), biomass yield (g DM/ g consumed glucose), protein (% DM), chitosan (% DM), glucose consumption (%) and fumaric acid (g/l).

Model	Biomass	Biomass yield	Protein	Chitosan	Glucose consumption	Fumaric acid
Transformation	None	None	None	None	None	None
Model d.f.	10	10	11	12	10	13
P-value	0.0023*	0.0003*	0.0039*	0.3208	0.0014*	0.0000*
Error d.f.	16	16	15	14	16	11
Stnd. Error	1.12314	0.0607414	5.22129	1.13685	13.7762	0.34311
$R^2$	75.69	81.96	76.99	52.53	70.64	94.55

\* Statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Results demonstrate that nitrogen, glucose and incubation time are significant factors ( $p < 0.05$ ) for biomass production (Figure 39a). When nitrogen is high in the medium, but glucose is low, or when nitrogen is low, and glucose is high, biomass production decreases, which reinforces the idea that carbon:nitrogen ratio should be balanced for maximal production (Figure 40a). Incubation period has also a positive impact on produced biomass (Figure 39a) and high biomass is harvested also in nitrogen or glucose poor conditions. We observe fungal growth up to 4 days in most cases with maximum production of 9.3 g/l (supplementary material, Table 2), in agreement with published results [161,182].

Glucose and the interaction between glucose\*time and glucose<sup>2</sup> are also significant factors ( $p < 0.05$ ) for biomass yield (biomass produced per glucose consumed) (Figure 39b). When glucose is poor, biomass yield parameter is dependent on the interaction glucose\*time, resulting in higher productivities when incubation time is longer. In contrast, when the medium is rich in glucose, higher incubation period does not lead to higher productivities (Figure 40b). Lowest yields ( $< 0.16$  g/g) are always obtained at high glucose concentration ( $> 60$  g/l), and highest yields ( $> 0.33$  g/g) in contrast, at low glucose concentrations ( $< 15$  g/l) (supplementary material, Table 2).

Nitrogen, glucose and the interaction between nitrogen\*glucose and nitrogen\*time are significant factors ( $p < 0.05$ ) for protein concentration (Figure 39c). Protein concentration is a vital parameter in order to obtain high value biomass for feed application [196]. Highest protein proportion is obtained when medium is rich in nitrogen and poor in glucose (Figure 40c), this condition provides a C:N ratio of 10:1 or less, which ensures high protein content [306]. Our results show that C:N ratios  $\leq 4$  lead to higher protein production ( $> 35\%$ ) than the values obtained at higher C:N ratios (supplementary material, Table 2).

Fumaric acid production is not considered for model validation due to the low production in the studied conditions. Results confirm that high biomass production conditions do not match with high fumaric acid production conditions as reported previously [340]. *Rhizopus* strains tend to form cotton-like mycelia, which limits the mass transfer of oxygen and nutrients onto the microorganisms and the release of the produced organic acids into bulk solutions. These conditions lead to a low yield and productivity of organic acids during fermentation which could be alleviated growing fungi in pellet form [340]. Results report maximal yield of 0.08 g fumaric acid per g consumed glucose (0.12 mol/mol) (supplementary material, Table 2), much lower than the maximal theoretical yield in a nongrowth situation of 2 mol of fumaric acid per mole of consumed glucose [298]. This effect can be because the CCRD conditions were not

optimized for fumaric acid production, where C:N ratios ranging from 120:1 to 150:1 are suggested [185] and our highest C:N ratio is 20:1. Results confirm that it is not possible to maximize co-production of fumaric acid and biomass in a single-step fermentation process.

As expected, lower initial glucose concentration always leads to a higher proportional glucose consumption and when glucose concentration is high, longer incubation periods are required to obtain maximal glucose consumptions (Figure 40d). Nitrogen concentration is critical (has a rather high coefficient) in glucose consumption equation (Figure 39d), resulting that relative high nitrogen proportion is necessary for highest glucose consumption and confirming the idea that C:N ratio is critical for this fungus metabolism. For glucose consumption, considered significant factors are glucose and time (Figure 39d).

Multiparameter optimization and RSM analysis allow finding the optimal compromise to obtain a combination of high value products and a COD reduction, related to reducing sugars consumption, as result of by-product treatment. In this case, food and feed production strategy would require identifying the optimal conditions for the highest biomass production with the highest protein concentration, and so would be identifying the highest sugar consumption in the case of by-product treatment. Results conditions are medium glucose concentration (32 g/l), high nitrogen (3.75 g/l) in a slight acid medium (6.12) and incubated for long time (5 days). In these conditions, synthetic medium fermented with ROR004 (condition 10, Table 19) arrives up to  $8.1 \pm 1.9$  g biomass DM/l,  $52.4 \pm 12.2\%$  protein and consumes  $99.6 \pm 0.1\%$  of total sugars and leads the expected values in most of the parameters (Figure 41, condition 10).

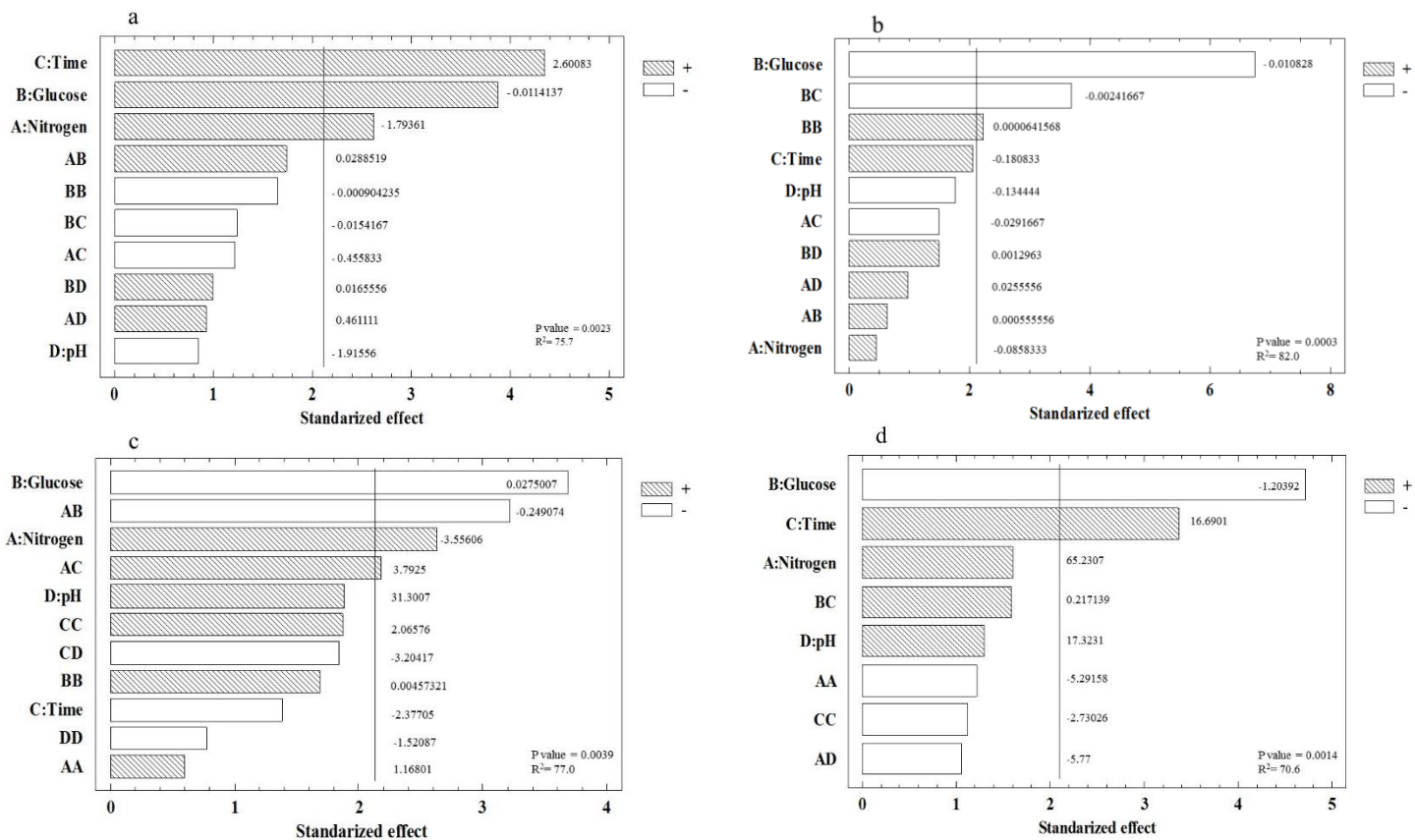


Figure 39. Pareto charts of variables and equation coefficients (a: biomass production, constant = 7.75077; b: biomass yield, constant = 0.763243; c: protein, constant = -66.2311; d: glucose consumption, constant = -63.0902).



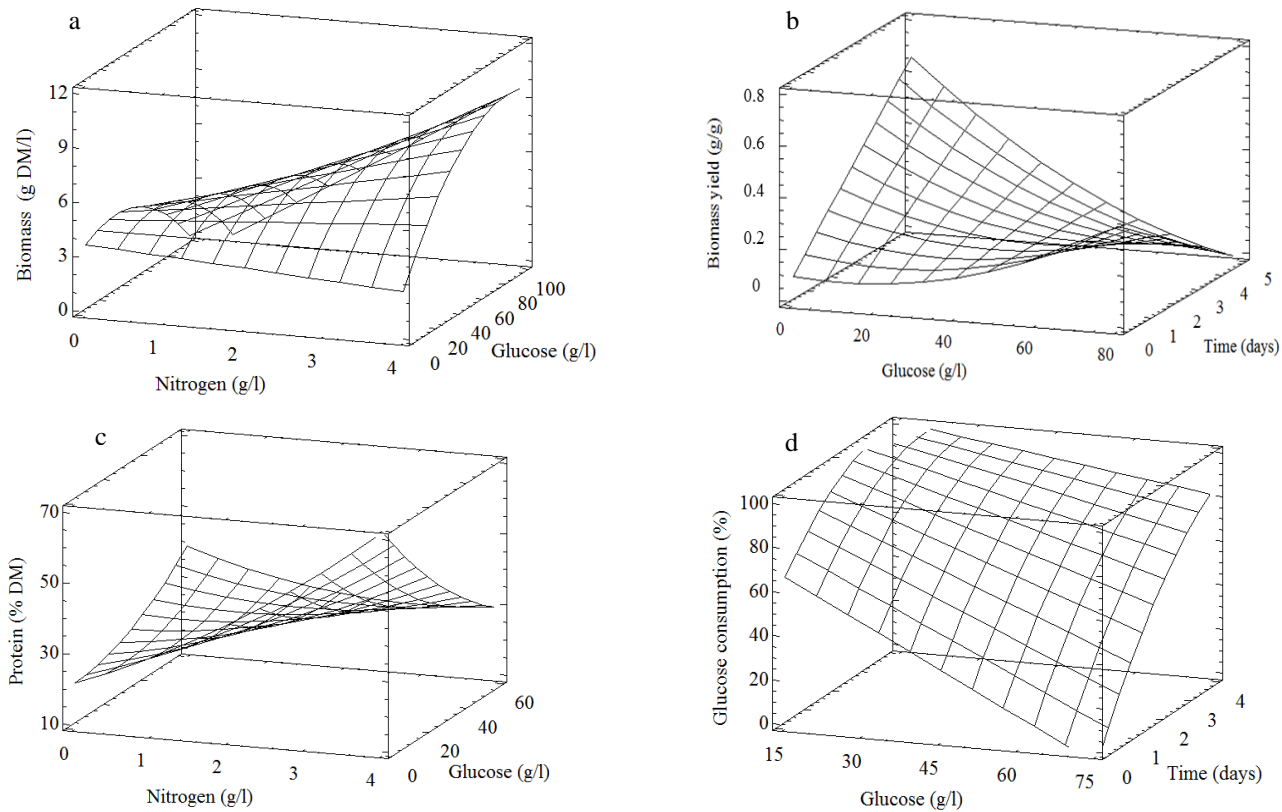


Figure 40. RSM analysis of variables (a: RSM analysis for biomass production, pH 6.25 time= 3 days; b: RSM analysis for biomass yield, pH= 6.25, nitrogen= 2.25 g/l; c: RSM analysis for protein concentration, pH= 6.25, time=3 days; d: RSM analysis for glucose consumption, pH=6.25, nitrogen= 2.25 g/l).

#### 4.2 Model validation

Comparison between Kjeldahl and Biuret methods for protein determination are summarized in Table 21. Biuret method determines peptide bonds, while Kjeldahl method, determines total nitrogen and in general a conversion factor of 6.25 is used for protein calculation, what could lead to an overestimation. Results show that Kjeldahl method result in  $1.2 \pm 0.2$  times higher values compared to Biuret method (Table 21). Ferreira *et al.* [161] also found similar relation (0.15 g/g higher values) between Kjeldahl and Biuret-based methods. However, both methods show the same trend, and as expected with higher nitrogen in the medium higher Kjeldahl nitrogen values are obtained. Biuret results for model validation has been adjusted to Kjeldahl values using a conversion factor of 1.2.

Table 21. Comparison between Kjeldahl and Biuret based methods.

Condition	Biuret protein (%)	Kjeldahl protein (%)
1	$31.1 \pm 3.4$	$34.2 \pm 6.0$
4	$34.0 \pm 3.7$	$40.9 \pm 0.6$
7	$29.6 \pm 5.1$	$30.4 \pm 2.4$
10	$42.1 \pm 5.1$	61.7

Determined in ROR001 biomass (condition 1 n= 4 for Kjeldahl, n=3 for Biuret; condition 4 n= 2; condition 7 n=2; condition 10 n=1 for Kjeldahl and n= 6 for Biuret). Experimental conditions are described in Table 19. There are not statistically significant ( $p < 0.05$ ) differences between Biuret and Kjeldahl protein determinations.

Sixteen independent assays were performed in order to test the proposed model accuracy (Table 19). Three (3) SM composition were selected (Table 19, conditions 1-9) and incubated in independent experiments with three fungal strains ROR001 (n=3), ROR003 (n=1.) and ROR004 (n=2) for model validation. Obtained results are in accordance with predictions for most cases, although ROR004 strain produces higher protein proportion when more nitrogen is available in the medium compared to ROR001 and ROR004 (conditions 1 to 6) (Figure 41b) and biomass production is slightly higher in ROR003 and ROR004 also in nitrogen rich conditions (Figure 41a). The parameter “reducing sugar consumption” is lower than predicted results for two non-commercial *Rhizopus* strains in low-nitrogen fermentation condition (condition 8 and 9) (Figure 41d), although other parameters, such as, biomass production, protein and biomass yield are not affected for predictions by lower nitrogen content (Figure 41a,b,c). ROR004 seems to be the strain which produces higher biomass and accumulates higher protein proportion in nitrogen rich medium ( $\geq 2.25$  g/l).

Twelve (n=12) extra runs were done with SM at optimal conditions to maximize biomass production and protein concentration (Table 19, condition 10). Obtained values (Figure 41,

condition 10) demonstrate a good correlation ( $R^2 = 0.983$ ) between observed and predicted values in a rather repetitive manner (small SD). As described by the model, long incubation time and high nitrogen would have a positive impact on the biomass and protein production  $8.1 \pm 1.9$  g/l and  $52.4 \pm 12.2\%$  DM respectively.

When the highest studied proportion of CW is used as substrate (40%), obtained results match with expected biomass yield variables but do not match with biomass, protein and reducing sugar consumption (Figure 41, condition 11). However, when medium CW proportion (18%) is used, all the studied variables are well adjusted (Figure 41, condition 12). Concentrations higher than 40% (whey:medium) resulted in low fungal growth, confirming previous observations (not shown) and pointing that cheese derived whey has to be diluted in order to support the growth of this fungi. Other authors have reported growth in deproteinized whey, up to 6 g dry mycelia/l after 3 days [71] that would agree with our predictions for pH=6.0, t=4 days, reducing sugars 18.6 g/l, nitrogen 0.78 g/l (6.6 g biomass DM/l, Figure 41a, condition 11). Differences in whey preparation protocol would explain the difference, specially our short thermal process and the long process proposed by Chatterjee *et al.* [71]. Lactoferrin and derived peptides have a relatively high concentration in bovine whey (>1 g/l of whey) [341] which could be the cause of inhibition, but further research is required to clarify this effect.

Results obtained with OM are shown in Figure 41 (conditions 14 to 16). As predicted, longer incubation period leads to higher biomass production (up to 9-11.9 g/l, 120 h) and, although the nitrogen is 10 times lower in experimental condition 14 compared to condition 16 (Table 19), biomass production is 1.8 times higher in the first one due to longer incubation period. Reducing sugars consumption and protein production are higher than predicted in the lowest nitrogen concentration (Figure 41b,d, condition 14); since the model was created with higher nitrogen concentration range, it cannot predict accurately reducing sugars consumption and biomass yield in these low nitrogen concentration cases. Obtained equations are valid for supplemented OM fermentation with the added value that a second strain is used in the test, demonstrating that proposed equations are valid to predict the growth parameters of different *Rhizopus* strains. Final biomass production is 11.9 g DM/l when incubation time is 5 days, higher value than the obtained at optimal conditions (Table 19, condition 10), although protein production is lower (39.6%, Figure 41b) due to lower nitrogen content in the medium.

In addition, it is interesting to note that the model can be “forced out” from the range of variables. Nitrogen concentration in conditions 12, 13 and 14 are lower than the model –  $\alpha$

value for this variable, but the equations are able to predict biomass and protein (Figure 41). In any case, authors recommend to maintain the values in the range of the model to have stronger predictions.

Obtained biomass (g biomass/l) and protein yield (g protein/l) in SM, 8.1 and 4.3 respectively, are in accordance or are even higher than previously reported [105,155]. Other authors found higher biomass production (up to  $38.7 \pm 3.7$  g/l), but in consequence lower protein proportion was obtained leading to similar protein yields (g/l) [334,335]. The biomass obtained in the studied by-products achieve lower protein concentration (Figure 41b) and in consequence lower protein yield in the optimal conditions (4.0 g/l OM Table 19, condition 15, 2.9 g/l OM Table 19, condition 14 and 1.4 g/l in CW Table 19, condition 12). As expected, the best results are obtained with nitrogen supplemented OM at longer incubation periods (condition 15) which almost achieves synthetic medium protein yield. Reducing initial sugars and increasing nitrogen in the medium, by supplementation or by combining with higher nitrogen by-products, final C:N ratio will be lower, which could lead to higher protein concentration [306]. Other authors [203] reported lower protein yield in citrus-wastes free sugars without supplementation than obtained hereby.

The model could be used for a preliminary technical-economical evaluation of the process, simulating the effects of variable modifications (nitrogen supplementation or longer fermentation periods) on determinant end-products, such as biomass and protein yield, and evaluate if the resulting process is cost-effective or even selecting the best process regarding to obtained profits and generated costs.

Fermentation reduces the COD of the treated by-products. COD reduction values are around 50% for OM and CW fermentation after 120 h and lower in shorter incubation time (Table 22). Other authors found higher COD reductions when initial COD was much lower than in this case [155,162] and lower when initial COD was higher [105]. Total reducing sugars dropped below 5 g/l in initial 48 hours and below 3.5 g/l after 120 h of fermentation (Table 22).

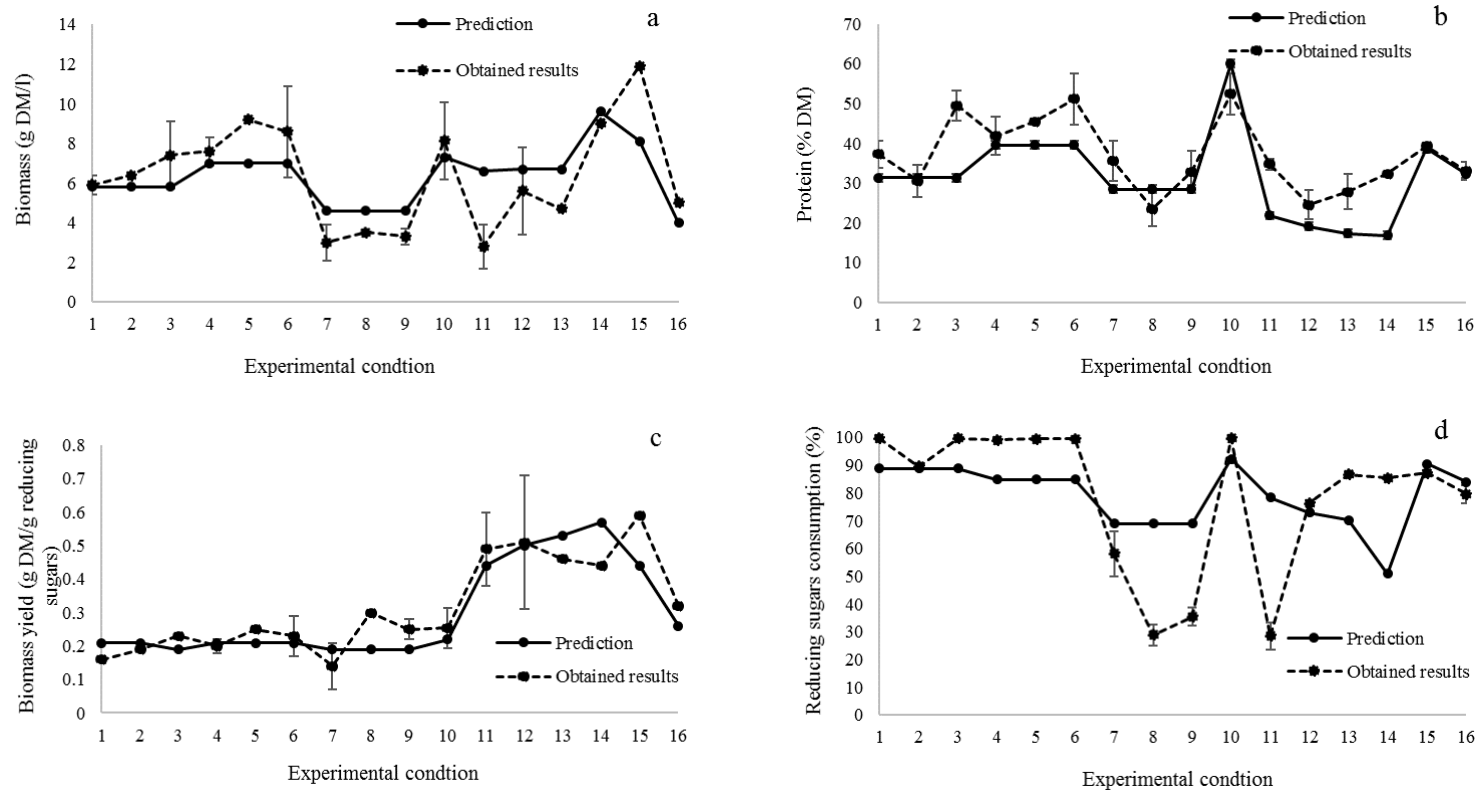


Figure 41. Comparison between predicted and obtained values for biomass production (a), protein concentration (b), biomass yield (c) and reducing sugars consumption (d). Experimental conditions are described in Table 19. Error bars represent SD.

Table 22. COD and reducing sugars reduction of OM (Table 19, condition 16 at 48 h, conditions 14-15 at 120 h) and CW (Table 19, condition 12) during submerged fermentation.

Experimental condition	Fermentation time (h)	Initial COD (g/l)	COD reduction (%)	Initial reducing sugars (g/l)	Final reducing sugars (g/l)
12	120	34.0	43.6	13.8 ± 0.5	3.0 ± 0.2
14	120	112.5	42.9	24.0 ± 0.3	3.5 ± 0.0
15	120	106.0	50.9	23.0 ± 2.8	2.9 ± 0.2
16	48	121.7	22.6	20.8 ± 4.5	4.2 ± 0.5

Experimental conditions are described in Table 19.

### 4.3 Biomass characterization

The nutritional value and utility of fungal biomass depends on the nutrient content and composition. Thus, biomasses obtained with *Rhizopus* sp. in optimal SM, CW and OM (Table 19 conditions 10, 12 and 15), have been characterized for AA and FA profile.

Obtained proteins profiles are dominated by Glu, Ala, Asp, Leu, Arg and Lys (Table 23) and result in high-quality protein, both in SM and in industrial by-products. The percentage of EAA is  $40.9 \pm 2.5$ ,  $43.0 \pm 0.1$  and  $48.9 \pm 5.1\%$  in SM, OM and CW biomasses respectively. Obtained EAAI for human consumption is 1.4 for SM and OM and 1.6 for CW, what means that profiles fulfill human consumption requirements [197]. There are no significant differences ( $p < 0.05$ ) between AA profiles of the obtained biomasses, thus, the beneficial AA profile will be guaranteed within medium modifications. The overall EAA (mg/g fungal biomass) are  $214 \pm 13.0$ ,  $170.2 \pm 0.2$  and  $121.3 \pm 12.6$  mg/g fungal biomass in SM, OM and CW respectively (Table 23). Biomass grown in CW is the poorest biomass in EAA, with significantly lower Phe, Ile, Leu, Pro and Ala concentration. Fish meal and soybean meal, are the most used protein sources in animal feeding [32]. Obtained values for biomass grown in OM and CW are in general lower than fish meal, only the biomass grown in SM reaches its great profile (Table 23). AA concentration of biomass grown in OM is quite similar to soybean meal, biomass grown in CW, however, does not reach the EAA concentration required to use it as high-quality alternative protein source. In all the fungal biomasses sulfur AA are lower than the required concentration, previous studies also showed that the production of sulfur AA is limited in zygomycetes biomass, and therefore, feed should be supplemented in those AA [162,270]. Lysine is considered the most critical AA in fish-feed and often the most limiting AA in feed ingredients [162]. Lysine content of fungal biomasses is lower than in fish meal (Table 23), but biomasses from SM and OM have higher and similar lysine content compared to soybean meal (30.3 mg/g) (Table 23), what makes them interesting alternative

protein sources, and could contribute greatly towards protecting the surrounding environment and promoting a sustainable feed industry.

Lipids provide palatability and energy value to the formulation of feed. Comparing the FA composition, there are differences regarding to the fermented substrate. Biomass of CW lead to a higher fat fraction ( $31.1 \pm 10.6\%$ ) than in SM ( $6.6 \pm 0.4\%$ ) and OM ( $4.2 \pm 0.4\%$ ) (Table 24) and OM lead to significantly higher polyunsaturated fatty acids (PUFA) and lower monounsaturated fatty acids (MUFA) proportion (Table 24). Main FA of the biomasses are oleic (C18:1), palmitic (C16:0), linoleic (C18:2n-6) and stearic acid (C18:0) in agreement with results reported previously [105,307,342]. Several medium and long-FA (14:1, 15:1, 17:0, 17:1, 20:5n-3, 22:1, 22:5n-3 and 22:6n-3) are not detected in any of the biomasses. The higher fat fraction and MUFA composition of the CW biomass could be related to the higher proportion of olive oil used as antifoaming in CW fermentation due to higher foam production. In this condition, fat fraction is five and seven times higher than in SM and OM respectively and C18:1 arrives up to  $75.7 \pm 3.8\%$ . Biomass obtained through the fermentation of OM otherwise, is 2.9 and 4 times richer in PUFA than the biomasses obtained in SM and CW which are almost twice richer in MUFA (Table 24).

It should be mentioned that gamma-Linolenic acid (GLA C18: 3n-6) goes up to 8.6% of the profile of biomass grown in OM. This FA of the  $\omega$ -6 series has been related to anti-inflammatory effects and is the precursors of DGLA (Dihomo-gamma-linolenic acid C20:3n-6) [343]. Other authors have described that stress conditions during microorganism cultivation would lead to desaturation of membrane fatty acids, which enhanced membrane fluidity [344]. The slightly more acidic pH of OM could lead to a higher accumulation of PUFA in fungal cells. Further experiments are required to determine if the differences in FA profile of *Rhizopus* sp. biomass are related to the cultivation medium or to the *Rhizopus* strain used as reported previously [308].

Compared to soybean meal obtained biomasses have higher total lipids; compared to fish meal however, biomasses through fermentation of OM and SM show lower total lipids (Table 24). FA profiles are also quite different, while biomasses have higher C18:1 and lower C18:2 than soybean meal, the biomasses have higher C18:1, C18:2 and C18:3 and lower proportion of FA higher than C20, that represent the 47.1% of fish meal lipids. In general, obtained biomasses could add higher nutritional value regarding to lipid content and FA profile compared to soybean meal, but FA profile is not as good as fish meal profile regarding to essential highly unsaturated fatty acids (HUFA).

Table 23. AA composition of the *Rhizopus* biomasses grown in SM, CW and OM (Table 19, condition 10, 12, 15). and most used commercial feed.

AA	AA profile (% of total AA)			AA (mg /g fungal biomass)			AA (mg/g product)	
	SM	OM	CW	SM	OM	CW	FM	SBM
His	2.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	10.4 ± 7.7 <sup>a</sup>	10.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	17.8	12.8
Thr	5.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	28.2 ± 3.0 <sup>a</sup>	20.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	13.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	26.4	18.5
Val	6.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	32.1 ± 2.9 <sup>a</sup>	23.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	13.2 ± 1.9 <sup>a</sup>	30.3	22.7
Met	0.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	2.0 ± 2.8 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.5 ± 1.7 <sup>a</sup>	17.7	6.7
Lys	7.1 ± 2.0 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	37.2 ± 10.7 <sup>a</sup>	30.9 ± 1.8 <sup>a</sup>	19.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	48.1	30.2
Ile	3.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	20.1 ± 2.9 <sup>b</sup>	18.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	10.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	25.7	21.6
Leu	8.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	7.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	43.5 ± 7.8 <sup>b</sup>	31.6 ± 0.2 <sup>ab</sup>	19.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	45.5	36.6
Phe	4.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	22.1 ± 2.1 <sup>b</sup>	19.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	11.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	25.1	23.9
Cys	BL	BL	4.7 ± 6.7	BL	BL	11.7 ± 16.6		
Tyr	3.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	18.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	16.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	11.2 ± 1.2 <sup>a</sup>		
EAA	40.9 ± 2.5 <sup>a</sup>	43.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	48.9 ± 5.1 <sup>a</sup>	214.4 ± 13.0 <sup>a</sup>	170.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	121.3 ± 12.6 <sup>a</sup>	236.6	173.0
EAAI <sup>1</sup>	1.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.5 <sup>a</sup>					
Arg	7.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	7.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	40.2 ± 7.3 <sup>a</sup>	28.2 ± 1.3 <sup>a</sup>	14.9 ± 2.3 <sup>a</sup>		
Ala	9.7 ± 4.0 <sup>a</sup>	7.9 ± 1.4 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	50.9 ± 21.2 <sup>ab</sup>	36.9 ± 2.3 <sup>b</sup>	15.4 ± 2.0 <sup>a</sup>		
Pro	5.2 ± 1.4 <sup>ab</sup>	5.7 ± 0.7 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	27.4 ± 7.1 <sup>ab</sup>	21.1 ± 0.4 <sup>b</sup>	10.3 ± 0.3 <sup>a</sup>		
Asp	9.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	10.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	9.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	50.6 ± 0.5 <sup>c</sup>	45.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	23.4 ± 0.0 <sup>a</sup>		
Ser	6.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	32.9 ± 4.7 <sup>a</sup>	21.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	17.3 ± 6.3 <sup>a</sup>		
Glu	13.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	13.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	11.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	68.8 ± 0.5 <sup>c</sup>	53.4 ± 2.1 <sup>b</sup>	29.4 ± 1.1 <sup>a</sup>		
Gly	7.4 ± 2.3 <sup>a</sup>	7.1 ± 2.8 <sup>a</sup>	6.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	39.0 ± 12.1 <sup>a</sup>	19.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	15.9 ± 2.7 <sup>a</sup>		
NEAA	59.1 ± 2.5 <sup>a</sup>	57.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	51.1 ± 5.1 <sup>a</sup>	309.9 ± 13.0 <sup>c</sup>	226.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	126.6 ± 12.6 <sup>a</sup>		

BL: below detection limit; 1: based on [197]; data related to fish meal and soybean meal are based on [345]; same letter in the same row mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (n=2).

Freshwater fish can convert C18 PUFA to C20 or C22 HUFA by elongation and desaturation reactions; thus, their essential fatty acids (EFA) requirements are met by PUFA (18:3n-3 and 18:2n-6) [346]. Marine fish otherwise, cannot perform [42] or have limited capability [43] for such conversion; therefore they have requirements for n-3 HUFA (20:5n-3 and/or 22:6n-3), so fungal biomass should be added with other feed which includes those FAs.

*Rhizopus* biomass has already been tested as fish meal substitute in fish feed [198,199,347], always without total substitution, where similar responses and good growth rates have been obtained compared to fish meal-based feed. Therefore, the *Rhizopus* biomass could present an alternative to the large quantities of fish meal necessary for aquaculture.



Table 24. FA profile (% of total FA) of *Rhizopus* biomasses grown in SM, CW and OM (Table 19, condition 10, 12, 15) and most used commercial feed.

FA	SM	OM	CW	Fish meal	Soybean meal
14:0	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.0	0.2
15:0	BL	0.3 ± 0.0	BL		
16:0	16.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	14.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	10.5 ± 2.9 <sup>a</sup>	15.4	11.0
16:1	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	6.9	0.2
18:0	7.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	11.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	4.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	2.6	4.0
18:1	62.7 ± 8.4 <sup>b</sup>	39.0 ± 1.4 <sup>a</sup>	75.7 ± 3.8 <sup>b</sup>	14.7	22.0
18:2n-6	7.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	19.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.0	54.0
18:3n-6	2.1 ± 2.9 <sup>ab</sup>	8.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.4 <sup>a</sup>		
18:3n-3	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.0	8.0
20:0	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	47.1*	0.4*
20:1n-9	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>		
22:0	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>		
24:0	1.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>		
SFA	26.1 ± 4.2 <sup>a</sup>	31.2 ± 2.2 <sup>a</sup>	15.9 ± 4.2 <sup>a</sup>		
MUFA	64.0 ± 8.4 <sup>b</sup>	40.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	76.9 ± 3.8 <sup>b</sup>		
PUFA	9.8 ± 4.2 <sup>a</sup>	28.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	7.3 ± 0.8 <sup>a</sup>		
Total	6.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	31.1 ± 10.6 <sup>a</sup>	9.5	1.9

BL: below detection limit; data related to fish meal and soybean meal are based on [348,349]; \* these values correspond to FA > C:20; same letter in the same row mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (n=2).

Nutritional requirements regarding to FA profile for cattle, dairy, swine and poultry are not specific, and just minimums of C18:2n-6, > 0.1% in swine and around 1.1% in poultry are required due to its benefits in clutch size and egg mass [30,31]. Obtained biomasses provide 0.5, 0.8 and 1.8% in fungal biomass grown in SM, OM and CW. To best of our knowledge, no farm trail has been done with *Rhizopus* biomasses in this species.

## 5 Conclusions

Optimization of fermentation parameters for simultaneous production of fungal biomass, protein and glucose consumption result in a multiparametric model with significant interactions in-between considered parameters (mainly nitrogen and carbon concentration and fermentation time). These models can be used to optimize the fermentation with a defined objective. In synthetic medium, best conditions lead to total consumption of glucose and maximize biomass yield and protein production up to 8.1 g/l with a 52.4% DM respectively. When applied to real food industry by-products, this paper confirms OM as a promising

organic by-product for fungal fermentation due to high COD reduction, high biomass production, high protein yield, even without nitrogen addition and micronutrient supplementation, and high nutritional value of the obtained biomass (EAA and omega-6 FA proportion), comparable or even better than soybean meal. Fungal biomass obtained by fermentation of OM is, therefore, a very promising alternative as an alternative protein source in animal feed. CW requires to be diluted (consuming clean water and increasing final waste volume) and needs to be supplemented to assure fungal growth. In addition, obtained COD reduction and biomass production are lower than with OM.

## **4.4: Solid state fermentation of Brewer's spent grain using *Rhizopus* sp. to enhance nutritional value**



PUBLICATION

Article submitted to Waste and Biomass Valorization journal.  
Manuscript number WAVE-D-18-01052. Under review.

## **1 Abstract**

In this study a valuable fermented brewer's spent grain (BSG) was obtained by Solid state fermentation (SSF) with *Rhizopus* sp. and assessed for feed and food applications. SSF conditions were optimized by factorial design and response surface methodology (RSM) to maximize the value of the resulting BSG biomass. Two *Rhizopus* sp. strains were tested as inoculum (one wild and one mutant strain) and time and temperature were analyzed. Measured response variables include, among others, protein content, soluble protein, degree of hydrolysis, antioxidant activity, total phenolic content and antibacterial activity. Both strains lead to the highest protein concentration ( $31.7 \pm 7.6\%$ ) and soluble protein ( $47.4 \pm 3.8$  mg/g DM) when BSG is fermented at 30 °C for 9 days. The biomass obtained presents a modified amino acid (AA) profile resulting in an Essential Amino Acid Index (EAAI) of 1.58 compared to FAO human nutrition standard, with antioxidant capacity ( $59.7 \pm 7.7\%$  DPPH reduction) and 11 times higher total polyphenol content ( $2.7 \pm 0.1$  mg GAE/g DM). Hereby, results demonstrate that SSF of BSG results in a significant increase of highly appreciated characteristics for feed or food applications, which could lead to a promising valorization alternative.

## **2 Introduction**

Brewer's spent grain (BSG) is a by-product of the beer brewing industry which corresponds to approximately 85% of total by-products generated during beer production [350]. Its composition can vary depending on the barley variety, harvesting time and malting and mashing conditions [351] but, in general, it is a fiber and protein rich material, around 70 and 20% respectively, followed by lower proportions of lipids and ash, 9-10 and 4-5% respectively [50]. Europe beer production was of 416 million hl in 2016 [49] and for every hl of beer produced, 15- 20 kg of BSG was generated [56,57]. Despite being readily available, it is considered an unstable product and, up to now, no good preservation technologies have been developed [56]. Hence, several strategies have been studied as an alternative to overcome the environmental problems associated with BSG's disposal and/or combustion. The use of raw BSG has been studied in depth, including use in animal and human nutrition [57,352], energy production [353], as a brick component [354], cellulose source [355] or adsorbent [356]. In most cases, not modified BSG has a low commercial value due to its high humidity (75-80%) and low digestibility protein [48]. BSG utilization also includes enzymatic recovery of carbohydrate fractions [50,63] and enzymatic production of antioxidant and antihypertensive

compounds [52,216,357]. However, the use of commercial enzymes is costly. In this case, microbial fermentation could be a cost-effective alternative to hydrolyze biomass, and reports include the use of BSG for organic acids production [358] and as substrate for microbial enzyme production [359,360].

Until now, BSG has been primarily used as animal feed, mainly for ruminants due to its high proportion of fiber [350]. Animal feed producers are interested in high protein, high digestibility and “low-toxin” products, which allow a correct nutritional balance in the recipe. Regular availability, low price and constant characteristics are also appreciated. BSG can fulfill all these requirements, but commercial value would be higher if protein and digestibility increased in a cost-effective process. In addition, some biological activities are important for feed application, including antibacterial and antioxidant activities.

BSG, as other large volumes of food processing by-products, can be transformed from poor-nutrient wastes to animal feeds, food ingredients or enzymes when appropriate technologies are used for their valorization [117]. Industrially interesting compounds can be produced by the use of different fermentation strategies such as solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). In recent years, SSF has gained scientific and technological attention because it is considered an efficient process for production of enzymes and other compounds such as phenols, vitamins and flavor compounds, among others [127,144]. Fungi, the main microorganisms used in SSF, are known to produce enzymes which degrade plant cell walls and could also improve biochemical composition and bioactivity of the employed substrates [214]. Fungal fermentation applied to food by-products improves digestibility and availability of proteins, preventing growth of pathogenic microorganisms and undesirable bacteria through the production of compounds with antibiotic activity [59].

One of the most promising fungi genus for SSF is *Rhizopus* sp. This genus includes several species used for enzyme production (glucoamylases, cellulases, tannases), organic acids production (lactic acid, fumaric acid) and animal feed preparation [85,87]. They are also the traditional inoculum for human food production (tempeh, peka, ragi and loog-pang) [101]. Simple nutritional requirements, wide growth temperature interval (from 25 to 45 °C), growth and survival pH range (at least, from 4.5 to 7.5) and board fermentative substrates make *Rhizopus* a good candidate to ferment agro-industrial by-products in order to obtain products with higher protein and vitamin contents [141]. *R. oryzae* is a well-known specie of *Rhizopus* genus, generally recognized as safe (GRAS) by the FDA; it is employed industrially for its capacity to consume a great range of carbon sources [85], lipase and protease

production [129,248] and it has been considered for by-product valorization [161,272,342]. Using *Rhizopus oryzae* strain during SSF technology, our research group obtained fruit by-products enriched in fatty acids (FA), amino acid (AA) concentration and with improved AA profile [342]. Most critical parameters for highest biomass production (by-product, surface, T<sup>a</sup>, time, and nitrogen) have been previously optimized in model substrate and in some real substrates (fruit and vegetable by-products) (results and discussion section 4.2) but not optimized for feed application.

Along this paper, we describe parameters' optimization for SSF process of BSG using *Rhizopus* sp. fermentation as an improving strategy of nutritional composition, compound availability and bioactivity of the final product. Fermentation conditions were optimized with a rotatory design model for highest protein concentration, optimal degree of hydrolysis (DH), high total phenolic content (TPC) and looking for antioxidant and antimicrobial activity in order to develop a sustainable process for BSG valorization that allows its use as a valuable ingredient for feed or food applications. Resultant biomass is richer in protein and TPC, shows higher antioxidant activity and DH than the unfermented BSG and a modified AA and FA profile. This study leads previous works presenting the nutritional improvement of fermented BSG [59,64] but also offers insight into the bioavailability of the released compounds during fermentation and discusses fermented BSG suitability for animal feed and human nutrition compared to other protein sources and standards.

### **3 Materials and methods**

#### **3.1 Microorganism, mutagens and culture media**

One food-derived *Rhizopus* sp. strain isolated and characterized in our laboratory (ROR004) (results and discussion section 4.2) and a strain derived from ROR004 after mutagenesis experiments (ROR004 G) were used as strains.

The wild type strain (ROR004) was treated with UV (Atom A/70 N°557, Barcelona, Spain), 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG, Tokyo chemical industry, Zwijndrecht, Belgium) and ethidium bromide (EB, 15585011 Fischer Scientific, Loughborough, UK) at room temperature to induce mutagenesis. For treatment with UV, 10 ml of the spore suspension (4 log cfu/ml) was plate on sterile petri dish (90 mm diameter) and exposed to UV irradiation (254 nm) for 60 and 90 minutes at 20 cm. During exposition to MNNG, 1 ml of the single spore suspension (4 log cfu/ml) was mixed with 5 ml MNNG (0.1 mg/ml) for 30 and 50 minutes. Finally, for mutagenesis with EB, 7.4 ml of spore suspension (4 log cfu/ml) was

mixed with 600  $\mu$ l of EB solution (1 mg/ml) for 90 or 100 minutes. After treatment with MNNG and EB, spores were washed twice by centrifugation (11330 g, 5 min). Supernatant was discarded, and pellet was resuspended in 1 ml of sterile water. In all cases, final spore suspension was cultivated on PDA agar plates for 48 h at 20 °C to obtain isolated colonies.

Potato Dextrose Agar (PDA), Mueller Hilton Broth and Bacteriological Agar were used for bacterial and fungal propagation and count. Buffered Peptone Water (all from Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) was used for sample dilution when required. All media were prepared as recommended by the producer and sterilized at 121 °C for 15 minutes. The total microbial and fungal determination was done at 30 °C for 48 h.

### 3.2 Brewer's spent grain (BSG)

BSG was provided by Boga Cooperative (an artisanal brewery located in Mungia, Spain) as by-product after standard barley brewing process. Sample was frozen at -20 °C until it was used. After defrost (18 hours, 4 °C), sample was sterilized at 110 °C for 15 minutes and cooled down up to room temperature in sterile conditions before inoculation. In all the experiments, substrate density was maintained at 0.09 g/cm<sup>2</sup> and no extra nitrogen was added, as previously optimized (results and discussion section 4.2). Gross composition of BSG is expressed in Table 25.

Table 25. Composition of unfermented and fermented BSG (30 °C, day 9).

	Unfermented BSG	Fermented BSG
Humidity (%)	72.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	75.8 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
Ash (% DM)	4.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
Protein (% DM)	20.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	31.7 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>
Fat (% DM)	11.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	3.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
NDF (% DM)	67.3 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	74.3 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>

Same letter in the same row mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means  $\pm$  SD (n=2).

### 3.3 Analytical determinations

#### Gross composition

Dry matter (DM) was calculated by drying the sample at 60 °C for 24 hours, until constant weight. Protein content was determined by Kjeldahl, total lipids by Soxhlet previous acid hydrolysis, and ash gravimetrically [278]. Neutral detergent fiber (NDF) was determined gravimetrically [280]. Mycelia protein content for mutant strain characterization was determined by Biuret method proposed by Satari *et al.* [203]. Briefly, 100 mg of sample were mixed with 3 mL of 1 M NaOH and boiled for 10 minutes. After immediate cooling in an ice

bath, required dilutions were prepared with 1 M NaOH, CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O (2.5% w/v) (Merck, Darmstadt, Germany) was added to the test tubes (25% v/v final volume) and mixed gently for 5 minutes. The clear supernatant was collected after centrifugation and the absorbance was read at 555 nm. Different concentrations of bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) dissolved in 1 M NaOH were used as standards.

FA profile was determined as described previously [277]. Briefly, biomass (500-1000 mg) was mixed with 3 ml of methanol, 1.5 ml of chloroform (both from Fischer Scientific, Loughborough, UK) and 1.2 ml of water and homogenized for 1 minute. In addition, 1.5 ml of chloroform and 1.2 ml of water were added, homogenized again and centrifuged (1450 g, 15 min). Lipids were determined in the organic phase. Moisture and impurities were removed by passing through NaSO<sub>4</sub> (Fischer Scientific, Loughborough, UK). The solvent was evaporated under nitrogen flush. Fatty acid profile was determined as methyl esters by adding 5 ml of sodium methylate (0.2%) to previously extracted lipid fraction and boiled for 10 minutes in a reflux system. Samples were cooled in ice, neutralized by adding HCL (5% v/v) (Fischer Scientific, Loughborough, UK) in methanol and again boiled for 10 minutes, cooled in ice and mixed with 5 ml of n-hexane (Fischer Scientific, Loughborough, UK). Saturated NaCl was added and the organic phase was analyzed by GC-FID. Chromatograph was fitted with a DB-23 column of Agilent Technologies (60 m x 0.25 mm) and programed at 150 °C for 1 minute, a 5 °C/min gradient up to 200 °C, a second gradient of 2 °C/min up to 230 °C and 20 minutes at 230 °C. Fatty acid methyl esters were identified by comparing the retention times with standards and were expressed as percentages of total fatty acid methyl esters.

AA profile was determined by HPLC as done in results and discussion section 4.2. Protein quality was evaluated by the essential amino acid index (EAAI) as described before [282]. EAAI is based on the content of essential amino acids (EAA) compared to a reference protein or specific requirements for human nutrition [197], and it is used as a rapid method to evaluate and optimize the AA content of food and feed formulations. EAAI equation is described as follow:

$$EAAI = \sqrt[n]{\sum n \frac{\text{mg of EEA in 1 g of tested protein}}{\text{mg of EAA in 1 g of reference protein}}} \quad (eq.3)$$

n: the number of essential amino acids referenced



*Bioactive compounds extraction*

Bioactive compounds were extracted using water in order to determine the real availability of those compounds. 10 g of sample were mixed with 25 ml of distilled water and the mixture was placed in a rotary shaker (1 h, 180 rpm, 37 °C) in order to homogenize the flask content. Afterwards, the broth was centrifuged (10000 g, 10 minutes, 4 °C) and the supernatant, containing the water soluble metabolites, was filtered through a 0.45 µm filter. Those extracts were used for soluble protein, DH, antioxidant activity, total phenolic content (TPC), antibacterial activity and reducing sugars determination.

*Degree of hydrolysis (DH)*

The degree of hydrolysis (DH,%) was determined with the *o*-phthalaldehyde (OPA) method [284]. OPA reagent was prepared as follows: 3.7% w/v Na tetraborate decahydrate (B9876, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and 0.58% w/v Na-dodecyl-sulfate (SDS 99%, 230421000 Fischer Scientific, New jersey, USA) dissolved in deionized water. OPA (4% w/v, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in methanol was prepared and both solutions were mixed in 51.5:1 proportion. Finally, 0.38% v/v of β-mercaptoethanol (M6250 Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) was added to the solution. Na-Acetyl-L-lysine (250 µM, J65083, Alfa Aesar) was prepared in deionized water and subsequent dilutions were used as standard. The sample solution was adjusted to 0.05 g protein/l and 60 µl of sample or standard were added to microplate wells. 180 µl of OPA reagent was added to each well and incubated at ambient temperature for 5 minutes. The measurement was done at 360 nm excitation wavelength and 460 nm emission wavelength. DH was calculated as follows:

$$DH (\%) = \frac{h}{htot} * 100 \quad (eq. 4)$$

where *htot* are the total number of peptide bonds per protein equivalent, and *h* is the number of hydrolyzed bonds. As described by Nielsen *et al.* [284], for general purpose, *htot* = 0.8 g meqv/g prot. To calculate *h*, described equation is:

$$h(\text{meqv/g protein}) = \frac{\text{lysine NH2-}\beta}{\alpha} \quad (eq. 5)$$

As recommended [284], when raw material has not been examined previously, then  $\alpha$  and  $\beta$  are estimated to be 1.00 and 0.40 respectively, and *Lysine-NH2* is:

$$\text{Lysine NH2} = \frac{\text{meqv lysine}}{P} \quad (eq. 6)$$

where  $P$  is the protein (g/l) in the sample (0.05 g/l) and *meqv lysine* are the lysine milliequivalents estimated in the sample using the standard curve.

#### *Antibacterial activity*

The antibacterial activity of the extracts was determined by agar diffusion method [285]. Two bacterial species were used as test microorganisms, *Salmonella enterica* (CECT 4156) and *Escherichia coli* (CECT 516), and sub-cultured in Mueller-Hinton agar at 37 °C for 24-48 hours.

Sensible strains were inoculated in 10 ml of Mueller-Hilton broth until optical density (OD) reached 0.50 (approx.  $10^8$  cfu/ml) and incubated at 30 °C for 1 hour. Then, 100 µl of bacterial suspension was added to 4 ml of Mueller Hilton soft agar (0.7% bacteriological agar w/v) maintained at 48 °C, vortexed and quickly cast in a Mueller Hilton petri plate. After solidification, the wells (5 mm diameter Whatman filter n° 1) and the extracts were added (10 µl per each well) and incubated at 30 °C 24-48 hours. Antibacterial activity was measured as the diameter of the clear zone of pathogen growth compared to a positive antibacterial control, tetracycline (> 98% Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), (1 g/l) and a negative control (sodium phosphate buffer, 0.01 M, pH 7.5).

#### *Antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity)*

Antioxidant activity of samples was measured using the DPPH radical scavenging activity (DRSA) method. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, D9132 Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in methanol (25 ppm) was prepared and 280 µl of this solution was added to 20 µl of sample solution. The mixture was incubated at room temperature in the dark for 30 minutes. Absorbance was measured at 515 nm. The standard comprised of water-methanol (50% v/v) and different concentrations of Trolox (218940050, Acros Organics, New Jersey, USA). The antioxidant capacity was expressed as Trolox equivalent capacity (TEAC), µg Trolox equivalents/g DM using the calibration curve. The percentage of reduction of DPPH compared to the blank also was calculated:

$$\text{DPPH reduction (\%)} = \frac{\text{Abs blank} - \text{Abs sample}}{\text{Abs blank}} * 100 \text{ (eq. 7)}$$

#### *Total phenolic content (TPC)*

TPC was measured using the Folin-Ciocalteu method. Initially, 30 µl of Folin-Ciocalteu (J/4100/08, Fischer Scientific, Loughborough, UK) solution was added to 140 µl sample, blank or standard and 140 µl of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% (w/v) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The mixture was incubated at room temperature in the dark for 1 hour and the absorbance was

measured at 750 nm. Gallic acid (G7384, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) was used as standard at a concentration range of 1.4-20 ppm and results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per g of DM sample.

#### *Reducing sugars*

Reducing sugars were determined by Dinitrosalicylic (DNS) acid reagent method [276] adjusted to microplate assay procedure. Briefly, 25  $\mu$ l of DNS reagent were mixed with 25  $\mu$ l of sample, blank or standard (0-2.5 g/l of D-glucose) and incubated for 10 minutes at 100 °C. The microplate was cooled in an ice bath and 250  $\mu$ l of distilled water was added to each well. Absorbance was read at 540 nm.

#### *Soluble protein*

Soluble protein was determined by BCA (Bicinchoninic Acid) method (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) adjusted to microplate assay procedure. Briefly, 10  $\mu$ l sample or standard (0-2.5 mg/ml BSA) was mixed with 200  $\mu$ l of BCA working reagent (50:1, Reagent A:B) and incubated 30 minutes at 37 °C. Absorbance was read at 550 nm.

### **3.4 Solid State Fermentation (SSF)**

All SSF experiments were carried out on 135 mm diameter sterile plate (surface area 143.1 cm<sup>2</sup>) at 30 °C. SSF process was done using ROR004 strain and all variables were monitored from time 0 to 192 hours (n=4 in all cases except for time 0 hours, where n=2).

Factorial design methodology was used for optimal conditions determination. Factorial design consisted on two continuous factors (time and temperature) and one categorical factor (fungal strain). Considered runs included 2<sup>3</sup> factorial design (8 runs) and central points (4 runs) to determine the best combination between incubation time and temperature and the effect of used strain (categorical factor) on several response parameters (Protein, soluble protein, DH, TEAC, DPPH reduction and TPC). Overview of the complete design is described in Table 26.

In all cases, substrate density was 0.09 g of dry BSG/cm<sup>2</sup> and 10% of spore suspension (10<sup>7</sup> cfu/ml) was added to the fermentation substrates. Spore suspension was prepared as described before (results and discussion section 4.2).

Table 26. Coded variables screened for three levels (-, 0, +; factors A and B) or two levels (factor C).

Factor	Low (-)	0	High (+)
A: Time (h)	72	144	216
B: Temperature (°C)	20	25	30
C: Strain	ROR004 (2)		ROR004 G (1)

### 3.5 Submerged Fermentation (SmF)

During mutant selection, SmF was used to control changes in biomass production. Growth medium includes (g/l): 20 glucose (G/0450/65, Fischer Scientific, Loughborough, UK), 0.75 nitrogen (Protease peptone, Oxoid LP0085, Basingstoke, Hampshire, England), 3.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac Química SA, Barcelona, Spain), 0.5 MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, 0.5 FeSO<sub>4</sub> (both from Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and 0.5 KCl (Merck, Darmstadt, Germany). SmF was carried out on sterile 150 ml Erlenmeyer flasks (100 ml medium) at 170 rpm, incubated at 30 °C for 72 hours in dark conditions. Fungal spore suspensions were prepared as described before (results and discussion section 4.2), adjusted to 10<sup>7</sup> cfu/ml just before inoculation (1% v/v).

### 3.6 Statistical analysis

Experimental factors were considered significant when their probability (p-value) was less than 0.05 and were analyzed with one-way ANOVA (analysis of variance) using SPSS (IBM Corp. V 24.0, New York, USA). Differences between fermented and unfermented BSG composition, AA and FA profile were determined by T-student statistics. Normal data distribution was verified using Shapiro Wilk test and Levene test to assess the equality of variances. When equal variances were not assumed, Welch statistic was used to compare samples.

For factorial design analysis (software package Statgraphics Centurion XVI), the F test was used to analyze the statistical significance of proposed equations for each interesting parameter and the analysis of variance (ANOVA) for the response surface model. Factors were considered significant when their probability (p-value) was lower than 0.05.

## 4 Results and discussion

### 4.1 Wild strain modification

*Rhizopus* ROR004 is a wild strain obtained from spoiled fruit samples. This strain presents good technological properties and has been described previously (results and discussion section 4.2) but looking for an increase in the growth rate and final biomass production, several

procedures for genetical modifications were considered in this work. Treatment with UV result in  $98.8 \pm 0.4\%$  of spore's mortality and similar ratio is obtained with EB and MNNG,  $98.7 \pm 0.5$  and  $88.4 \pm 15.6\%$  respectively.

The success of our modifications was determined considering the growth rate of the obtained strains in PDA and comparing them with the wild strain. During initial selection round, strains with similar (or higher) growth rate than the wild strain were selected and isolated. These results were confirmed in successive re-growth steps in PDA. Finally, 4 strains presented a consistently higher growth rate than ROR004 and were selected for further selection.

Due to the difficulty of fungal growth estimation in SSF, possible mutants (4 strains) were grown in SmF at optimal conditions and results were compared to wild type ROR004. After 72 hours, growth, biomass, protein, and glucose consumption were analyzed. ROR004 G was significantly the strain with the highest biomass production (g/l) and biomass yield (g DM/g consumed glucose) (Table 27), and, therefore, was used together with ROR004 during SSF optimization.

Table 27. Comparison of consumed glucose (% of initial glucose), biomass (g DM/l), biomass yield (g DM/g consumed glucose), protein (% DM) and protein yield (g/l) of wild and mutant strains during SmF (30°C, 72 h, 170 rpm).

Strain	Consumed glucose	Biomass	Biomass yield	Protein	Protein yield
ROR004	$88.1 \pm 8.2^a$	$3.3 \pm 0.2^a$	$0.19 \pm 0.02^a$	$25.1 \pm 9.6^a$	$0.8 \pm 0.3^a$
ROR004 A	$83.5 \pm 9.5^a$	$3.5 \pm 0.6^a$	$0.21 \pm 0.02^a$	$24.6 \pm 3.8^a$	$0.9 \pm 0.2^a$
ROR004 B	$98.2 \pm 3.4^a$	$3.7 \pm 0.6^{ab}$	$0.19 \pm 0.04^a$	$24.3 \pm 5.8^a$	$0.9 \pm 0.3^a$
ROR004 G	$85.9 \pm 4.8^a$	$5.1 \pm 0.3^b$	$0.30 \pm 0.03^b$	$28.7 \pm 3.3^a$	$1.5 \pm 0.3^a$
ROR004 J	$93.1 \pm 5.7^a$	$4.0 \pm 0.2^a$	$0.21 \pm 0.02^a$	$28.6 \pm 2.3^a$	$1.1 \pm 0.1^a$

Same letter in the same column mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means  $\pm$  SD (n=3).

#### 4.2 BSG fermentation with *Rhizopus* sp.

In order to determine the variables that change along the SSF, initial experiments were performed and several characteristics, like protein concentration, biological activities and technological properties, were analyzed.

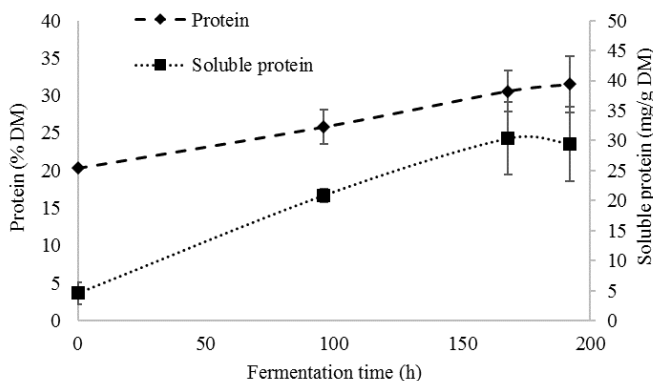


Figure 42. Protein (% DM) and soluble protein (mg/g DM) during SSF of BSG (from time 0 h to 196 h). Error bars represent SD (n=4 in all cases except for time 0 hours, where n=2).

Protein content significantly increases up to 150% of initial value, until a final concentration of  $31.5 \pm 3.7\%$  after 192 hours of incubation (Figure 42). Other authors have required urea supplementation to obtain similar protein ( $32.9 \pm 0.6\%$  after 168 hours) on fermented BSG using *R. oligosporus* [64] but our ROR004 seems to have lower nitrogen requirements (3.3% in our samples compared to 3.9% in the supplemented one, DM basis). In other nitrogen rich substrates, fermentation with *Rhizopus* sp. resulted in similar protein increase, such as rice bran (2.4% nitrogen DM basis) [144,145] and nitrogen supplemented fruit wastes (1.6% nitrogen DM basis) (results and discussion section 4.2). Vegetable mixture (3.5% nitrogen DM basis) also showed similar protein increase using *Aspergillus niger* as fermentation agent

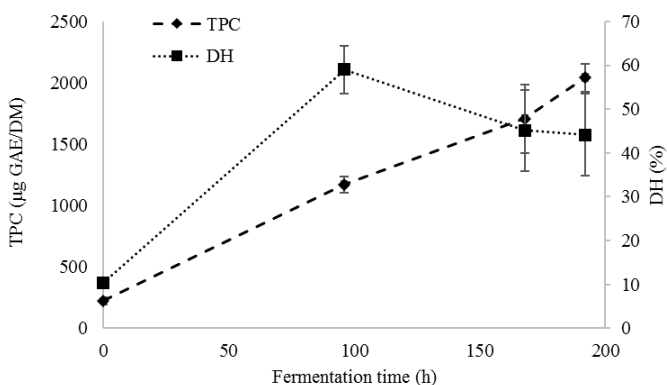


Figure 43. DH (%) and TPC (µg GAE/g DM) during SSF of BSG (from time 0 h to 196 h). Error bars represent SD (n=4 in all cases except for time 0 hours, where n=2).

The evolution of determined parameters in fermented BSG is very dependent on the considered incubation periods (up to 192 hours) (Figure 42, Figure 43, Figure 44). Clearly, SSF with *Rhizopus* sp. changes BSG composition and its TEAC, TPC and DH.

[361]. When low nitrogen substrates are used, otherwise, protein increase is not quite significant (results and discussion section 4.2).

Soluble protein is 6.5 times higher in fermented BSG compared to non-fermented one, probably due to high fungal protease activity (Figure 42). Other authors

have reported lower increase (4 times) compared to the non-fermented BSG although total soluble protein content was higher [64], which depends on the extraction system used. Highest soluble protein value is obtained after 192 hours ( $29.5 \pm 6.2$  mg/g DM), while the highest increase is observed in the initial 96 hours.

The DH (%) is significantly higher after 96 hours ( $59.0 \pm 5.4\%$ ) compared to other fermentation periods (Figure 43). This could be related to maximal peptide release happens at that moment. As fermentation continues, those peptides and AA are used for fungal protein formation. In any case, fermentation increases dramatically the free AA content of the product, and that could improve the protein availability in feed formulations.

TEAC and DPPH reduction are also significantly higher in the final extracts. The highest values are obtained at longest fermentation time, although there are no significant differences between 168 and 192 h, with a DPPH reduction of  $52.0 \pm 4.7\%$  and TEAC of  $965 \pm 84$   $\mu\text{g/g DM}$  (Figure 44). TPC also increases together with

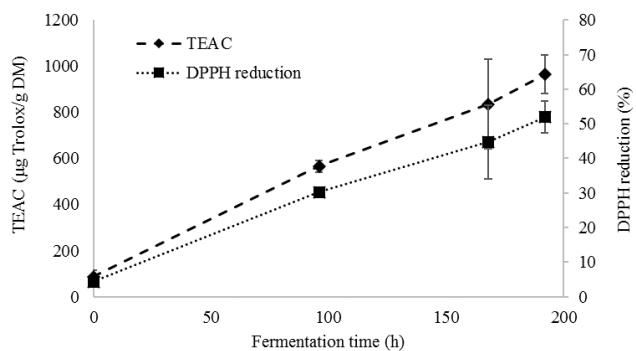


Figure 44. TEAC ( $\mu\text{g Trolox/g DM}$ ) and DPPH reduction (%) during SFF (from time 0 h to time 196 h). Error bars represent SD ( $n=4$  in all cases except for time 0 hours, where  $n=2$ ).

fermentation time until a final value of  $2043 \pm 114$   $\mu\text{g GAE/g DM}$  (Figure 43). Results show a significant lineal relation between TPC and TEAC ( $p < 0.05$ ), with a regression coefficient of 0.984 and  $R^2$  of 96.8. Buenrostro-Figueroa *et al.* [147] also found a positive correlation between antioxidant activity and TPC release during SSF of fig by-products. Our values show 9 times higher TPC in the final extracts compared to unfermented BSG from  $224 \pm 30$  to  $2043 \pm 114$   $\mu\text{g GAE/g DM}$ , higher than the values reported previously. This release could be related to the carbohydrate-cleaving enzymes ( $\beta$ -glucosidase) of the fungi, which hydrolyze  $\beta$ -glycosidic linkages [362] and release free aglycones with potential high antioxidant activity. DPPH reduction, otherwise, is lower compared to those studies. TPC and antioxidant activity are closely related; it has been reported that the use of high polyphenol diets in ruminants have promising effects in animal well-being and could be a future strategy for producing meat and milk with antioxidant properties [363-365].

No antibacterial activity is detected in the extracts obtained from fermented BSG, while positive inhibition is obtained with tetracycline (1 mg/ml) for *Salmonella enterica* (1 mm) and for *Escherichia coli* (2 mm). Therefore, antibacterial activity is not taken into account for the optimization process. These results agree with those obtained by Almeida *et al.* [357], who reported a negative antibacterial activity of BSG extracts. A similar situation is observed in reducing sugars concentration (result not shown), and it is discarded for further studies.

Finally, the visual inspection of the obtained product (supplementary material Figure 1, with plates photographed during fermentation evolution) corroborates that BSG is an ideal substrate for SSF with filamentous fungi, due to its composition and its particle size [48]. Small particles with rigid internal structure allow a complete fungal growth in a short period of time and a complete use of the inter-particle space [366].

This results in a homogenous fermented material and it avoids the presence of under-fermented areas (usually the inner parts of the solid substrates).

### **4.3 Optimization of fermentation conditions**

The statistical analysis of the results obtained show that proposed models are significant for the response factors considered (Table 28). As an overview, equations derived from proposed variables can predict positively protein proportion, soluble protein concentration, DH, TEAC, DPPH reduction and TPC. In all cases, p-values are lower than 0.05 (Table 28). The percentage of variation ( $R^2$ -value) that can be attributed to the independent variables indicates that those significant variables can explain in around 80-90% of the final value (65.5 for total protein, 96.8 for soluble protein, 77.7 for DH, 78.4 for TEAC, 78.6 for DPPH reduction and 92.6 for TPC).

Protein concentration (% DM) depends on the temperature and on the interaction of time and temperature. When fermentation time is shorter there are no differences between samples; otherwise, when fermentation time increases, higher temperature increases the protein content (Figure 45a). Fermented BSG is composed of  $31.7 \pm 7.6\%$  of protein at 30 °C and 9 days of fermentation (Table 29).

Soluble protein concentration significantly depends on time, temperature and the interaction between those two (Figure 45b). High temperature and long fermentation have a positive significant effect in protein content. Our model describes the maximal soluble protein ( $47.4 \pm 3.8$  mg/g DM) after 9 days of fermentation (Table 29). Other authors [64] have reported a maximum soluble protein after 6 days of fermentation.



Table 28. Statistical parameters (ANOVA) of the equations in each studied variable; protein (% DM), soluble protein (mg/g DM), TEAC ( $\mu\text{g}$  Trolox equivalent /g DM), DPPH reduction (%), TPC ( $\mu\text{g}$  GAE/ g DM).

Model	Protein	Soluble protein	DH	TEAC	DPPH reduction	TPC
Transformation	none	none	none	none	none	none
Model d.f.	3	4	4	4	4	4
P-value	0.0297*	0.0000*	0.0196*	0.0177*	0.0171*	0.0005*
Error d.f.	8	7	7	7	7	7
Std. Error	2.98977	2.50646	9.60358	131.34	9.94542	200.804
R <sup>2</sup>	65.5	96.8	77.7	78.4	78.6	92.6

\*Statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Time and temperature-time interaction are significant parameters for DH (Figure 45c). The DH is higher at middle fermentation time (96 hours). When time is shorter, higher temperature increases the DH, but when fermentation time is longer, lower temperature leads to higher DH. As mentioned above, fungal metabolism is higher at 30 °C and as fermentation time increases, this activity would result in amino acid assimilation for biomass production and would lead to a decrease in the DH of soluble proteins. However, DH is higher at any fermentation time compared to the unfermented BSG, showing that even short fermentation process would improve the amino acid availability of the BSG protein.

TEAC and DPPH reduction depend on time and temperature (Figure 45d and Figure 45e). Higher fermentation time and temperature provide the highest antioxidant activity and DPPH reduction,  $795 \pm 102 \mu\text{g}$  Trolox equivalent/g DM and  $59.7 \pm 7.7\%$  respectively (Table 29). There is no significant interaction between time and temperature. TPC also depends on time and temperature (Figure 45f). Long fermentation time and high temperature is the best combination for the highest TPC ( $2747 \pm 112 \mu\text{g}$  GAE/g DM). Temperature and time interaction is also a significant factor, while at lower fermentation periods temperature effect is lower, at higher fermentation time this effect increases. Other authors have also reported a release of phenolic compounds and an increase of antioxidant activity during rice bran and plum fruit fermentation using *R. oryzae* and *R. oligosporus* as fermentation agents [144,146,367]; nonetheless, to the best of our knowledge there are no studies related to BSG.

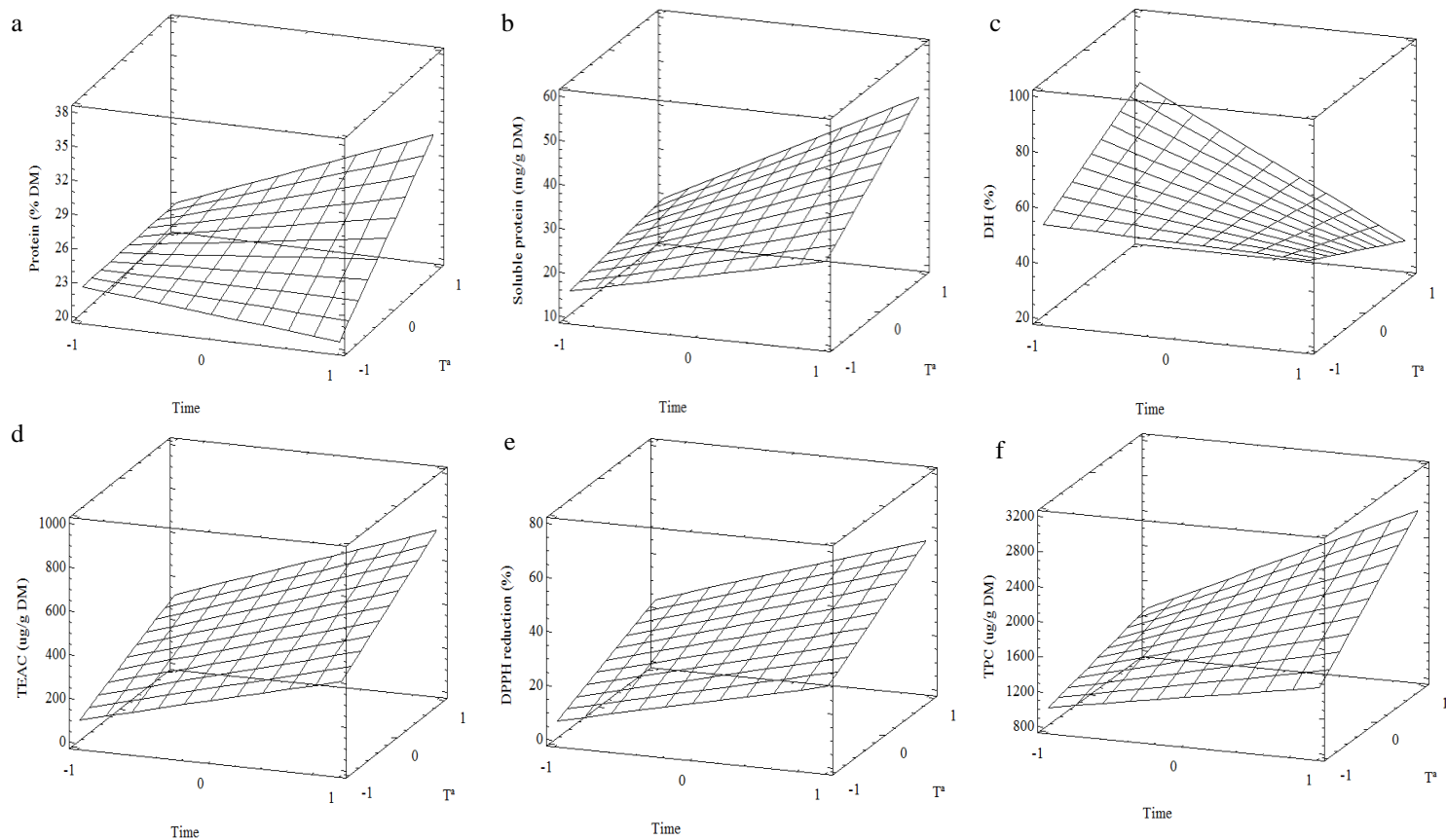


Figure 45. Response surface methodology (RSM) analysis of variables (a: RSM analysis for protein concentration (% DM); b: RSM analysis for soluble protein (mg/g DM); c: RSM analysis for DH (%); d: RSM analysis for TEAC ( $\mu\text{g}$  Trolox/g DM); e: RSM analysis for DPPH reduction (%); f: RSM analysis for TPC ( $\mu\text{g}$  GAE/g DM)).

Table 29. Observed and predicted results of factorial design during BSG fermentation. Protein (% DM), soluble protein (mg/g DM), TEAC ( $\mu\text{g}$  Trolox equivalent /g DM), DPPH reduction (%), TPC ( $\mu\text{g}$  GAE/g DM).

Time	Strain	T <sup>a</sup>	Protein		Soluble protein		DH		TEAC		DPPH reduction		TPC	
			Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs
1	2	1	31.5	37.0	45.7	44.7 $\pm$ 2.6	30.3	32.3 $\pm$ 0.5	709	723 $\pm$ 21	53.2	54.2 $\pm$ 1.6	2564	2668 $\pm$ 48
-1	1	-1	22.5	23.2	15.5	14.2 $\pm$ 0.4	53.2	55.5 $\pm$ 1.6	97	138 $\pm$ 44	6.5	9.6 $\pm$ 3.4	1005	1012 $\pm$ 21
0	2	0	24.1	22.9	25.1	21.8 $\pm$ 0.5	53.0	55.4 $\pm$ 0.9	355	255 $\pm$ 46	26.2	18.6 $\pm$ 3.5	1475	1120 $\pm$ 24
0	1	0	24.1	23.3	28.0	26.2 $\pm$ 3.5	52.6	54.4 $\pm$ 1.6	392	277 $\pm$ 79	28.9	16.5 $\pm$ 6.0	1646	1491 $\pm$ 269
-1	2	1	22.3	22.2	16.5	19.0 $\pm$ 1.3	77.5	66.0 $\pm$ 0.7	291	362 $\pm$ 66	21.3	26.7 $\pm$ 5.0	1144	1263 $\pm$ 47
-1	2	-1	22.5	23.0	12.5	14.2 $\pm$ 0.8	53.6	46.0 $\pm$ 0.8	60	154 $\pm$ 60	3.7	10.8 $\pm$ 4.6	834	1020 $\pm$ 54
1	1	-1	20.4	21.9	28.4	28.6 $\pm$ 1.7	50.3	48.3 $\pm$ 0.5	396	443 $\pm$ 52	29.2	32.7 $\pm$ 4.0	1528	1671 $\pm$ 8
1	2	-1	20.4	20.1	25.5	25.8 $\pm$ 6.4	50.7	47.3 $\pm$ 1.0	359	446 $\pm$ 15	26.4	33.1 $\pm$ 1.1	1357	1406 $\pm$ 62
1	1	1	31.1	26.3	48.6	50.0 $\pm$ 3.2	29.9	22.5 $\pm$ 0.2	746	867 $\pm$ 15	55.9	65.1 $\pm$ 1.1	2736	2825 $\pm$ 59
0	1	0	24.1	23.7	28.0	31.5 $\pm$ 4.8	52.6	51.7 $\pm$ 1.8	392	282 $\pm$ 36	28.9	20.6 $\pm$ 2.8	1646	1486 $\pm$ 39
-1	1	1	22.3	23.7	19.4	17.4 $\pm$ 0.2	77.1	83.3 $\pm$ 1.5	328	392 $\pm$ 282	24.1	28.9 $\pm$ 1.1	1316	1391 $\pm$ 7
0	2	0	24.1	21.6	25.1	24.8 $\pm$ 0.6	53.0	71.1 $\pm$ 1.0	355	188 $\pm$ 26	26.2	13.6 $\pm$ 1.9	1475	1372 $\pm$ 34

Data are average of three determinations for each obtained extract (n=1); pre: predicted; obs: observed; coded variables are described in Table 26.

During the SSF processes, the production of enzymes (amylases, pectinases, xylanases, proteases,  $\beta$ -glucosidase, tannase, and ellagitannase) and their synergic activity would increase the TPC release, enhancing the TEAC of the obtained extracts.

Strain effect is not significant for any of the studied variables, that could be because mutagens did not have any significant effect on the protein synthesis metabolism, TPC release and other studied variables.

Optimal conditions for all variables, except for DH, are high temperature and long fermentation time (30 °C, 216 hours, Table 30). However, for DH, optimal conditions are high temperature but short fermentation time (Table 30). Although there are no statistical differences between strains, protein concentration, DH and DPPH reduction are maximal using strain 2 (ROR004) and the highest soluble protein, TEAC and TPC are obtained using strain 1 (ROR004 G). As an overall strategy for BSG valorization, the attempt is to optimize all responses at a time; in that case, the optimal conditions are 30 °C, 216 h of fermentation time. These conditions would lead to a fermented BSG with 31.1% protein, 48.6 mg soluble protein/g DM, 29.9% DH, 746  $\mu$ g Trolox equivalent/g DM, 55.9% DPPH reduction and 2736  $\mu$ g GAE/g DM.

*Table 30. Optimal conditions and maximal value for each variable; protein concentration (% DM), soluble protein (mg/g DM), TEAC ( $\mu$ g Trolox equivalent /g DM), DPPH reduction (%), TPC ( $\mu$ g GAE/ g DM).*

Factor	Protein	Soluble protein	DH	TEAC	DPPH reduction	TPC
A: Time (h)	216	216	72	216	216	216
B: Temp. (°C)	30	30	30	30	30	30
C: Strain	2	1	2	1	1	1
Maximal	31.1	48.6	77.5	746	55.9	2736

As described in Table 26, Strain ROR004 G is coded as strain 1 and strain ROR004 is coded as strain 2.

#### **4.4 Fermented BSG composition and Amino acid and Fatty acid profile**

Fermented BSG gross composition changes during fermentation (day 9, 30 °C) (Table 25). Total lipid content goes from  $11.1 \pm 0.1\%$  in the not fermented sample to  $3.8 \pm 0.4\%$  after complete fungal growth (Table 25). Other authors have reported also a decrease in total lipids of fermented rice bran [321] due to fungal lipase activity [23]. Protein and NDF, however, increase. NDF is composed by cellulose, hemicellulose, lignin and cutin, and it is also known as fibrous carbohydrate [368]. Its main objective is to maintain ruminal function avoiding the appearance of digestive disorders [45] and therefore, minimum quantities are established depending on the specie and production objective. Unfermented BSG is already used by

ruminants due to its high proportion of fiber compounds and like proportion is slightly higher in the fermented product, it should continue using as ruminant animal feed [350]. However, there are studies that reported the use of unfermented BSG as fish feed (30% w/w) with improvement of body weight gain [369]. The increase in protein proportion is one of the most interesting effects of SSF in the fermented biomass, which could convert it into a high value alternative of plant proteins. In any case, important factors such as, metabolizable, digestible and absorbable protein should be determined before production of ruminant feed [45].

The AA profile of the fermented BSG is dominated by Glu, Asp, Ala, Leu and Lys (Table 31), with high proportion of essential amino acids (EAA up to 43.1%). Fermented BSG AA profile differs from the unfermented sample in some of the AA: an increase in Met, Gly and Ala proportion and a decrease of Glu, Arg, Pro, Leu and Phe percentage. However, the total EAA percentage does not differ significantly ( $p < 0.05$ ) within the samples.

Although the general profile does not differ significantly, the total amount of almost all AA significantly increases in the fermented BSG (Table 31). Compared to unfermented BSG, the concentration of Asp, Ser, Glu, His, Thr, Ala, Cys, Val, Met, Lys, Ile, Leu, Tyr, Arg and Phe (mg AA/g BSG) is significantly higher in the fermented BSG. In consequence, overall EAA content in fermented BSG is 1.5 times higher than in the unfermented one. AA composition of fermented BSG was evaluated for the essential amino acid index (EAAI). Higher EAAI indicates the presence of higher concentration of EAA. EAAI for fermented BSG is 1.58 compared to human nutrition FAO standard [197] what means that AA fulfills human requirements.

The essential AA profile of fermented BSG is comparable to standardized feed (fish meal and soybean meal) [32,105] except for Met. However, each EAA content (mg/g product) of fermented BSG is lower than fish meal due to its high protein proportion, 64-70%, and more similar to soybean meal [162]. Lysine percentage in fermented BSG is similar ( $6.8 \pm 0.4\%$ ) compared to fish meal and soybean meal (7.5 and 6.08% respectively). The essential amino acid composition of fermented BSG makes it an interesting alternative protein source and could contribute greatly towards promoting a sustainable protein source for feed and food applications.

*Table 31. AA profile (% of total AA) and total amino acid content (mg/g BSG) of the unfermented and fermented BSG at optimal conditions (30 °C, 216 h).*

AA	AA profile		AA content	
	Unfermented BSG	Fermented BSG	Unfermented BSG	Fermented BSG
His	2.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	8.5 ± 1.5 <sup>b</sup>
Ile	3.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	11.6 ± 0.5 <sup>b</sup>
Leu	8.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	7.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	16.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	23.9 ± 1.0 <sup>b</sup>
Lys	5.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	6.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	11.5 ± 2.2 <sup>a</sup>	21.3 ± 1.3 <sup>b</sup>
Met	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.7 <sup>b</sup>
Cys	1.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.9 <sup>b</sup>
Phe	5.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	11.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	14.7 ± 1.1 <sup>b</sup>
Tyr	3.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	6.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	13.8 ± 3.4 <sup>b</sup>
Thr	4.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	14.4 ± 0.9 <sup>b</sup>
Val	5.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	18.5 ± 1.5 <sup>b</sup>
EAA	41.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	43.1 ± 2.3 <sup>a</sup>	83.9 ± 2.6 <sup>a</sup>	135.8 ± 7.3 <sup>b</sup>
EAAI <sup>1</sup>	1.47 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.08 <sup>a</sup>		
Arg	6.1 ± 0.5 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	12.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	15.8 ± 2.1 <sup>b</sup>
Asp	7.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	10.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	15.1 ± 4.1 <sup>a</sup>	31.7 ± 1.5 <sup>b</sup>
Ser	5.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	10.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	16.5 ± 0.9 <sup>b</sup>
Glu	20.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	16.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	42.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	50.3 ± 2.7 <sup>b</sup>
Gly	4.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.7 <sup>b</sup>	9.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	17.5 ± 2.3 <sup>b</sup>
Ala	5.9 ± 1.0 <sup>a</sup>	9.6 ± 1.7 <sup>b</sup>	12.0 ± 1.9 <sup>a</sup>	30.3 ± 5.3 <sup>b</sup>
Pro	9.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	5.4 ± 1.2 <sup>a</sup>	18.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	17.1 ± 3.6 <sup>a</sup>
NEAA	59.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	56.9 ± 2.3 <sup>a</sup>	120.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	179.2 ± 7.3 <sup>b</sup>

Same letter in the same row mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (n = 4); 1: based on [197].

Fermentation modifies the fat fraction of the BSG. For raw or fermented BSG, predominant FA include palmitic (C16:0), oleic (C18:1n-9) and linoleic (C18:2n-6), but fermentation changes FA profile (Table 32). Fungal growth resulted in a significant increase of C16:0, C18:0, C18:1n-9, C20:0, C20:1n-9, C22:0 and C24:0, leading to a significant increase of the saturated fatty acid (SFA) and monounsaturated fatty acid (MUFA). Linoleic acid (C18:2n-6) decreases significantly in the fermented BSG leading to an overall significant decrease of polyunsaturated fatty acid (PUFA) proportion. Gamma linolenic acid (GLA C18:3n-6), a characteristic FA of *Rhizopus* sp. biomass [321,370] and related to anti-inflammatory effects [343], is only detected in fermented BSG as expected. Several medium and long-FA (14:1,

15:0, 15:1, 17:0, 17:1, 20:5n-3, 22:1, 22:5n-3 and 22:6n-3) are not detected in any of the samples.

Biomass composition is a critical aspect for using fungi biomass protein (FBP) for animal feeding or human consumption purposes. Using filamentous fungi as fermentation of BSG leads to a protein rich substrate with higher EAA content and DH. SSF also increases the antioxidant activity of the fermented BSG related to the release of phenolic compounds, what makes SSF a promising alternative to revalorize this agro-industrial by-product as high valuable ingredient for feed and food applications. Furthermore, BSG is also known for containing peptides related to antihypertensive activity [216], for its beneficial nutritional composition (high fiber, protein and  $\beta$ -glucans content) and for specific phenolic compounds (ferulic, caffeic and p-coumaric acid) related to anti-cancer, anti-atherogenic and anti-inflammatory effects [57]. Further research is needed to evaluate the effect of SSF by *Rhizopus* sp. in the liberation of those specific peptides and phenolic compounds.

Table 32. FA profile (% of total FA) of the unfermented and fermented BSG at optimal conditions (30 °C, 216 h).

FA	Unfermented BSG	Fermented BSG
14:0	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
16:0	25.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	31.0 ± 1.4 <sup>b</sup>
16:1	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
18:0	2.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.9 ± 1.0 <sup>b</sup>
18:1n-9	12.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	17.8 ± 4.1 <sup>b</sup>
18.2n-6	54.5 ± 2.9 <sup>b</sup>	34.2 ± 4.8 <sup>a</sup>
18:3n-6	BL <sup>a</sup>	1.9 ± 1.1 <sup>b</sup>
18:3n-3	2.8 ± 3.0 <sup>a</sup>	0.6 ± 1.2 <sup>a</sup>
20:0	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>b</sup>
20:1n-9	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>b</sup>
22:0	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.3 <sup>b</sup>
24:0	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.5 <sup>b</sup>
SFA	29.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	42.8 ± 2.5 <sup>b</sup>
MUFA	13.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	20.5 ± 4.2 <sup>b</sup>
PUFA	57.3 ± 0.8 <sup>b</sup>	36.7 ± 4.7 <sup>a</sup>

BL: below detection limit; same letter in the same row mean no significant difference between the samples at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (unfermented BSG n = 4, fermented BSG n=5).

## **5 Conclusions**

Hereby, fungal SSF is a successful strategy for BSG valorization in order to produce a valuable, sustainable, non-climate dependent protein source for animal feed or human food formulations. Compared to the original BSG, the fermented product has a higher protein content, DH and total soluble protein. Furthermore, the TPC of the final product is 11 times higher leading to an increase of its TEAC and is richer in EAA. In any case, specific feed formulations and feeding trials are vital to determine the effect of using fermented BSG as animal feed.



## **4.5: A combined integral strategy for fruit and vegetable by-product valorization by fungal submerged and solid state fermentation**



Article to be submitted

## 1 Abstract

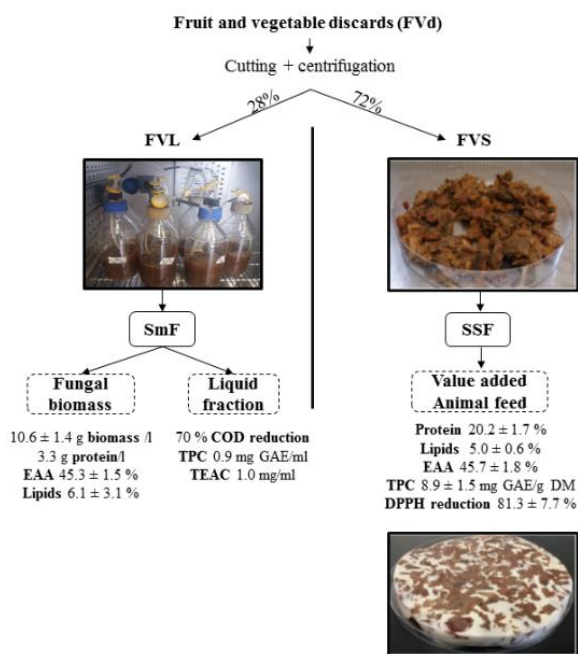


Figura 46. Graphical abstract section 4.5.

fermented biomass has 1.9 times higher protein content (up to  $20.2 \pm 1.7\%$  DM) with an improved amino acid (AA) profile ( $45.7 \pm 1.8\%$  essentials amino acids) and modified fatty acid (FA) profile; higher monounsaturated (MUFA) and lower polyunsaturated fatty acid (PUFA) content compared to initial substrate. Phenolic compound concentration is double in final biomass than in initial substrate (up to  $8.9 \pm 1.5$  mg GAE/g DM) and fermentation results in extracts with higher antioxidant activity (DPPH reduction of  $81.3 \pm 7.7\%$  and TEAC of  $3.6 \pm 0.3$  mg/g DM).

The fruit and vegetable leachate (FVL) obtained by centrifugation of FVd is treated by SmF and leads, per liter of substrate, to  $10.6 \pm 1.4$  g of fungal biomass and 3.3 g protein/l after 7 days of fermentation. Chemical Oxygen Demand (COD) is reduced in 70% and obtained fungal biomass is rich in PUFA ( $27.1 \pm 7.2\%$  of total FA) and have an AA profile comparable to soybean meal, with  $45.3 \pm 1.5\%$  of essential amino acids (EAA). After harvesting the biomass, remaining liquid fraction shows antioxidant activity.

The present research describes an integral strategy for fruit and vegetable discards (FVd) valorization using solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) by *Rhizopus* sp. After fermentation in SSF with model substrate, obtained yield ( $243.6 \pm 5.7$  mg biomass/g dry substrate) is higher than expected, probably due to higher nitrogen concentration in model substrate than in fruit containing samples. When SSF is carried out in real solid fruit and vegetable by-products (FVS) obtained after cutting and centrifugation of FVd,

This paper describes an integral valorization, by combining SSF and SmF, of FVd as a feasible strategy, resulting in high value end-products which could be used as alternative feeds.

## 2 Introduction

Worldwide, one-third of produced food for human consumption, approximately 1.3 billion tons per year [4], get lost or wasted. Discards of fruit and vegetable industry (FVd) are higher comparing with cereals, roots, dairy, oils, seeds, beverages and animal products [47]. This industry generates 12 million of tons of vegetable and fruit discards per year in Europe, where the greatest proportion of losses, around 20%, are attributed to the agricultural production [4]. Considering the potential environmental problems caused by this huge quantity of organic material, efficient by-product valorization and waste reduction strategies are necessary to reduce environmental impact and to increase food chain sustainability. In addition, efficient uses of FVd would reduce farmer losses and would co-generate an economic input.

Environmental objectives set by EU directive 2018/851 [2] establishes that food wastes cannot be disposed of in landfill and required valorization and bioconversion with potential to be recycled or used in other processes, due to environmental and economic concerns.

Valorization alternatives applied to FVd are, usually, focused on extraction of value-added products, including essential oils, polyphenols, anti-cancer compounds, pigments, enzymes; or focused on the production of new foods and Single Cell Protein (SCP) [7]. At this moment, the main impediment to use vegetable or fruit by-products in quality animal feed is the low nutritional value of some of these by-products (mainly due to low protein content and high humidity), as well as the low digestibility of the nutrients and possible presence of mycotoxins. Seasonal variability is also a problem in terms of ensuring a constant supply to feed industry. Thus, it is necessary to develop processes to improve both aspects, the nutrient quality, such as, proteins, fatty acids (FA), essential amino acids (EAA), and the feasibility of production in a controlled and sustainable way over time [371,372].

Bioconversion is defined as “*the use of biological processes or materials to change organic substances into a new form*” [373]. An important step in bioconversion process design is the bioconversion-agent selection. Several organisms can be used, including yeast, bacteria, fungi or insect. Comparing with yeast or bacteria, fungi are easy to be harvested, have low nucleic acid and high protein proportion [155], have demonstrated as valid agents for very diverse by-products production [185,361,374,375] and can release antioxidant compounds during fermentation [142]. In addition, fungi are the main microorganism used in solid state

fermentation (SSF) [163], mainly because they have a special ability to penetrate into the mass of solids and due to the high oxygenation ratio that is possible [124]. They are known to produce enzymes which degrade plant cell walls and could also improve biochemical composition and bioactivity of the employed substrates [114,119,127,214].

Among fungi, different species of *Rhizopus* have been used for the production of high-value products due to their capacity to consume a great range of carbon sources [85], lipase and protease production [129,248] and as food industry by-products valorization [161,272,342]. *Rhizopus* sp. is also used as bioconversion agent in submerged fermentation (SmF) to reduce chemical oxygen demand (COD) of wastewaters [155,162,328], converting the wastewater organic substances into readily harvestable fungal biomass, rich in fungal bioprotein (FBP) and chitosan [174,340], which can be used as a source of animal feed and potentially in human diets.

In this context, the use of *Rhizopus* biomass and nutritionally enriched fruit and vegetable solids (FVS) by SSF as alternative to soybean and cereals for feed manufacturers could be an exceptional example of resource efficiency in the circular economy of the EU. One of the keys to sustainable feed industry development, is the efficient use of available resources, including the reduction of food waste and the application of new resources for animal feed that do not compete with human food. Cereals and oilseeds are the fundamental component of feed, their impact on prices is very high and manufacturers need a continuous and guaranteed supply that allows them to cover the needs of feed [8]. The EU is totally dependent on imports to supply the internal market with protein intended for animal feed (mainly soya). Therefore, new alternative sources of protein are urgently needed.

Using *R. oryzae* for fruit SSF, our research group obtained fruit by-products enriched in FA, amino acids (AA) concentration and with improved AA profile (results and discussion section 4.2). Most critical parameters for highest biomass production (by-product, surface, T<sup>a</sup>, time, and nitrogen) have been previously optimized in model substrate and in some real substrates (Brewer's spent grain, BSG) (results and discussion sections 4.2 and 4.4). However, this protocol was not optimized for producing biomass for feed or food application and do not face the problems of fruit and vegetable leachate (FVL), the by-product obtained prior to the SSF. In addition, a model for protein rich fungal biomass production and reducing sugar consumption in SmF has also been developed (results and discussion section 4.3) and need to be integrated in a general strategy. Hence, for carrying out a full strategy for FVd valorization and bioconversion, we combine the models developed previously for SSF (results and

discussion section 4.2) and SmF (results and discussion section 4.3) and apply them to real by-products.

### 3 Materials and methods

#### 3.1 Microorganism and culture media

Commercial *R. oryzae* culture (internal code ROR001) and ROR003 and ROR004, two food-derived *Rhizopus* strains isolated and characterized in our laboratory (results and discussion section 4.2) were used.

Potato dextrose agar and buffered peptone water (both from Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) were used for fungal propagation, count and dilution when required. Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany) was used for inoculum preparation. All media were prepared as recommended by the producer and sterilized at 121 °C for 15 minutes. Plates for total fungal counts were incubated at 30 °C for 48 h.

#### 3.2 Fruit and vegetable discards

For SSF model validation, a model substrate composed by fruits and vegetables was considered. This substrate includes 19.3% tomato, 40.3% apple, 10.5% plum, 24.6% cucumber and 5.3% green bean. The mixture was grinded until a purée was obtained, and water was extracted using a mesh. Sample was treated with UV exposure for 1 h.

Substrate for SSF and SmF was a fruit and vegetable by-product mix obtained from Mercabilbao (perishable food distribution center, Basauri, Spain). The mix (48 kg) was composed by 28.6% of citric fruits (53.6% tangerine, 43.5% orange and 2.9% lemon), 34.7% of other fruits (28.7% nectarine, 19.2% apple, 19.2% pear, 15.6% watermelon, 15.0% pomegranate and 2.4% banana) and 36.7% of vegetables (16.9% tomato, 13.0% pumpkin, 11.9% onion, 11.3% green bean, 7.3% pepper, 6.2% aubergine, 5.6% leek, 5.6% artichoke, 5.6% cabbage, 5.1% carrot, 2.8% broccoli, 2.3% potato, 2.3% asparagus, 2.3% chard and 1.7% lettuce). After cutting (Robot coupe R 10 v.v), the samples (48.2 kg, initial DM 14.4 %) were centrifuged in a vertical axis centrifuge with filter bag (Comteifa 1950 RPM) and 13,4 liters of leachate were obtained. Solid samples (fruit and vegetable solids, FVS, 20 % DM) were used for SSF and the leachate (FVL, fruit and vegetable leachate) for SmF and model validation. No adjust was required for these substrates. Solid sample was dried at 60 °C for 2 hours. Both solid and liquid samples were sterilized (121 °C, 15 min) before inoculation.

### **3.3 Analytical determinations**

Except when specified, all results are average of three (n=3) completely independent experiments.

#### *Gross composition*

During SSF model validation formed mycelia was removed from the substrate, washed twice with distilled water (2:1 v/w) and filtered through 300 µm metal filter. During SmF *Rhizopus* biomass was filtered through 300 µm and washed once with distilled water (2:1 v/w). Retentate was considered as mycelium. It was not possible to harvest fungal biomass from FVS after SSF.

Dry matter (DM) was calculated by drying the sample at 60 °C for 24 hours, until constant weight. Protein of the substrates was determined by Kjeldahl method and total lipids by Soxhlet [33].

Mycelia protein content in SmF biomass was determined by Biuret method as proposed by Satari *et al.* [34] and described in results and discussion section 4.3. Obtained results were adjusted to Kjeldahl protein as done in results and discussion section 4.3 (x 1.22).

Total fat and FA profile in SmF biomass were determined as described previously in results and discussion section 4.3.

AA profile was determined by HPLC as done in results and discussion section 4.2 and protein quality was evaluated by the EAAI as explained in results and discussion section 4.3.

Total reducing sugars were determined by Dinitrosalicylic (DNS) acid reagent method [276] as done in results and discussion section 4.1, and COD of liquid fractions was determined as done in results and discussion section 4.3.

#### *Bioactive compounds extraction*

Bioactive compounds were extracted from unfermented and fermented FVS using water as solvent as done in results and discussion section 4.4. Those extracts were used for determination of soluble protein, degree of hydrolysis (DH), antioxidant activity, total phenolic content (TPC), antibacterial activity and reducing sugars as done in results and discussion section 4.4.

### **3.4 Solid State Fermentation (SSF)**

All SSF experiments were carried out at 30 °C on 135 mm diameter sterile plate (surface area 143.1 cm<sup>2</sup>), with an estimated substrate density around 0.09 g of dry fruit/cm<sup>2</sup>. During SSF,

two fermentation substrates were used: model purée of fruits and vegetables for comparison with published results (results and discussion section 4.2) and the mix of fruit and vegetable by-product after centrifugation (FVS). SSF runs of model substrate were inoculated with 1% of spore suspension ( $10^6$  cfu/ml) as done in results and discussion section 4.2. SSF runs of FVS, however, were inoculated with 10% of spore suspension ( $10^7$  cfu/ml) as done in results and discussion section 4.4. Spore suspension was prepared by mixing the mycelia formed in a PDA plate (after 5 days of incubation at 30 °C) with 20 ml of sterile distilled water with 0.01% Tween 80, maintained for 24 h at 30 °C and filtered through 300 µm sterile filter to obtain the liquid spore suspension.

For model validation, three fungal strains (ROR001, ROR003 and ROR004 strains) were incubated up to 3 days in model substrate and biomass yield obtained was compared with the biomass predicted with the model. Protein and AA profile of the fungal biomass (n=2) in SSF were determined.

SSF process with FVS was carried out up to 8 days. Protein, total lipids, AA profile and FA profile were determined in the fermented and unfermented biomass (n=2), and soluble protein, DH, TEAC, DPPH reduction and TPC in soluble extracts of both samples (time 0, n=2; time 8 days, n=4). Samples were frozen (-18 °C) up to analysis.

### **3.5 Submerged fermentation (SmF)**

SmF was carried out with FVL and model was validated in real by-products. SmF was carried out on sterile 1 l pirez bottles (500 ml medium) with sterile air flux (2.0 v/v per minute), incubated at 30 °C, inoculated with 0.1% of spore suspension in dark conditions and without shaking. Inoculum spore suspension was prepared as described above and adjusted to  $10^7$  cfu/ml just before inoculation.

Biomass was harvested after 4 and 7 incubation days. Medium reducing sugar consumption was determined at 0, 24, 48, 72, 96 and 168 h, COD at 0, 48, 96 and 168 h and TPC and TEAC at 0, 96 and 168 h. Samples were frozen (-18 °C) up to analysis (n=3).

### **3.6 Statistical analysis**

Experimental factors were considered significant when their probability (p-value) was less than 0.05 and were analyzed with one-way ANOVA (analysis of variance). Differences between fermented and unfermented FVS composition, AA and FA profile were determined by T-student statistics. Normal data distribution was verified using Shapiro Wilk test and Levene test to assess the equality of variances. When equal variances were not assumed, Welch

statistic was used to compare samples. All statistical analyses were performed using SPSS (IBM Corp. V 24.0, New York, USA).

## 4 Results and discussion

### 4.1 Effect of vegetables on SSF

There are, mainly, two differences between the substrate used for modeling (results and discussion section 4.2) and FVS: the physical state (fruits were purée and FVS is a particulate material) and the nitrogen content (much higher when vegetables are considered). In order to evaluate the effect of these variables, model fruit and vegetable sample (described as model substrate in material and methods) was converted in purée and fermented. The effect of particle is discussed along this paper, and the effect of the nitrogen content is estimated comparing the obtained yield (high nitrogen) and the expected yield resulting of the application of the published equation (results and discussion section 4.2).

Obtained results in SSF of model substrate (18% DM) are higher than the predicted values for low nitrogen substrate. The equation already published for fruits (results and discussion section 4.2) predict  $110.6 \pm 1.7$  mg biomass DM/g dry substrate and obtained average value is  $243.6 \pm 5.7$  mg biomass DM/g dry substrate (Table 33). All strains result in similar biomass production, as reported previously for SSF (results and discussion section 4.2). Differences between predictions (only fruit) and the obtained results in model substrate can be due to higher nitrogen content in the last one, mainly because the vegetable addition. While fruit samples have around  $2.6 \pm 0.1\%$  protein (results and discussion section 4.2, Table 13), model substrate arrives up to  $10.5 \pm 0.3\%$  protein and this would allow a higher biomass production.

*Table 33. Obtained and predicted biomass yield (mg biomass/g DM), protein production (% DM) and protein increase (%) of fermented fruit and vegetable model substrate.*

Strain	Obtained biomass yield	Predicted biomass yield	Fermented product protein estimation	Protein increase in fermented product
ROR001	$248.6 \pm 6.7^a$	$109.6 \pm 0.6$	$14.8 \pm 0.2^a$	$41.2 \pm 1.9^a$
ROR003	$245.0 \pm 7.9^a$	$111.9 \pm 0.5$	$14.5 \pm 0.1^a$	$38.5 \pm 1.0^a$
ROR004	$237.3 \pm 7.1^a$	$110.6 \pm 2.5$	$14.4 \pm 0.2^a$	$38.4 \pm 1.4^a$

Same letter in the same column mean no significant difference between the means at 95% confidence; values are expressed as means  $\pm$  SD (n=3); protein estimation is calculated as the sum of the protein in the obtained biomass yield and in the fruit and vegetable sample.

### 4.2 Composition after SSF

FVS gross composition changes significantly after fermentation (Table 34). Fermentation reduces 34 times the reducing sugars content of the samples (from  $213.0 \pm 5.1$  to



27.6 ± 8.9 mg/g DM) and significantly increases (x 1.9) the protein content of fermented samples until a final concentration of 20.2 ± 1.7% (Table 35). Published results using substrates with similar protein content, like rice bran [144,145] and nitrogen supplemented fruit wastes (results and discussion section 4.2) reported lower protein content gain (close to 1.5 fold in both cases). BSG fermentation with *Rhizopus* sp. (results and discussion section 4.4) also leads to lower protein increase. Other authors, using *A. niger* as biotransformation agent of vegetable wastes, reported 1.4 fold increase (initial value 21% protein) [361]. It can be speculated that, when initial protein content is higher (i.e. rice bran 14% protein and BSG 20% protein), SSF with *Rhizopus* increases protein in a lower factor that when initial protein is lower, as happens in FVS, but further experiments are required to clarify if a maximum protein concentration exists. However, a minimum initial protein content is necessary for fungal growth, as demonstrated before (results and discussion section 4.2).

Table 34. Reducing sugars (mg/g DM), soluble protein (mg/g DM), DH (%), TEAC (mg Trolox equivalent /g DM), DPPH reduction (%) and TPC (mg GAE/g DM) of soluble extracts before and after SSF.

	Reducing sugars	Soluble protein	DH	TEAC	DPPH reduction	TPC
UFVS	213.0 ± 5.1 <sup>a</sup>	145.2 ± 1.9 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	45.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
FFVS	27.6 ± 8.9 <sup>b</sup>	139.0 ± 20.8 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	81.3 ± 7.7 <sup>b</sup>	8.9 ± 1.5 <sup>b</sup>

UFVS: Unfermented FVS; FFVS: fermented FVS; same letter in the same column mean no significant difference between the samples at 95% confidence; data are expressed as means ± SD (unfermented FV n=2, fermented FV n=4).

Particle structure has revealed critical for final product composition and *Rhizopus* growth. SSF of FVS (DM 22.3 ± 0.4%) was longer (8 days) than the one of fruit purée (3 days) due to the particulate physical structure of the FVS, with a structure that leaves the fungus growing between inter and intra particles and in consequence obtaining higher biomass production than in purée structure. This consequence of using particulate substrate is significant also in final protein concentration. When purée (model substrate) is used, fungal biomass protein is of 21.7 ± 1.9% DM (initial substrate protein 10.5 ± 0.3%), and can be estimated that the final fermented product protein content is 14.6 ± 0.2% (Table 33). When a particulate substrate is used, which allows fungal growth in the inner space, this fermented FVS protein proportion arrives up to 20.2 + 1.7% (+ 38%) (Table 35). This protein increase could be also related to the higher inoculum size used in the particulate substrate.

Fermentation duplicates the antioxidant activity (TEAC and DPPH reduction) of the product, up to a DPPH reduction of 81.3 ± 7.7% and TEAC of 3.6 ± 0.3 mg/g DM (Table 34). As

expected for fruits and vegetables, initial values are also high,  $2.3 \pm 0.0$  mg TEAC/g DM and  $45.8 \pm 0.7\%$  DPPH reduction, but fermentation significantly increases those values. Other authors found lower DDPH reduction in fermentation extracts of *Oryza sativa* and *Lablab purpureus* [261] and rice bran [172]. At the same time, fermentation duplicates TPC in the final extract compared with unfermented FVS (from  $4.6 \pm 0.3$  to  $8.9 \pm 1.5$  mg GAE/g DM). Similar values were reported in optimized SSF of fig by-product by *Aspergillus niger* (10.4 mg GAE/g DM) and lower values by *R. oryzae* (4 mg GAE/g DM) [147]. In general, all authors report a positive correlation between fungal fermentation, antioxidant activity increase and TPC release, using fig by-product [147], plum fruit [146] or wheat fermentation [258], although the level of increase varies depending on the substrate. During SSF, fungus releases carbohydrate-cleaving enzymes ( $\beta$ -glucosidase) [262,362] releasing free aglycones which have antioxidant activity.

There is no difference in soluble protein concentration between samples before and after fermentation, while DH is lower in final extracts (Table 34). During fermentation, the fungal metabolism uses those soluble proteins for its biomass and protein formation while proteases liberate more soluble protein and AA to the extracts. At day 8, maximal fungal growth is achieved, and the DH is lower due to assimilation of smaller peptides and free AA for fungal protein formation.

No antibacterial activity is detected in the extracts obtained from fermented FVS, while positive inhibition is obtained with tetracycline (1 mg/ml) for *Salmonella enterica* (1 mm) and for *Escherichia coli* (2 mm).

When *Rhizopus* sp. grows in the model substrate (purée), fungal biomass and substrate can be separated. In this case, proteins in ROR004 biomass are composed mainly by Asp ( $10.0 \pm 2.3\%$ ), Glu ( $8.5 \pm 1.1\%$ ), Leu ( $8.7 \pm 1.1\%$ ) and Phe ( $7.5 \pm 1.4\%$ ) (Table 35). Compared with the biomasses obtained in substrates with low nitrogen concentration, (results and discussion section 4.2) there are no statistically significant differences at AA composition level, confirming the stability of the FBP composition.

AA profile of fermented FVS is dominated by Glu ( $12.5 \pm 0.6\%$ ), Asp ( $12.3 \pm 0.5\%$ ), Leu ( $7.9 \pm 0.2\%$ ), Ser ( $6.6 \pm 0.3\%$ ), Arg ( $6.3 \pm 0.0\%$ ) and Lys ( $6.1 \pm 0.1\%$ ) (Table 35). Total EAA ranges from  $35.4 \pm 0.4\%$  in the unfermented sample profile to  $45.7 \pm 1.8\%$  in the fermented one, although no statistically significant differences are found in the total EAA percentage. Individually, the proportion of almost all EAA increases significantly in the fermented product,

including His (+ 39.1%), Ile (+ 24.2%), Leu (+ 25.4%), Met (+ 100%), Cys (+ 27.3%), Tyr (+ 42.9%) and Thr (+ 30.2%) proportion. Among non-essential amino acids (NEAA), there is a significant decrease in Asp (- 36.6%) and an increase of Ala (+ 12.2%) (Table 35). Compared to other studies using filamentous fungi [342,361], fermentation leads to similar AA profile with around 45.0% of EAA, what means that different nitrogen concentration does not affect clearly the AA profile of the fungal biomass. This also happens in biomass derived from SmF (results and discussion section 4.3) of different agroindustry by-products. In consequence, it can be stated that protein concentration in fungal biomass is dependent on the available nitrogen in the medium, but AA profile maintains constant regardless of the substrate.

FA present in fermented FVS are, mainly, oleic (C18:1n-9)  $31.2 \pm 2.1\%$ , linoleic (C18:2n-6)  $28.7 \pm 3.7\%$ , palmitic (C16:0)  $18.0 \pm 1.2\%$ , stearic (C18:0)  $7.4 \pm 0.8\%$  and behenic acid (C22:0)  $6.2 \pm 1.9\%$  (Table 36). Fermentation significantly increases C14:0, C18:1n-9, and total MUFA proportion, and significantly decreases alpha-linolenic acid (C18:3n-3) and total PUFA proportion.

Similar FA profile modification happens when fruit mixture is fermented by *Rhizopus oryzae* (ROR001) (results and discussion section 4.2), where there is an increase of C18:0, C18:1n-9 and total MUFA and, also, a production of gamma linolenic FA (C18:3n-6), a characteristic FA of *Rhizopus* metabolism [370]. BSG fermentation with ROR004 (results and discussion section 4.4) also leads to similar modifications, an increase of C18:0, C18:1n-9, and MUFA proportion and a production of C18:3n-6. In that case, significant differences were also found in saturated fatty acids (SFA) and C16:0 increasement by fermentation. However, *R. oligosporus* fermentation of plum fruit [146] leads to an increase of SFA proportion but to a reduction of MUFA and PUFA proportion. Although some differences can appear due to substrate composition, fermentation time and strain, in general, *Rhizopus* sp. fermentation always leads to similar modifications in the studied cases. However, total lipid content can increase or decrease depending on the fermented product, as occurs with fruit mixture (results and discussion section 4.2, Table 13) and BSG (results and discussion section 4.4, Table 25), while fermented fruit increases its lipid content, fermented BSG's content decreases. Fermentation of FVS does not increase significantly the lipid content in the resulting material (Table 36).

Several medium and long-FA (14:1, 15:0, 15:1, 17:0, 17:1, 20:5n-3, 22:1, 22:5n-3 and 22:6n-3) are not detected in any of the biomasses.

**Table 35. Protein (% DM), AA profile (% of total AA) and AA content (mg AA/g product DM) of the unfermented FVS (UFFVS), fermented FVS (FFVS), *Rhizopus ROR004* biomass grown in model substrate, fish meal (FM), soybean meal (SBM), barley, corn and wheat.**

AA	AA profile								AA content							
	UFFVS	FFVS	ROR004	FM	SBM	Barley	Corn	Wheat	UFFVS	FFVS	ROR004	FM	SBM	Barley	Corn	Wheat
His	2.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.5						2.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	6.5 ± 0.5 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.6	17.8	12.8			
Ile	3.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.5 ± 1.3	4.1	4.5	3.5	3.4	3.7	3.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	11.8 ± 1.4	25.7	21.6	4.0	2.6	5.1
Leu	6.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	7.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	8.7 ± 1.1						6.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	16.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	19.0 ± 1.2	45.5	36.6			
Lys	5.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.8	7.5	6.1	3.6	3.0	2.7	5.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	12.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	12.6 ± 0.9	48.1	30.2	4.1	2.2	3.7
Met	0.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.4	2.8	1.4	1.6	2.1	1.5	0.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.4	17.7	6.7	1.9	1.5	2.1
Cys	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.7 ± 7.2	0.9	1.5	2.2	2.2	2.5	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	12.2 ± 7.8			2.4	1.6	3.4
Phe	4.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	7.5 ± 1.4						4.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	10.7 ± 2.0 <sup>a</sup>	16.1 ± 1.5	25.1	23.9			
Tyr	3.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	8.8 ± 9.9						3.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	10.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	19.1 ± 10.7					
Thr	4.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.1 ± 1.2	4.1	3.9	3.3	3.6	2.7	4.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	11.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	13.3 ± 1.4	26.4	18.5	3.7	2.7	3.7
Val	4.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.4 ± 4.6	4.9	4.7	4.9	4.8	4.3	4.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	11.7 ± 0.5 <sup>b</sup>	9.6 ± 5.0	30.3	22.7	5.5	3.6	6.0
EAA	35.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	45.7 ± 1.8 <sup>a</sup>	56.2 ± 6.5						36.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	92.1 ± 3.6 <sup>b</sup>	121.7 ± 7.1	236.6	170.0			
Arg	8.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.6 ± 1.3	5.9	7.2	4.9	4.5	5.1	8.9 ± 1.9 <sup>a</sup>	12.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	12.2 ± 1.4			5.5	3.3	7.0
Asp	19.4 ± 1.2 <sup>b</sup>	12.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	10.0 ± 2.3						20.2 ± 1.3 <sup>a</sup>	24.8 ± 1.0 <sup>b</sup>	21.6 ± 2.5					
Ser	7.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.0 ± 1.0						7.4 ± 2.7 <sup>a</sup>	13.2 ± 0.6 <sup>b</sup>	10.8 ± 1.1					
Glu	13.4 ± 1.3 <sup>a</sup>	12.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	8.5 ± 1.1						13.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	25.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	18.4 ± 1.1					
Gly	5.1 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.0						5.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	11.4 ± 0.0					
Ala	4.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.6						5.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	11.2 ± 0.7 <sup>b</sup>	11.6 ± 0.7					
Pro	6.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.3						6.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	10.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	9.0 ± 0.3					
Protein	10.4 ± 2.1 <sup>a</sup>	20.2 ± 1.7 <sup>b</sup>	21.7 ± 1.9	66.2	47.2	11.3	7.3	13.8								

Data related to feed ingredients are obtained from [345,348,349] for fish meal and soybean meal, from [376] for barley, from [377] for corn and from [378] for wheat; same letter in the same row mean no significant difference between the mean at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (n=2).

Table 36. FA profile (% of total FA) of unfermented FVS (UFFVS) and fermented FVS (FFVS), fish meal (FM), soybean meal (SBM), barley, corn and wheat.

FA	UFFVS	FFVS	FM	SBM	Barley	Corn	Wheat
14:0	0.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	5.0	0.2			
16:0	18.7 ± 1.5 <sup>a</sup>	18.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	15.4	11.0	23.0	11.0	19.0
16:1	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	6.9	0.2			
18:0	5.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	7.4 ± 0.8 <sup>a</sup>	2.6	4.0		2.0	1.5
18:1n-9	18.4 ± 1.4 <sup>a</sup>	31.2 ± 2.1 <sup>b</sup>	14.7	22.0	13.0	27.0	19.0
18:2n-6	37.7 ± 3.0 <sup>a</sup>	28.7 ± 3.7 <sup>a</sup>	1.0	54.0	56.0	56.0	50.0
18:3n-6	BL	1.0 ± 0.3					
18:3n-3	9.3 ± 1.9 <sup>b</sup>	2.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	0	8.0	6.0	1.0	4.5
20:0	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	47.1*	0.4*			
20:1n-9	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>					
22:0	7.4 ± 2.4 <sup>a</sup>	6.2 ± 1.9 <sup>a</sup>					
24:0	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.6 <sup>a</sup>					
SFA	33.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	34.9 ± 0.2 <sup>a</sup>					
MUFA	19.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	33.0 ± 2.6 <sup>b</sup>					
PUFA	47.0 ± 1.5 <sup>b</sup>	32.2 ± 2.4 <sup>a</sup>					
Total lipids	3.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	9.5	1.9	1.7	3.3	2.0

BL: Below detection limit; data related to feed ingredients are obtained from [348,349] for fish meal and soybean meal, from [376] for barley, from [377] for corn and from [378] for wheat; same letter in the same row mean no significant difference between the mean at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (unfermented FVS n=3, fermented FV n=2). \* these values correspond to FA >C:20.

#### 4.3 Effect of vegetables on SmF

The fruit and vegetable leachate (FVL) composition is 46.5 ± 3.6% sugars and 0.14% nitrogen with a pH of 5.6. These values are in the range of the model developed previously (results and discussion section 4.3), except for nitrogen concentration. As observed in Table 37 FVL fermentation leads to 5.5 ± 1.1 and 10.6 ± 1.4 g DM biomass/l after 4 and 7 days of fermentation respectively. Higher biomass production has been reported by SmF of *Rhizopus* (up to 38.7 and 65.5 g/l), but in those cases lower protein proportion is obtained in the biomasses [334,335]. Other authors otherwise, found similar biomass production values from apple pomace sludge [182] by shake flask fermentation or lower from citrus wastes free sugars [203] in airlift reactor. FVL fermentation leads to 36.3 ± 1.6 and 31.1 ± 1.1% of protein after 4 and 7 days of fermentation respectively (Table 37). As reported previously [105], long incubation time increases biomass formation but reduces protein content. Protein content could

be slightly increased by decreasing the fungal biomass concentration due to higher initial fungal cell activity and consequently higher protein synthesis in the young cell mass.

*Table 37. Model validation in SmF for biomass production (g DM/l), protein (% DM), biomass yield (g DM/g consumed glucose) and glucose consumption (%) with ROR004.*

Exp	Biomass		Protein		Biomass yield		Glucose consumption	
	Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs
1	6.4	5.5 ± 1.1	24.3	36.3 ± 1.6	0.25	0.13 ± 0.03	45.9	94.5 ± 0.6
2	11.9	10.6 ± 1.4	33.1	31.1 ± 1.1	0.45	0.24 ± 0.03	36.2	97.0 ± 2.6

Pre: predicted; obs: observed; values are expressed as means ± SD (n=3, strain ROR004).

Results of two fermentation processes with FVL are compared to the predictions obtained by the model developed for SmF with *R. oryzae* (results and discussion section 4.3). Biomass production agree with the predicted parameters (Table 37), confirming this model as a valid instrument to predict the effects of fermentation variables in biomass production from food-derived by-products fermentation. In the other hand, glucose consumption and protein production are higher than predicted and, in consequence, biomass yield (g biomass/g consumed glucose) is lower than expected (Table 37). Similar situation is observed when orange molasses is the fermentation substrate (results and discussion section 4.3). Our observations confirm that, when nitrogen is low in the medium, the model predicts a lower glucose consumption and, therefore, a higher biomass yield. Consideration of SmF as decontaminant strategy, feasible predictions of glucose consumption and COD reduction are required, and, at this moment, the model developed needs to be adjusted when FVL and other low-nitrogen content by-products are used.

The biomasses obtained in the studied by-product achieve lower protein concentration (Table 37) and in consequence lower protein yield compared to optimal conditions in synthetic medium (results and discussion section 4.3). In order to increase protein yield, FVL could be supplemented or combined with higher nitrogen content by-products, providing lower C:N ratios [306].

COD reduction of the leachate have three phases; an initial phase with low reduction (first 2 days), an intermediate when the reduction per hour is maximal and final phase, archiving a maximal COD reduction

around 70% after 7 days (Figure 47). Comparing with other published

results, where COD reduction ranges from 42% to 90% [105,155,270], hereby-present COD reduction is significative, but have to be considered that COD reductions are different depending on substrate, fermentation conditions and the microorganism used.

Refereeing to the antioxidant capacity, TPC and TEAC of liquid fraction are significantly lower after fermentation, both after 96 or 168 hours (Figure 48), demonstrating that the fungal growth

removes these compounds from the growth medium, probably for their own use.

#### 4.4 Characterization of fungal biomass obtained by SmF

The nutritional value and utility of fungal biomass depends on the nutrient content and composition. Therefore, obtained biomass after 7 days of fermentation has been characterized for AA and FA profile. The protein of fungal biomass grown in FVL is composed mainly by Glu ( $12.8 \pm 0.5\%$ ), Asp ( $10.0 \pm 0.7\%$ ), Lys ( $7.7 \pm 0.1\%$ ), Leu ( $7.7 \pm 0.5\%$ ), Arg ( $7.6 \pm 1.5\%$ ) and Gly ( $7.0 \pm 2.7\%$ ) (Table 38). This profile is similar to the one obtained after grown

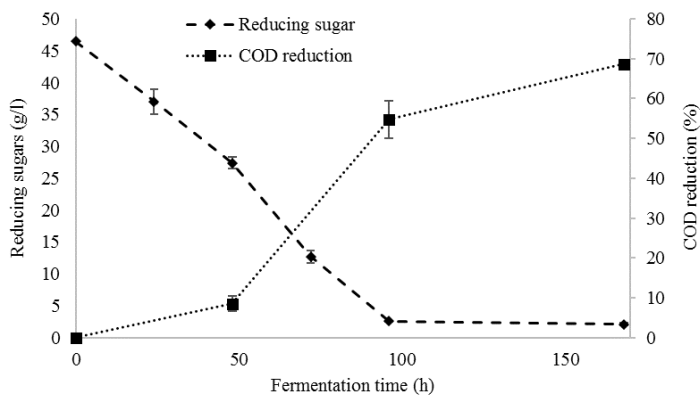


Figure 47. Reducing sugars (g/l) and COD reduction (%) during SmF of FVL. Error bars represent SD (n=3).

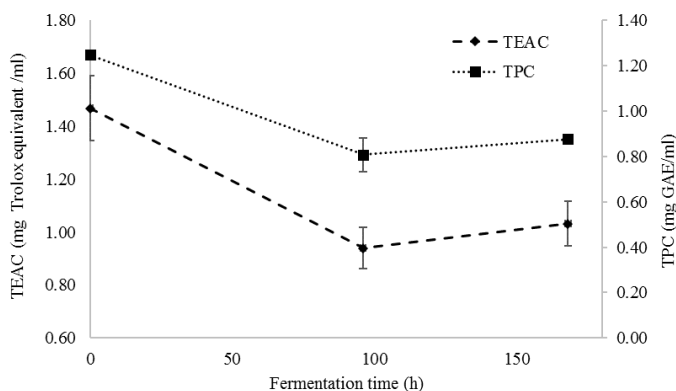


Figure 48. TEAC (mg Trolox equivalent/ml) and TPC (mg GAE/ml) of FVL during SmF(n=3).

*Rhizopus* in other mediums (synthetic medium, cheese whey and orange molasses, results and discussion section 4.3) or vinasse [162], with small modifications. Thus, the beneficial AA profile will be guaranteed within medium modifications.

FA profile of biomass is dominated by C18:1 ( $29.7 \pm 6.5\%$ ), C18:0 ( $19.9 \pm 8.4\%$ ), C18:2n-6 ( $16.3 \pm 3.2\%$ ), C16:0 ( $16.1 \pm 4.0\%$ ) and C18:3n-6 ( $9.2 \pm 3.8\%$ ) (Table 39). Compared to biomass grown in synthetic medium (results and discussion section 4.3), FVL promote higher SFA ( $42.0 \pm 3.0\%$ ) and PUFA ( $27.1 \pm 8.8\%$ ) proportion and lower MUFA proportion ( $30.9 \pm 5.89\%$ ). C18:3n-6 goes up to  $9.2 \pm 3.8\%$  of the profile of the biomass grown in FVL. This FA of the  $\omega$ -6 series has been related to anti-inflammatory effects and is the precursors of DGLA (Dihomo-gamma-linolenic acid C20:3-n6) [343].

*Table 38 AA profile (% of total AA) and AA content (mg AA/g product) of the fungal biomass grown in FVL (30 °C, 168 h). and fish meal (FM), soybean meal (SBM), barley, corn and wheat.*

AA	AA profile	AA content					
	FVL	FVL	FM	SBM	Barley	Corn	Wheat
His	$3.1 \pm 0.0$	$9.8 \pm 0.1$	17.8	12.8			
Ile	$4.3 \pm 0.3$	$13.4 \pm 1.0$	25.7	21.6	4.0	2.6	5.1
Leu	$7.7 \pm 0.5$	$23.9 \pm 1.6$	45.5	36.6			
Lys	$7.7 \pm 0.1$	$24.0 \pm 0.2$	48.1	30.2	4.1	2.2	3.7
Met	$0.7 \pm 0.6$	$2.1 \pm 1.8$	17.7	6.7	1.9	1.5	2.1
Cys	BL	BL			2.4	1.6	3.4
Phe	$5.5 \pm 0.3$	$17.2 \pm 1.0$	25.1	23.9			
Tyr	$4.7 \pm 0.2$	$14.7 \pm 0.7$					
Thr	$5.5 \pm 0.6$	$17.3 \pm 1.7$	26.4	18.5	3.7	2.7	3.7
Val	$6.0 \pm 0.3$	$18.6 \pm 0.8$	30.3	22.7	5.5	3.6	6.0
EAA	$45.3 \pm 1.5$	$140.9 \pm 4.7$	236.6	173.0			
EAAI <sup>1</sup>	$1.4 \pm 0.1$						
Arg	$7.6 \pm 1.5$	$23.8 \pm 4.7$			5.5	3.3	7.0
Asp	$10.0 \pm 0.7$	$31.2 \pm 2.1$					
Ser	$5.8 \pm 0.3$	$18.2 \pm 0.9$					
Glu	$12.8 \pm 0.5$	$39.7 \pm 1.5$					
Gly	$7.0 \pm 2.7$	$21.9 \pm 8.5$					
Ala	$6.4 \pm 0.5$	$19.8 \pm 1.7$					
Pro	$5.1 \pm 1.2$	$15.9 \pm 3.7$					
NEAA	$54.7 \pm 1.5$	$170.4 \pm 4.7$					

BL: below detection limit; 1: based on [197]; data related to feed ingredients are obtained from [345] for fish meal and soybean meal, from [376] for barley, from [377] for corn and from [378] for wheat; same letter in the same row mean no significant difference between the mean at 95% confidence; values are expressed as means  $\pm$  SD (n=2).



At this moment, further experiments are required to determine which are the main technological parameters to improve FA profile of *Rhizopus* sp. biomass, in order to enhance the interesting ones [308]. From our experiments, we can conclude that FVL has lower pH and lower nitrogen concentration than synthetic medium (results and discussion section 4.3), and these factors during microorganism cultivation can cause desaturation of membrane fatty acids, which enhanced membrane fluidity [344]. Changes in membrane fluidity would affect the FA composition, but this hypothesis has to be demonstrated. Several medium and long-FA (14:1, 15:0, 15:1, 17:0, 17:1, 20:5n-3, 22:1, 22:5n-3 and 22:6n-3) are not detected in any of the biomasses.

Table 39. FA profile (% of total FA) of *Rhizopus* biomass grown in FVL (30 °C, 192 h), fish meal (FM), soybean meal (SBM), barley, corn and wheat and FA content (mg/g fungal biomass) of fungal biomass.

FA	FVL biomass		FM	SBM	Barley	Corn	Wheat
	FA profile	FA content					
14:0	0.6 ± 0.4	0.36 ± 0.3	5.0	0.2			
16:0	16.1 ± 4.0	9.9 ± 2.5	15.4	11	23	11	19
16:1	0.9 ± 0.7	0.58 ± 0.4	6.9	0.2			
18:0	19.9 ± 8.4	12.2 ± 5.2	2.6	4.0		2.0	1.5
18:1	29.7 ± 6.5	18.3 ± 4.0	14.7	22.0	13.0	27.0	19.0
18.2n-6	16.3 ± 3.2	10.0 ± 2.0	1.0	54.0	56.0	56.0	50.0
18:3n-6	9.2 ± 3.8	5.7 ± 2.4					
18:3n-3	1.5 ± 1.8	0.9 ± 1.1	0	8.0	6.0	1.0	4.5
20:0	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2	47.1*	0.4*			
20:1n-9	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0					
22:0	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1					
24:0	3.2 ± 1.3	1.9 ± 0.8					
SFA	42.0 ± 3.0	25.8 ± 1.8					
MUFA	30.9 ± 5.8	19.0 ± 3.5					
PUFA	27.1 ± 8.8	16.6 ± 5.4					
Total	6.1 ± 3.8		9.5	1.9	1.7	3.3	2.0

Data related to feed ingredients are obtained from [348,349] for fish meal and soybean meal, from [376] for barley, from [377] for corn and from [378] for wheat; same letter in the same row mean no significant difference between the mean at 95% confidence; values are expressed as means ± SD (n=2). \* these values correspond to FA >C:20.

#### 4.5 Evaluation as animal feed

Fermented FVS has a similar AA profile compared to soybean meal and fish meal except for sulfur AA and better profile compared to cereals (Table 35). However, in order to assess the AA composition of the potential new feed the total amount of each AA in the final product

must be compared. Fermented FVS has a protein content of 20.2%, quite lower than soybean meal (47.2%), and fish meal (66.2%) (Table 35), in consequence, it has lower quantity of each EAA compared to these protein sources. On the contrary, cereals present lower protein content (7.3, 11.3 and 13.8% in corn, barley and wheat respectively) and in general also lower quality AA profile, therefore, obtained fermented FVS presents higher quantity of each EAA compared to cereals (Table 35).

AA content (mg/g fungal biomass) of the fungal biomass (Table 38) is comparable to soybean meal with lower values regarding to sulfur AA. Previous studies also showed limitations of sulfur AA production in *Zygomycetes* biomass, and therefore, feed should be supplemented in those AA [162,270]. Fish meal has higher total EAA, due to its high-quality profile and high protein content. Compared to cereals, except for Met, *Rhizopus* has higher quantity of EAA (Table 38). *Rhizopus* biomass protein content ( $31.1 \pm 1.1\%$ , Table 37) is lower than fish meal and soybean meal (Table 35). In general, the EAAI of *Rhizopus* biomass is 1.4 for human consumption purposes (Table 38), what means that it fulfills human protein profile requirements.

Protein recommendations vary depending on the breed and objective of the breeding of the animal, sex, physiological stage... In general, the recommended values for both ruminants and monogastric are around 13-18%, although it can be higher in calves (up to 30%) [29,36,45]. In aquaculture most herbivorous and omnivorous fish required 25-35% protein in their diet, while carnivores required higher levels ranging from 40-55% of the diet [33].

Lipids provide palatability and energy value to the formulation of feed. Compared to other feed ingredients (Table 36), fermented FVS has higher lipid content than soybean meal, barley, corn and wheat and lower than fish meal. FA profiles are also quite different, while fermented FVS has higher C18:1 and lower C18:2 than soybean meal, barley, wheat and corn, it has higher C18:1, C18:2 and C18:3 and lower proportion of C > 20 than fish meal, that represent the 47.1% of total fish meal lipids (Table 36). In general, obtained product could add higher nutritional value regarding to lipid content and FA profile compared to soybean meal, corn, wheat and barley, but FA profile is not as good as fish meal due to the lack of essential highly unsaturated fatty acids (HUFA).

Fungal biomass grown in FVL presents lower fat content (6.1%) than fish meal (9.5%) and higher than soybean meal (1.9%), barley (1.7%), corn (3.3%) and wheat (2.0%) (Table 39). Fungal biomass FA profile quality is higher than cereals and soybean meal but lower compared

to fish meal. As happens with fermented FVS, obtained biomass could add higher nutritional value compared to soybean meal and cereals, but FA profile is not as good as fish meal profile. Freshwater fish can convert C18 PUFA to C20 or C22 HUFA by elongation and desaturation reactions, and, hence their essential fatty acids (EFA) requirements are met by PUFA (18:3n-3 and 18:2n-6) [346]. Marine fish, otherwise, cannot perform [42] or have limited capability [43] for such conversion; therefore they have to take from the diet. SmF by *Rhizopus* could be an interesting process for high-quality alternative protein source. Several papers describe the use of *Rhizopus* biomass cultivated in spent liquor in fish feed [198,347] with positive preliminary results, presenting *Zygomycetes* biomass as an alternative to the large quantities of fish meal consumed within fish aquaculture. Nutritional requirements regarding to FA profile for cattle, dairy, swine and poultry are not specific, and just minimums of C18:2n-6, > 0.1% in swine and around 1.1% in poultry are required due to its benefits in clutch size and egg mass [30,31]. Obtained products provide 1.4 and 1% of C18:2n-6 in fermented FVS and FVL fungal biomass respectively. To best of our knowledge, no farm trail has been done with *Rhizopus* biomasses in this species. In general, obtained product has low reducing sugar content (Table 34) which could be a positive effect regarding to ruminant feed formulas. Non-fibrous carbohydrates (NFC) are composed by starch, pectin and sugars and are the main energy source of ruminant bacteria. However, its high fermentability can be a cause of acidosis and tympany diseases in ruminant [36,45]. In addition, fermented FVS also presents high TPC content (Table 34); there are several strategies of using polyphenol containing diets in ruminants to improve animal well-being and also as strategy for producing meat and milk with antioxidant properties [363-365].

Along the paper, authors present an integral strategy for FVd valorization based on fermentation technologies and evaluating their suitability as animal feed, reporting the first FA and AA profile in fermented FVd using *Rhizopus* sp. Results show the combination of SSF and SmF as a promising alternative to revalorize these discards as valuable ingredient for feed and food applications.

## 5 Conclusions

Compared to the original FVd, the combination of SSF and SmF generates fermented products with high protein content and improved composition. SSF of FVS generates a biomass rich in EAA ( $20.2 \pm 1.7\%$  protein and  $45.7 \pm 1.8\%$  EEA), with significant MUFA proportion ( $33.0 \pm 2.6\%$ ) and high TPC ( $8.9 \pm 1.5$  mg/g DM) in the final extracts with antioxidant activity,

what makes SSF a promising alternative to revalorize this agro-industrial by-product as valuable ingredient for feed applications and as alternative to soybean meal and cereals. SmF of liquid fraction also leads to a fungal biomass rich in protein ( $31.1 \pm 1.1\%$ ) and EAA profile ( $45.3 \pm 1.5\%$ ) comparable to soybean meal. The remaining liquid COD is 70% lower than the initial one, what makes it an interesting technique for environmental impact reduction of wastewaters. Hereby presented results demonstrate that, overall, fungal fermentation, both solid and liquid, is a successful strategy for FVd valorization in order to produce valuable and sustainable alternative protein sources for animal feed formulations.

## **4.6: Pruebas preliminares de escalado y viabilidad técnico-económica del proceso de fermentación en estado sólido**





## **4.7: Extracción proteica y sus hidrolizados a partir de la biomasa de *Rhizopus* sp.**



Además del papel nutricional, las proteínas son responsables de varias propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos y pueden actuar como ingredientes funcionales [389]. Muchas de las propiedades fisiológicas y funcionales de las proteínas se atribuyen a péptidos biológicamente activos que dependen de la secuencia nativa [209]. Estos péptidos tienen un tamaño de entre 2 a 20 AA y pesos moleculares menores de 6000 Da [208].

Una de las estrategias para la obtención de compuestos de interés de la biomasa de *Rhizopus* sp. podría ser la extracción de la proteína (30-60%) y su posterior hidrólisis enzimática para la liberación de posibles péptidos bioactivos [215,390]. Al mismo tiempo, estos procesos aumentan el GH proteico y, por lo tanto, su biodisponibilidad y digestibilidad. De esta manera, obtendríamos un extracto con alto contenido proteico, alto GH y con posible bioactividad, además de un pellet con compuestos de interés para su extracción y purificación de la pared celular del hongo.

El objetivo de este apartado es explicar los trabajos desarrollados para explorar el proceso de extracción e hidrólisis de la proteína de la biomasa fúngica con el objetivo de obtener hidrolizados proteicos con actividad antioxidante, antimicrobiana y mejorar la biodisponibilidad de AA. Para ello evaluamos tres procesos de extracción de la proteína, valoramos la hidrólisis con pancreatina y evaluamos sus resultados. Hasta donde conocemos, es el primer trabajo de obtención de hidrolizados proteicos realizado en biomasa de *Zygomycetes*.

## **1 Extracción proteica**

Las biomásas utilizadas para las determinaciones presentadas en este apartado son diversas. Por un lado, se utiliza la biomasa de ROR004 (apartado 4.3 de resultados y discusión, Tabla 19, condición 10) para el método A y la biomasa de ROR003 (apartado 4.3 de resultados y discusión, Tabla 19, condición 8) para el método B y C en la selección del proceso de extracción.

Por otro lado, se utilizan las biomásas obtenidas en las fermentaciones de melaza de naranja (apartado 4.3 de resultados y discusión, Tabla 19, condición 15), lactosuero (apartado 4.3 de resultados y discusión, Tabla 19, condición 12) y lixiviado de frutas y verduras (apartado 4.5 de resultados y discusión, Tabla 37, condición 2).

Los resultados de las extracciones de proteína de los métodos A, B y C presentan unos porcentajes de extracción de  $21,0 \pm 3,0$ , 43,1 y 25,8% respectivamente. De los resultados



obtenidos es el método B el que presenta un mayor porcentaje de extracción debido a las 2 etapas consecutivas de extracción, que parecen ser necesarias para incrementar la misma. Connolly *et al.* [286] recuperaron entre el 15 y 59% de la proteína del bagazo mientras que Safi *et al.* [287] recuperaron entre el 41 y 90%.

Para conocer mejor el proceso de extracción y las pérdidas de proteína asociadas a cada proceso se realizó un balance de masas de los procesos B (Figura 60) y C (Figura 61). El porcentaje de extracción es mayor en el método de extracción B en comparación con el método C, donde hay una gran pérdida (33%) en el sobrenadante final y solo se extrae un 25,8%. El método B es el de mayor extracción proteica con un 43,1%, y solo un 12,7% de pérdidas en el sobrenadante final (Figura 60). También existen pérdidas en el extracto acuoso (11,0%). El porcentaje de 33% de pérdida restante puede estar asociado a la falta de extracción total de la biomasa quedando ese porcentaje en el pellet o material insoluble en medio alcalino (AIM, alkali insoluble material). Zamani *et al.* [283] determinaron un 4,9% de proteína en el AIM. En caso de obtener un producto final de interés debería de optimizarse el proceso de extracción, realizando alguna etapa de extracción más y precipitando las proteínas del extracto acuoso.

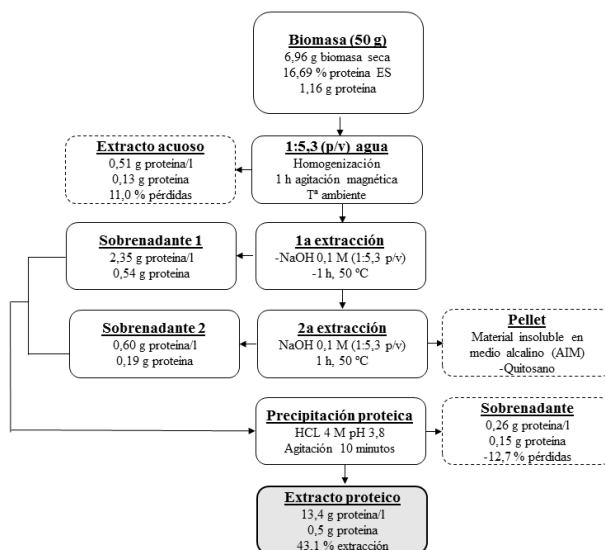


Figura 60. Balance de masas del proceso de extracción proteica B. Las pérdidas aparecen como cuadrados en línea discontinua.

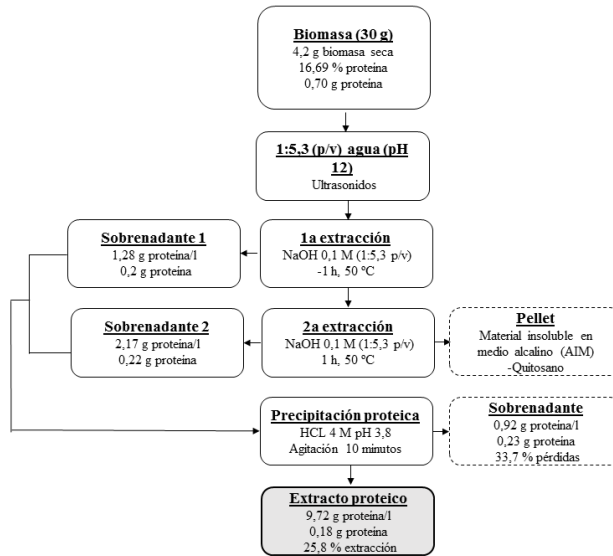


Figura 61. Balance de masas del proceso de extracción proteico C. Las pérdidas aparecen como cuadrados en línea discontinua.

Los procesos de extracción proteica de las biomásas obtenidas tras la fermentación de melaza de naranja, lactosuero y lixiviado de frutas y verduras presentan unos porcentajes de extracción de 39,4, 89,4 y 59,5% respectivamente.

## 2 Obtención y caracterización de hidrolizados

El grado de hidrólisis de los extractos proteicos es mayor cuando la biomasa ha crecido en medio sintético ( $76,5 \pm 0,9\%$ ) y lactosuero ( $77,2 \pm 0,4\%$ ) en comparación con la biomasa crecida en melaza de naranja ( $46,3 \pm 0,7\%$ ) y lixiviado de frutas y verduras ( $51,4 \pm 0,6\%$ ) (Figura 62). En general, la hidrólisis ocurre en su mayoría en los primeros 30 minutos tras añadir la proteasa (Figura 62), por lo que los procesos de hidrólisis

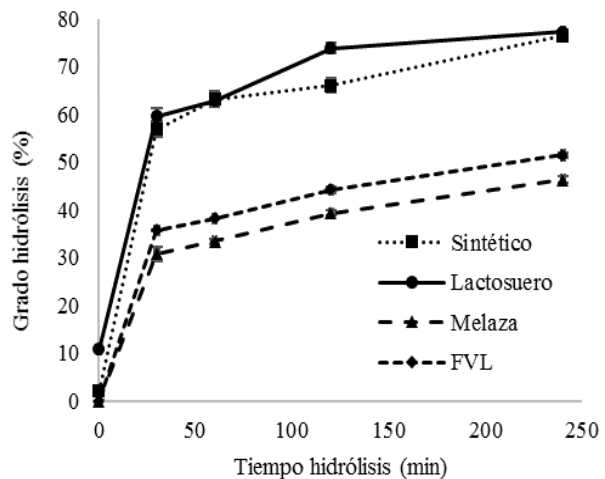


Figura 62. GH (%) de la biomasa tras la fermentación en medio sintético, lactosuero, melaza de naranja y lixiviado de frutas y verduras.

podrían acortarse. En los primeros 30 minutos se obtienen grados de hidrólisis de alrededor del 60% en los extractos proteicos de las biomásas obtenidas en medio sintético y lactosuero y del 30% en extractos proteicos de las biomásas obtenidas en melaza de naranja y frutas y verduras.

Se observa un cambio en el perfil de pesos moleculares de los hidrolizados con respecto al perfil del extracto a tiempo 0 (Figura 63, Figura 64, Figura 65). La biomasa obtenida en medio sintético sin hidrolizar corresponde a péptidos con un peso molecular superior a 120 kDa, y ligeros picos en péptidos con, aproximadamente, 15 kDa, 2 kDa y menores a 1 kDa (Figura 63).

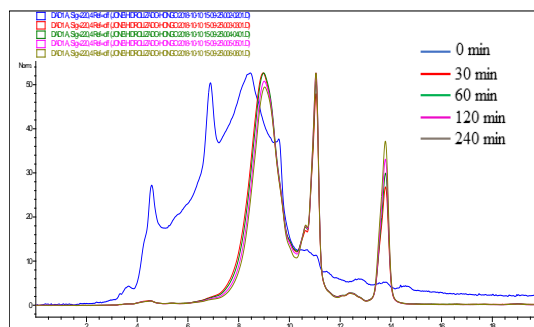


Figura 63. Perfil de pesos moleculares del hidrolizado proteico de la cepa ROR004 tras la fermentación en medio sintético.

Cuando se hidroliza durante 30 minutos, el primer pico cromatográfico significativo se obtiene con un tiempo de retención de 8,96 minutos, que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 1,8 kDa, y otros picos característicos a 226 Da y 15 Da respectivamente, demostrando una hidrólisis muy intensa. Mayores tiempos de hidrólisis generan hidrolizados con un perfil de pesos moleculares similar, confirmando que aumentar el tiempo de hidrólisis no hace que los perfiles moleculares cambien (Figura 63).

En el caso de la melaza de naranja, la biomasa sin hidrolizar presenta un perfil similar y el tiempo de hidrólisis tampoco tiene un efecto en los perfiles moleculares hasta pasadas 4 horas. El primer pico en los extractos hidrolizados corresponde a un peso molecular de 1,8 kDa y otros picos característicos aparecen a 338, 170 y 19 Da (Figura 64). Se observa la misma tendencia en los hidrolizados obtenidos de la biomasa del hongo obtenida en el lixiviado de frutas y verduras (Figura 65). El primer pico del

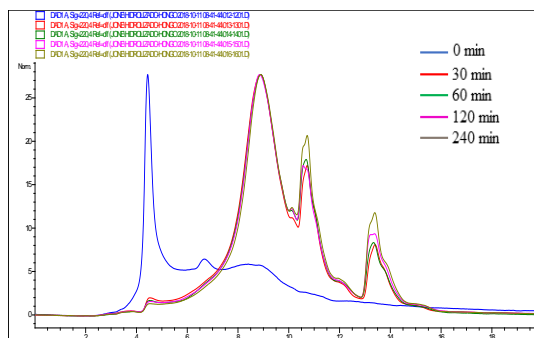
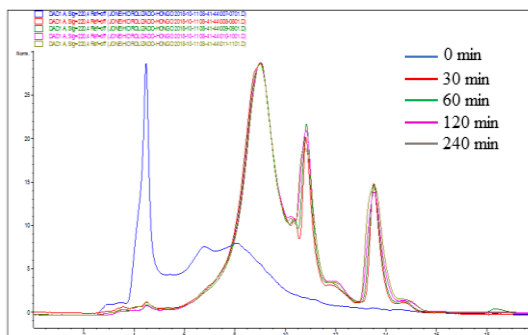


Figura 64. Perfil de pesos moleculares del hidrolizado proteico de la cepa ROR004 tras la fermentación en melaza de naranja.

hidrolizado (tiempo de retención de 9 minutos) corresponde a péptidos de 1,6 kDa. Otros picos característicos se obtienen a tiempos de retención de 10,8 y 13,5 minutos, que corresponden a péptidos con 284 Da y 20 Da respectivamente.

La proteína extraída e hidrolizada sería más digerible que la proteína bruta de la biomasa fúngica, lo que resultaría en una biomasa de mayor valor para las dietas animales debido a una proteína más metabolizable o digestible [45]. Estudios posteriores permitirán confirmar si la biomasa obtenida tiene una mejor absorción en modelos animales.



*Figura 65. Perfil de pesos moleculares del hidrolizado proteico de la cepa ROR004 tras la fermentación en lixiviado de frutas y verduras.*

Sin embargo, la parte sólida restante de la biomasa fúngica debe ser utilizada para la

extracción de otros compuestos [177], como la fracción lipídica y el quitosano [83], y obtener así un proceso de biorrefinería completo. Los hidrolizados de proteínas no muestran actividad antibacteriana ni antioxidante (resultados no mostrados), como un indicador preliminar de que estas fracciones no modificarían la microflora del rumen.

El proceso de extracción para esta biomasa permite recuperar el 43% de la proteína presente en la biomasa inicial. El balance de masas de los procesos muestra que gran parte de la proteína se pierde en las fases intermedias del proceso, así como la mayoría de otros compuestos de interés. La posterior hidrólisis de la proteína extraída aumenta el grado de hidrólisis hasta un 30-60% en las biomosas estudiadas en los primeros 30 minutos de proceso, generando péptidos con pesos moleculares menores a 1,9 kDa. Los hidrolizados generados difieren poco en biomosas crecidas en diferentes sustratos.

## 5. DISCUSIÓN GENERAL





Los procesos desarrollados a lo largo de esta tesis pueden clasificarse en dos grupos, por un lado, los procesos de fermentación sumergida (SmF) los cuales se utilizan para la valorización de subproductos líquidos y, por otro lado, los procesos de fermentación en estado sólido (SSF), utilizados para la valorización de subproductos sólidos. A pesar de haber sido ampliamente estudiados en literatura [119,125,391], aún no han sido implantados como procesos para la valorización de subproductos alimentarios, ya sea por falta de investigación, falta de proyectos de demostración o de estudios técnico-económicos que realmente puedan ir disipando las incertidumbres acerca del escalado de estos procesos.

## 1 Los procesos de fermentación sumergida

Los apartados 4.1, 4.3 y 4.7 de resultados y discusión muestran las posibles aplicaciones de los hongos del género *Rhizopus* en la SmF para la producción de ácidos orgánicos, proteína fúngica (FBP) y quitosano y su aplicabilidad para el tratamiento simultáneo de subproductos líquidos (consumo de azúcares y disminución de DQO). Las cepas estudiadas han demostrado una buena producción de ácido fumárico y FBP, aunque esto no ha sido posible en procesos simultáneos. Si comparamos los resultados de ácido fumárico producidos en el apartado 4.1 con los obtenidos en el apartado 4.3, las productividades de ácido fumárico (g de ácido fumárico/g de glucosa consumida) obtenidas en el primer apartado son bastante más altas ( $0,71 \pm 0,05$  para ROR004;  $0,63 \pm 0,12$  para ROR004 A;  $0,54 \pm 0,06$  para ROR004 B y  $0,54 \pm 0,08$  para ROR004 O). Teniendo en cuenta que el rendimiento teórico máximo en una situación de no crecimiento es de 2 moles de ácido fumárico por mol de glucosa consumida [298], el rendimiento máximo (1,1 mol de fumárico/mol de glucosa) obtenido en el apartado 4.1 es mucho mayor que el obtenido en el apartado 4.3 de resultados y discusión (0,12 mol de fumárico/mol de glucosa). Estos efectos son, probablemente, debido a que el medio del apartado 4.1 tiene un mayor contenido de glucosa (80 g de glucosa/l), un agente neutralizante ( $\text{CaCO}_3$ ) y no tiene nitrógeno adicional. La producción de quitosano en las condiciones estudiadas en esta tesis, sin embargo, ha sido menor que en otros estudios [83,392].

La imposibilidad de realizar un proceso conjunto de producción de ácidos orgánicos y FBP, el mayor grado de avance de investigación respecto a la producción de ácidos orgánicos por parte del género *Rhizopus* en literatura [330,393], la menor producción de quitosano en la cepa estudiada y la urgente necesidad de obtención de fuentes alternativas de proteína [160,194] ha llevado a centrar los esfuerzos de la línea de SmF en la producción de FBP.

Los procesos de SmF como estrategia de valorización de subproductos de la industria alimentaria se han aplicado a la valorización de melazas de naranja, lactosuero y lixiviados de frutas y verduras con una disminución de la DQO entre un 50-70 %. El lactosuero genera cierta inhibición en el crecimiento de *Rhizopus oryzae*, incluso diluyéndolo y con adición de nutrientes, lo que causa una disminución del rendimiento de FPB. La melaza de naranja y el lixiviado de frutas y verduras en cambio, se presentan como sustratos prometedores para el crecimiento del hongo, aun sin adición de nutrientes. Resumiendo los datos obtenidos mediante SmF de sustratos reales (sin contar el lactosuero por los problemas de inhibición que ya se han comentado), podemos ver que la biomasa obtenida va desde los 11,9g/l obtenidos con melaza "dopada con nitrógeno" tras cinco días (Figura 41a, condición 15) hasta los 5,5 g/l tras 4 días para lixiviado de frutas y verduras (Tabla 37) y que la concentración de proteína se encuentra entre el 32-39% en la biomasa obtenida tras la fermentación de la melaza (Figura 41b, condición 14-16) y entre el 31-36% en la biomasa obtenida tras la fermentación del lixiviado de frutas y verduras (Tabla 37). Parece evidente que, en condiciones optimizadas, con una fuente extra de nitrógeno en el caso de la melaza de naranja, la producción de biomasa aumenta, obteniéndose rendimientos proteicos (g proteína/l de melaza) superiores a los obtenidos en subproductos del mismo origen [203] lo que genera una mayor rentabilidad del proceso de fermentación.

Otro aspecto destacable es que el modelo desarrollado en esta tesis para predecir el comportamiento de *Rhizopus* durante la SmF es aplicable a diferentes sustratos reales crecidos en diferentes tiempos y condiciones, lo que ayudará a diseñar procesos más eficientes. Este modelo se ha puesto a prueba en el apartado 4.3 y en el 4.5 con resultados muy prometedores.

Las biomásas de *Rhizopus* obtenidas presentan una concentración estable de AA, incluso en el caso de la biomasa obtenida mediante SSF, aunque esta última presenta un porcentaje total mayor de EAA que la biomasa obtenida en SmF de medio sintético (Tabla 51). En condiciones óptimas presentan unos contenidos de aminoácidos esenciales (mg AA/g biomasa) similares al de la harina de soja (apartado 4.3, Tabla 23), excepto en los AA azufrados, y con un contenido y perfil graso mejorado, de modo que podrían utilizarse como fuente alternativa de materia prima para piensos o incluso en alimentación humana.



Tabla 51. Perfil de aminoácidos (% total AA) de la biomasa de ROR004 obtenida mediante SSF de frutas y verduras (apartado 4.5) y mediante SmF de medio sintético y melaza de naranja (ambos del apartado 4.3) y lixiviado de frutas y verduras (apartado 4.5).

AA	SSF	SmF		
	Fruta y Verdura	Medio sintético	Melaza de naranja	Lixiviado frutas y verduras
His	2,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
Thr	6,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,6 <sup>a</sup>
Val	4,4 ± 4,6 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,3 <sup>a</sup>
Met	1,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,6 <sup>a</sup>
Lys	5,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	7,1 ± 2,0 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	7,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Ile	5,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,3 <sup>a</sup>
Leu	8,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	8,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,7 ± 0,5 <sup>a</sup>
Phe	7,5 ± 1,4 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
Cys	5,7 ± 7,2 <sup>a</sup>	<LD	<LD	<LD
Tyr	8,8 ± 9,9 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,2 <sup>a</sup>
EAA	56,2 ± 6,5 <sup>b</sup>	40,9 ± 2,5 <sup>a</sup>	43,0 ± 0,1 <sup>ab</sup>	45,3 ± 1,5 <sup>ab</sup>
Arg	5,6 ± 1,3 <sup>a</sup>	7,7 ± 1,4 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,6 ± 1,5 <sup>a</sup>
Ala	5,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	9,7 ± 4,0 <sup>a</sup>	7,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,5 <sup>a</sup>
Pro	4,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,2 ± 1,4 <sup>ab</sup>	5,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	5,1 ± 1,2 <sup>a</sup>
Asp	10,0 ± 2,3 <sup>a</sup>	9,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	10,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	10,0 ± 0,7 <sup>a</sup>
Ser	5,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>a</sup>
Glu	8,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	13,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	13,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	12,8 ± 0,5 <sup>a</sup>
Gly	5,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	7,4 ± 2,3 <sup>a</sup>	7,1 ± 2,8 <sup>a</sup>	7,0 ± 2,7 <sup>a</sup>
NEAA	43,8 ± 6,5 <sup>a</sup>	59,1 ± 2,5 <sup>a</sup>	57,0 ± 0,1 <sup>ab</sup>	54,7 ± 1,5 <sup>ab</sup>

LD: límite de detección; misma letra en la misma fila significa que no hay diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza; los valores se expresan como el valor medio ± DE (n=2).

Sin embargo, el perfil de AG de la biomasa ROR004 (apartado 4.1, Tabla 11; apartado 4.3, Tabla 24; apartado 4.5, Tabla 39) varía en función del medio de fermentación (Tabla 52). En las condiciones estudiadas es difícil concluir que factores tienen mayor efecto en los perfiles obtenidos, debido a que, por una parte, tenemos el factor del sistema de agitación y por otro, el medio de cultivo utilizado. Por un lado, podemos comparar el perfil de AG de la biomasa en medio sintético, viendo sobre todo el efecto del modo de agitación, con flujo de aire (apartado 4.3, relación C:N 3,4, 120 h, Tabla 24) y en matraz con agitación (apartado 4.1 C:N 10,7, 72 h, Tabla 11). Esta comparativa resulta en una producción significativamente mayor de SFA y una menor producción de MUFA en el matraz con agitación, si bien no se ha

encontrado entre la bibliografía una posible explicación a este efecto. Es probable que esté relacionado con un cambio en el metabolismo causado por diferentes tasas de oxigenación o por las propias fuerzas de agitación.

Por otro lado, podemos comparar el efecto del medio del cultivo sobre el perfil de AG. Comparando la biomasa crecida en melaza de naranja, medio sintético (apartado 4.3, Tabla 24) y lixiviado de frutas y verduras (apartado 4.5, Tabla 39), los tres con aireación forzada, se observa que las biomazas obtenidas en melazas y lixiviados de frutas y verduras producen significativamente mayores cantidades de PUFA que la biomasa en medio sintético y una tendencia a la disminución de MUFA (Tabla 52). La biomasa crecida en lixiviados de frutas y verduras también contiene porcentajes significativamente mayores de SFA que la biomasa crecida en medio sintético y melaza de naranja.

Tabla 52. Perfil de AG (% total AG) de la biomasa de ROR004 obtenida mediante SmF de medio sintético con agitación orbital (apartado 4.1) y aireación forzada en medio sintético, melaza de naranja (apartado 4.3) y lixiviado de frutas y verduras (apartado 4.5).

AG	SmF agitación orbital	SmF aire forzado		
	Medio sintético	Medio sintético	Melaza de naranja	Lixiviado de frutas y verduras
14:00	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,4 <sup>a</sup>
15:0	<LD	<LD	0,3 ± 0,0	<LD
16:0	20,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	16,4 ± 1,5 <sup>ab</sup>	14,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,1 ± 4,0 <sup>ab</sup>
16:1	<LD	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,7 <sup>a</sup>
18:0	22,9 ± 0,0 <sup>b</sup>	7,4 ± 2,0 <sup>a</sup>	11,4 ± 1,5 <sup>ab</sup>	19,9 ± 8,4 <sup>ab</sup>
18:1	42,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	62,7 ± 8,4 <sup>a</sup>	39,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	29,7 ± 6,5 <sup>a</sup>
18:2n-6	6,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,6 ± 1,3 <sup>a</sup>	19,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	16,3 ± 3,2 <sup>b</sup>
18:3n-6	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,1 ± 2,9 <sup>ab</sup>	8,6 ± 0,3 <sup>ab</sup>	9,2 ± 3,8 <sup>b</sup>
18:3n-3	<LD	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,5 ± 1,8 <sup>a</sup>
20:00	1,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
20:1n-9	0,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>ab</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>ab</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>
22:0	1,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
24:0	1,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,2 ± 1,3 <sup>a</sup>
SFA	48,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	26,1 ± 4,2 <sup>a</sup>	31,2 ± 2,2 <sup>a</sup>	42,0 ± 3,0 <sup>b</sup>
MUFA	43,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	64,0 ± 8,4 <sup>a</sup>	40,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	30,9 ± 5,8 <sup>a</sup>
PUFA	8,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,8 ± 4,2 <sup>a</sup>	28,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	27,1 ± 8,8 <sup>b</sup>
Total	17,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,1 ± 3,8 <sup>a</sup>

LD: límite de detección; misma letra en la misma fila significa que no hay diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza; los valores se expresan como el valor medio ± DE (medio sintético en agitación orbital n= 1, resto n=2).

También hay que señalar que todos los procesos fermentativos presentados a lo largo de la tesis presentan una reducción evidente de los azúcares libres y, por tanto, de la DQO. De esta manera, los procesos de SmF estudiados tendrían un efecto positivo en la reducción de los costes de tratamiento de estos subproductos líquidos, melazas de naranja y jugos de frutas y verduras, que, a su vez, tendría un efecto positivo en la reducción del impacto ambiental.

El apartado 4.7 además, abre la posibilidad de la extracción de la proteína de las biomásas obtenidas y de la aplicación de proteasas con el objetivo de aumentar tanto el grado de hidrólisis como de potenciar la producción de péptidos de menores pesos moleculares, presuponiendo una mejora en la biodisponibilidad de los mismos y, por lo tanto, una mayor absorción de esos AA. Hasta donde conocemos, es el primer trabajo de obtención de hidrolizados proteicos realizado en biomasa de *Zygomycetes*.

## **2 La fermentación en estado solido**

Los apartados 4.2, 4.4 y 4.5 de resultados y discusión se centran en la SSF demostrando una aplicación exitosa en subproductos como el BSG y FVS. En Europa se generan aproximadamente unos 7 y 12 millones de desperdicio anual de BSG y frutas y verduras respectivamente [47,49]. Esta situación genera una necesidad apremiante para garantizar una solución económica y ambientalmente viable. El principal impedimento para el uso directo de estos subproductos en alimentación animal de calidad es el escaso valor nutricional que presentan (bajo contenido en proteína en el caso de las frutas y verduras), alta humedad (75-85% en ambos casos), baja digestibilidad o la presencia de posibles sustancias indeseables como agentes antinutricionales [56,371]. En la actualidad, estabilizar (deshidratar) estos productos con un gran contenido de humedad que, en definitiva, no alcanzan a competir nutricionalmente con otras materias primas del sector como la soja o la harina de pescado, hace inviable su uso de manera regulada y constante en el tiempo.

Sin embargo, la SSF proporciona mejoras en el perfil nutricional de los subproductos, aumentando del contenido proteico (entre 1,5 y 2 veces, Tabla 15, Tabla 25, Tabla 35), lo que puede ser un claro factor de valorización de cara a su uso en alimentación humana o animal.

Por otro lado, y a pesar de que la composición en aminoácidos de la masa fúngica es estable (Tabla 51), y dado que el resultado de la SSF es la mezcla entre el sustrato y el micelio, el contenido aminoacídico de los productos obtenidos depende de la biomasa de partida. En

cualquier caso, se observa un incremento generalizado en el contenido de EAA, especialmente en el caso de las FVS (Tabla 35, +30%).

Un caso similar se observa en la cantidad total y la composición de los diferentes AG. La fermentación aumenta la cantidad total de lípidos presente en la biomasa de frutas y verduras (Tabla 13, + 169% en frutas, Tabla 36, +32% para FVS), pero no en BSG (Tabla 25), donde se observa una reducción del total de lípidos. Sin duda esto se debe a que el BSG tiene un nivel de partida mucho mayor (11% de lípidos antes de fermentar) que las frutas (1,6 % de lípidos en sustrato sin fermentar). El mismo efecto del sustrato inicial se observa en la proporción de los diferentes AG, si bien, en general, se observa una tendencia hacia una mayor proporción de MUFA y reducción porcentual de PUFA (Tabla 17, Tabla 32, Tabla 36). Recordemos que, como se ve en la Tabla 52, el C18:1 es el AG mayoritario en la masa fúngica, por lo que es normal que la proporción de MUFA aumente. En todas las fermentaciones se observa la aparición de GLA, un AG característico de la biomasa de *Rhizopus* [321].

### 3 Una solución integral

El apartado 4.5 de resultados y discusión además plantea una aplicación integral de valorización, combinando las tecnologías de SSF y SmF, de descartes de frutas y verduras. Este grupo de alimentos supone la fracción alimentaria con mayor porcentaje de descartes en relación a su producción en Europa (Figura 7), además, presentan un contenido proteico bajo (8- 10 % en ES) con un contenido muy elevado de humedad (80-90 %) y, por lo tanto, sin ningún sistema de valorización existente. Estudios previos se han centrado en aplicaciones de SSF en subproductos de frutas y/o verduras en condiciones de baja humedad (< 35%) obtenidas mediante un proceso previo de desecación [146,147,361], el cual es económicamente inviable. Este proceso conjunto se plantea debido a que el secado de las materias primas para un condicionamiento inicial es muy costoso, por lo tanto, un primer acondicionamiento de la materia prima se realiza mediante un proceso de extracción del agua por prensado. De esta manera se generan dos productos, uno sólido (FVS, 77 % de humedad) y uno líquido (46 g/l de azúcares). El segundo, se somete a SmF y el sólido a SSF generando materias primas alternativas para piensos, dando solución a la inviabilidad de secado inicial y, a su vez, valorizando el lixiviado producido. Este proceso combinado abre una nueva oportunidad para las frutas y verduras sin el cual podrían considerarse inviables para este proceso. Tal y como se ha demostrado en el apartado 4.6, el proceso de secado es clave en el análisis económico del proceso, por lo que un enfoque integral conllevaría una reducción en el gasto y,

previsiblemente, un aumento de ingresos por venta de harina de biomasa fúngica que podría rentabilizar el proceso de secado y disminuir el impacto ambiental generado por no tener que tratar esa gran cantidad de residuos.

Además de la viabilidad técnica del proceso a escala laboratorio (apartado 4.5), esta tesis recoge en el apartado 4.6 dos ideas claves para apuntalar el interés en una estrategia integral: la viabilidad del escalado y la viabilidad económica.

Así, se ofrece una primera aproximación hacia el procesamiento del BSG y FVS en reactor tipo tambor evaluando el uso de este sistema en el crecimiento de hongos filamentosos y el análisis nutricional de los productos fermentados respecto a la necesidad de las distintas especies de animales. El proceso se adapta de manera satisfactoria en el caso de FVS donde se dan mayores mejoras nutricionales respecto al producto original (+72% proteína y + 24% EAA).

En el mismo apartado 4.6 se realiza un análisis técnico económico, clave a la hora de dar un paso en el escalado de cualquier proceso de innovación. Este estudio analiza los factores económicos asociados a la viabilidad del proceso y concluye que uno de los factores clave del proceso es el ingreso generado (o el ahorro) por la no gestión de residuos. Estos ahorros se estiman en torno a los 300000 euros anuales para una planta de procesado de 5000 toneladas de descartes anuales (Tabla 49). El estudio económico del proceso de SSF indica que los costes estimados de producción de harina serían elevados debido sobre todo al coste de inversión y al coste de secado. Aun así, debido al gran ahorro derivado de no tener que gestionar los residuos, que es el factor que más contribuye a la viabilidad del resultado económico, se obtiene un resultado de explotación positivo en las condiciones estudiadas. Este estudio puede ayudar a la consecución de nuevos proyectos de demostración que desarrollen fermentadores adaptados a estos descartes y poder aplicarlo a nivel industrial, contribuyendo a la mejora de la sostenibilidad de la cadena alimentaria.

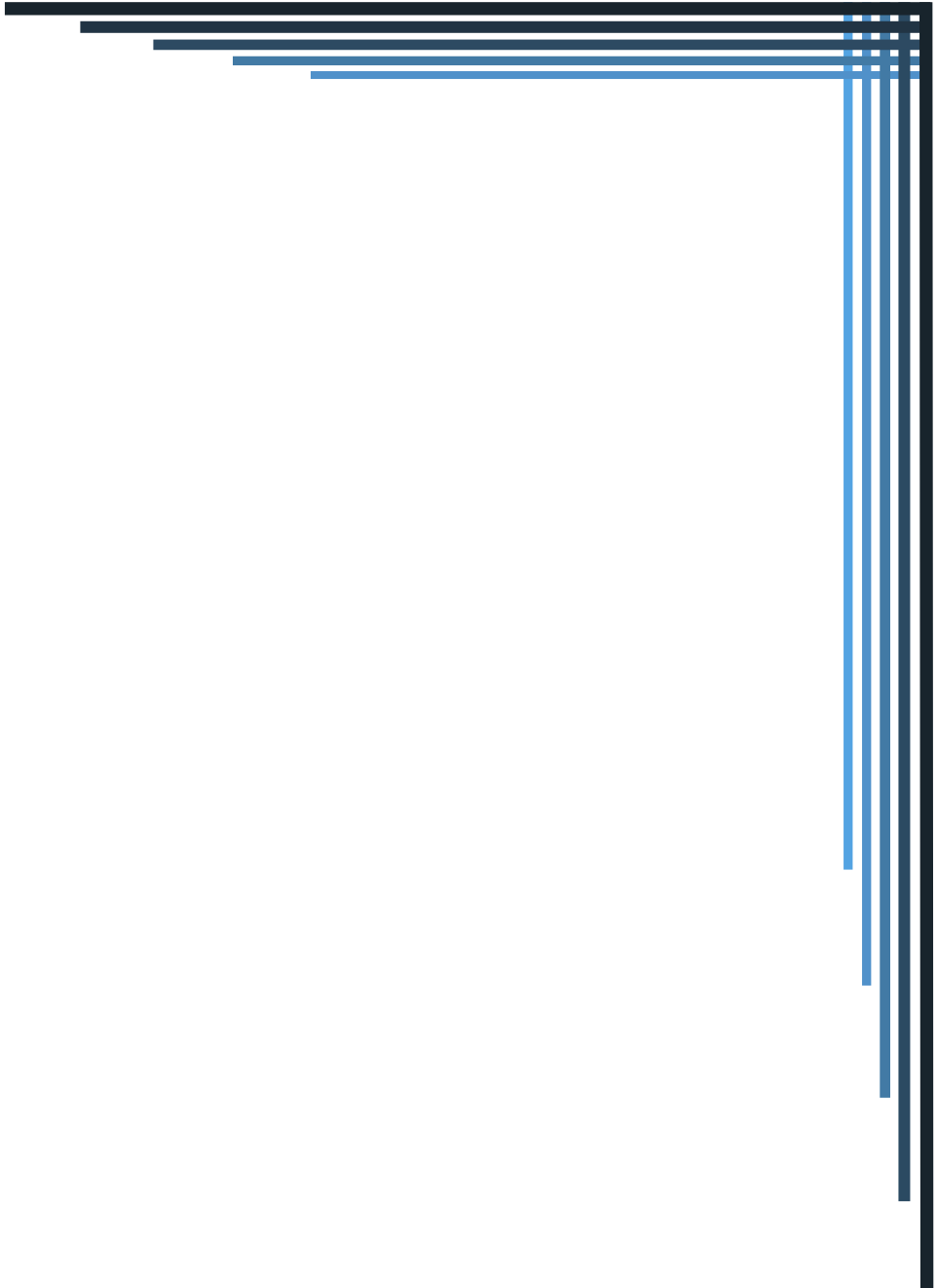
A lo largo de esta tesis se han presentado soluciones a una serie de problemáticas en torno a las aplicaciones del hongo *Rhizopus* sp. pero siguen surgiendo nuevos e interesantes retos. Uno de los retos más ambiciosos debido a su más que atractiva aplicación comercial es el escalado de los procesos de SSF. La tecnología de SSF tiene todavía un amplio campo de investigación con el fin de identificar procesos sostenibles, económicamente viables y desarrollos óptimos para mantener la productividad y calidad de los productos requeridos. Es evidente que se debe profundizar en el escalado de los procesos en la SSF donde se evalúen los retos que presenta

la viabilidad del proceso, principalmente el diseño del fermentador, la estacionalidad de la materia prima, la inclusión en el catálogo de piensos, una alternativa real al lixiviado obtenido y la disminución de los costes de secado. Para poder aplicar el proceso de SmF como alternativa a la producción de biogás planteada en el apartado 4.6 de resultados y discusión, es necesario optimizar la producción de biomasa y FBP, de manera que se generen unos ingresos económicos que den como resultado un beneficio respecto a los gastos de procesado.

Otro campo evidente de mejora es el estudio en profundidad del metabolismo fúngico en estos sustratos y su posible modificación. Es un campo en el que hay mucho trabajo por hacer incluso en el caso de un hongo tan, relativamente, bien caracterizado como *Rhizopus*. Teniendo claro qué buscamos y, sobre todo, el tipo de sustrato con el que trabajamos. Las posibles modificaciones se antojan críticas para mejorar la rentabilidad del proceso y evitar las limitaciones inherentes al cambio de escala.

Respecto a la unión con la realidad del sector de piensos, el contraste inicial realizado indica su interés por la harina de FVS obtenida a través de la SSF en el uso de rumiantes, tanto ovino lechero y vacuno, como ternero de cebo, y un interés bajo en ganado porcino en inclusiones altas debido a su gran contenido fibroso. Con el objetivo de conocer realmente los porcentajes de inclusión de las harinas en estas formulaciones y, por ende, una mejor estimación del precio de las harinas es necesario analizar la digestibilidad de las harinas obtenidas dirigidas a animales rumiantes. Por una parte, para garantizar la idoneidad de los alimentos fermentados, los ensayos de digestión *in vivo* son esenciales (la ingesta de materia seca, el rendimiento del crecimiento y el balance de nitrógeno), pero, por otra parte, existen diversas pruebas *in vitro* para estimar esa digestibilidad previa a las pruebas *in vivo* una vez se obtengan harinas específicas. Entre las pruebas *in vitro* existen las dirigidas a estimar la digestibilidad en rumiantes [27] en las cuales se determina la producción de gas en sistemas que contienen el sustrato, medios anaerobios y un inóculo del fluido del rumen. En cuanto a su uso como pienso complementario con inclusiones menores por aporte de antioxidantes, minerales y/o enzimas, puede ser de interés en piensos para animales monogástricos, aunque debería de estudiarse la mejor manera de preservar estos compuestos minoritarios en los productos finales, el coste de procesado y el precio de mercado.

## 6. CONCLUSIONES





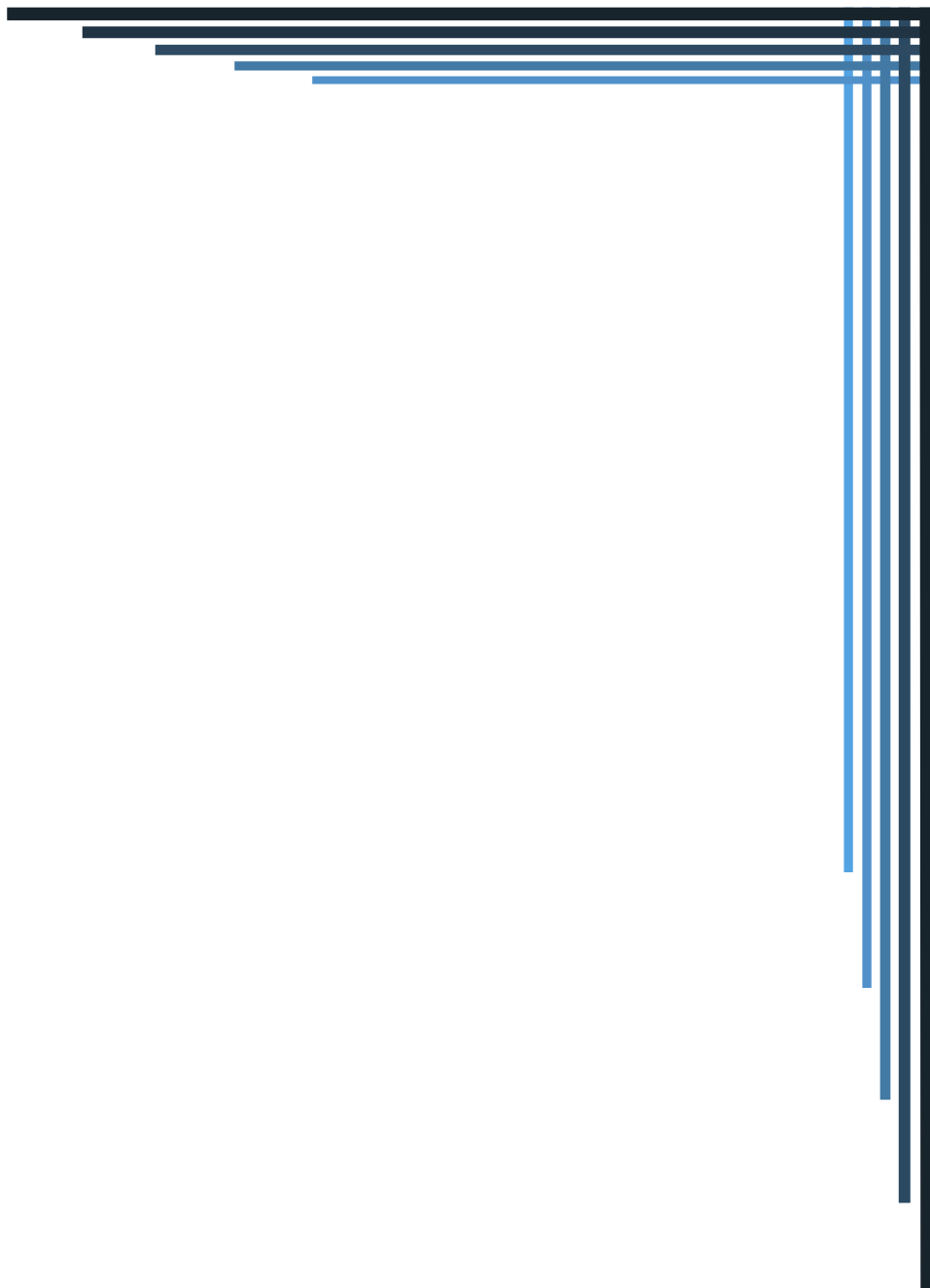


A continuación, se recogen las principales conclusiones de esta tesis, que contribuyen a un mayor conocimiento sobre el efecto de los procesos de fermentación, tanto sólido como líquido, en la composición de los diversos subproductos estudiados, los productos obtenidos y sus posibles aplicaciones.

1. Se han aislado e identificado cepas ambientales de *Rhizopus* sp., que consumen hasta el 99% de la glucosa en el medio, producen entre 40,2 y 53,8 g de ácido fumárico/l y cuya biomasa tiene hasta el 42% de proteína. Los experimentos de mutagénesis al azar llevados a cabo no han incrementado de manera significativa estas capacidades.
2. Durante la SSF de los diferentes sustratos, los principales parámetros que controlan el crecimiento de *Rhizopus* sp. y la composición de la masa resultante son, además de la composición inicial del subproducto, el tiempo y la temperatura de fermentación, el aporte de nitrógeno y relación sustrato:superficie. La mayor productividad (mg biomasa/g sustrato) se observó tras 72 horas cuando la densidad del sustrato modelo estaba cerca de 100 mg/cm<sup>2</sup>.
3. La SSF es adecuada para el tratamiento de subproductos de fruta, fruta y verdura y bagazo de cerveza. En todos los casos, el producto resultante se enriquece en proteínas (hasta casi duplicar el valor inicial) y modifica notablemente el perfil aminoacídico, enriqueciéndose en aminoácidos esenciales. *Rhizopus* sp. también puede fermentar otros subproductos agrícolas con menos eficiencia, incluyendo las peladuras de patata.
4. Igualmente, la SSF modifica la proporción de lípidos, aumentando el contenido en el caso de frutas y verduras y disminuyéndolo en el bagazo de cerveza, y el perfil de AG respecto al sustrato inicial, con aumentos de los SFA y MUFA y disminución de PUFA.
5. La SSF aumenta la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles tanto en bagazo de cerveza como en la mezcla de frutas y verduras.
6. En las pruebas preliminares de escalado, la SSF de la mezcla de frutas y verduras en un reactor tipo tambor incrementa notablemente la proteína (+72%), la grasa (+124%) y el contenido de aminoácidos esenciales (+24%) del producto resultante. Los resultados no fueron tan buenos con bagazo de cerveza, donde se vieron incrementos menores en todos los parámetros. Las pruebas iniciales de escalado demostraron que *Rhizopus* sp. no es adecuado para ensilados.

7. Las condiciones óptimas de SmF varían en función del sustrato y del producto de valor deseado. El tiempo de fermentación es crítico para una alta producción de biomasa y su efecto es mayor que la composición del medio. Sin embargo, la concentración de nitrógeno es crítica para la producción de proteínas y en cambio el tiempo no es un factor tan importante.
8. Entre los sustratos testados, la melaza de naranja y el lixiviado de frutas y verduras son sustratos adecuados para la SmF, obteniéndose hasta 11,9 g de biomasa por litro de sustrato y bajando la DQO del sustrato hasta en un 50-70%. Sin embargo, el lactosuero debe diluirse y completarse con otros nutrientes antes de la fermentación.
9. Las biomásas obtenidas en los subproductos líquidos seleccionados tienen una composición estable independientemente del sustrato, entre 31-39% de proteína, entre 40-50% de aminoácidos esenciales y 4-6% de lípidos totales.
10. Los perfiles de proteínas de las biomásas obtenidas en fermentación sumergida están dominados por Glu, Ala, Asp, Leu, Arg y Lys. con hasta el 48,9% de aminoácidos esenciales. Este perfil convierte estas biomásas en una opción interesante como fuentes de proteína alternativa.
11. El proceso de extracción permite recuperar el 43% de la proteína presente en la biomasa fúngica. La hidrólisis posterior (hasta un 30-60%) genera péptidos con pesos moleculares menores a 1,9 kDa, independientemente del sustrato. El proceso de hidrólisis no genera péptidos con actividades antioxidantes y antibacterianas en las condiciones estudiadas, ni se detecta actividad antibacteriana en los extractos obtenidos mediante SSF.
12. El contraste con el sector de piensos apunta un posible interés en el uso de las harinas obtenidas por SSF en la alimentación de rumiantes, tanto ovino y vacuno lechero como ternero de cebo, y un interés bajo en ganado porcino.
13. El estudio económico indica que los costes estimados de producción de la harina de frutas y verduras fermentadas serían elevados debido sobre todo al coste de inversión y coste de secado, si bien se obtiene un resultado positivo derivado del ahorro por la no-necesidad de gestionar el residuo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA





1. EFFPA (European Former Foodstuff Processor Association). Reducing food waste. <https://www.effpa.eu/reducing-food-waste/>. Accessed 2018/10/03
2. Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva (UE) 2018/851 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de mayo de 2018 por la que se modifica la Directiva 2008/98/CE sobre los residuos (2018).
3. Stenmarck A, Jensen C, Quested T, Moates G, Buksti M, Cseh B, Juul S, Parry A, Politano A, Redlingshofer B, Scherhauser S, Silvennoinen K, Soethoudt JM, Zubert C, Östergren K (2016) FUSIONS Estimates of European food waste levels. IVL Swedish Environmental Research Institute, Stockholm. doi:urn:nbn:nl:ui:32-501451
4. Gustavsson J, Cederberg C, Sonesson U, Van Otterdijk R, Meybeck A (2011) Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention. FAO, Düsseldorf.
5. Eusko Jaurlaritza-Gobierno Vasco. Plan de competitividad de la industria alimentaria vasca 2014-2016.
6. Östergren K, Gustavsson J, Bos-Brouwers H, Timmermans T, Hansen O-J, Møller H, Anderson G, O'Connor C, Soethoudt H, Quested T, Eastel S, Politano A, Bellettato C, Canali M, Luca Falasconi, Silvia Gaiani, Vittuari M, Schneider F, Moates G, Waldron K, Redlingshöfer B (2014) FUSIONS Definitional Framework for Food Waste.
7. Wadhwa M, Bakshi MPS (2013) Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. FAO, Bangkok.
8. FEFAC (European Feed Manufacturer's Federation). Environment report 2nd edition (2012). Brussels.
9. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>. Accessed 2018/11/05
10. Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu GS, Krogdahl A, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R, Wurtele E (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquacult Res* 38 (6):551-579. doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x
11. Tacon AGJ, Metian M (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285 (1):146-158. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.015
12. Watanabe T (2002) Strategies for further development of aquatic feeds. *Fish Sci* 68 (2):242-252. doi:10.1046/j.1444-2906.2002.00418.x
13. Hardy RW (2008) Farmed fish diet requirements for the next decade and implications for global availability of nutrients alternative protein sources in aquaculture diets. In: Lim C, Webster CD, Lee CS (eds) *Alternative protein sources in aquaculture diets*. Haworth Press, New York, pp 1-15
14. Hardy RW (2006) Worldwide fish meal production outlook and the use of alternative protein meals for aquaculture. In: L.E. Cruz Suarez, D. Ricque Marie, M. Tapia Salazar et al. (eds) *Avances en Nutrición Acuicola VIII*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, pp 396-409
15. Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) N° 767/2009 de 13 de julio de 2009 sobre la comercialización y la utilización de los piensos (2009).

16. Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) 2017/1017 de la Comisión de 15 de junio de 2017 por el que se modifica el Reglamento (UE) N° 68/2013 relativo al catálogo de materias primas para piensos (2017).
17. Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) N° 68/2013 de la Comisión de 16 de enero de 2013 relativo al catálogo de materias primas para piensos (2013).
18. Londoño-Hernández L, Ramírez-Toro C, Ruiz HA, Ascacio-Valdés JA, Aguilar-Gonzalez MA, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN (2017) *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *Int J Food Microbiol* 257:110-127. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.012
19. Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) N° 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de enero de 2005 por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos (2005).
20. Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 7 de mayo de 2002 sobre sustancias indeseables en la alimentación animal (2002).
21. Egan AR (2017) Animal nutrition and feed science. *Engineering* 3 (5):586-587. doi:10.1016/J.ENG.2017.05.025
22. de Blas C, Mateos GG, García-Rebollar P (2010) Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos <http://www.fundacionfedna.org/ingredientes-para-piensos>. Accessed 2018/11/18
23. Sari YW, Syafitri U, Sanders JPM, Bruins ME (2015) How biomass composition determines protein extractability. *Industrial Crops and Products* 70:125-133. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.020
24. Institut National de la Recherche Agronomique. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoin des animaux, valeurs des aliments. Tables INRA 2007 (2007). Versailles, France.
25. National Research Council. Nutrient requirements of small ruminants: sheeps, goats, cervids and world camelids (2007). Wasighton D.C. doi:10.17226/11654
26. Shrivastava B, Nandal P, Sharma A, Jain KK, Khasa YP, Das TK, Mani V, Kewalramani NJ, Kundu SS, Kuhad RC (2012) Solid state bioconversion of wheat straw into digestible and nutritive ruminant feed by *Ganoderma* sp. rckk02. *Bioresour Technol* 107:347-351. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.096
27. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 48 (3):185-197. doi:10.1016/0377-8401(94)90171-6
28. Boisen S, Fernández JA (1997) Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. *Anim Feed Sci Technol* 68 (3):277-286. doi:10.1016/S0377-8401(97)00058-8
29. Bach A, Fernández C, Terre M (2010) Necesidades nutricionales para rumiantes de recría. FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal).
30. de Blas C, Mateos GG (2013) Necesidades nutricionales para ganado porcino. FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal).
31. Lázaro R, Mateos GG (2008) Necesidades nutricionales para avicultura: pollos de carne y aves de puesta. FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal).

32. Miles RD, Chapman FA (2006) The benefits of fish meal in aquaculture diets. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Florida.
33. Lall SP, Tibbetts SM (2009) Nutrition, Feeding, and Behavior of Fish. *Veterinary clinics of north America: exotic animal practice* 12 (2):361-372. doi:10.1016/j.cvex.2009.01.005
34. Cowey CB (1995) Intermediary metabolism in fish with reference to output of end products of nitrogen and phosphorus. *Water Science and Technology* 31 (10):21-28. doi:10.1016/0273-1223(95)00423-K
35. Peres H, Oliva-Teles A (2006) Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 256 (1):395-402. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.02.010
36. Calsamiglia S, Bach A, de Blas C, Fernández C, García-Rebollar P (2009) Necesidades nutricionales para rumiantes de leche. FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal).
37. Jensen LS, Shutze JV (1963) Essential fatty acid deficiency in laying hen. *Poult Sci* 42 (4):1014-&. doi:10.3382/ps.0421014
38. Grobas S, Mendez J, Lazaro R, de Blas C, Mateos GG (2001) Influence of source and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolks of two strains of laying hens. *Poult Sci* 80 (8):1171-1179. doi:10.1093/ps/80.8.1171
39. Grobas S, Mateos GG, Mendez J (1999) Influence of dietary linoleic acid on production and weight of eggs and egg components in young brown hens. *J Appl Poult Res* 8 (2):177-184. doi:10.1093/japr/8.2.177
40. Grobas S, Mendez J, De Blas C, Mateos GG (1999) Laying hen productivity as affected by energy, supplemental fat, and linoleic acid concentration of the diet. *Poult Sci* 78 (11):1542-1551. doi:10.1093/ps/78.11.1542
41. Sargent JR, Tocher DR, Bell JG (2003) 4 - The Lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds) *Fish Nutrition (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp 181-257. doi:10.1016/B978-012319652-1/50005-7
42. Mourente G, Tocher DR (1993) Incorporation and metabolism of <sup>14</sup>C-labelled polyunsaturated fatty acids in juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *in vivo*. *Fish Physiol Biochem* 10 (6):443-453. doi:10.1007/bf00004599
43. Ghioni C, Tocher DR, Bell MV, Dick JR, Sargent JR (1999) Low C18 to C20 fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18:4(n-3), to eicosapentaenoic acid, 20:5(n-3), in a cell line from the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1437 (2):170-181. doi:10.1016/S1388-1981(99)00010-4
44. Calsamiglia S, Ferret A (2002) Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal)
45. Ferret A, Calsamiglia S, Bach A, Devant M, Fernández C, García-Rebollar P (2008) Necesidades nutricionales para rumiantes de cebo. FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal).
46. Gerrits W.J. J, A VMW (2007) El papel de la fibra dietética en alimentación porcina *Avances en tecnología porcina* 4:18-26

47. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>. Accessed 2018/10/09
48. Xiros C, Christakopoulos P (2012) Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste and Biomass Valorization* 3 (2):213-232. doi:10.1007/s12649-012-9108-8
49. The Brewers of Europe. Beer statistics 2017 edition (2017).
50. 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. *Eur Food Res Technol* 241 (3):303-315. doi:10.1007/s00217-015-2461-7
51. Vieira E, Rocha MAM, Coelho E, Pinho O, Saraiva JA, Ferreira IMPLVO, Coimbra MA (2014) Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Industrial Crops and Products* 52:136-143. doi:10.1016/j.indcrop.2013.10.012
52. Vieira E, Teixeira J, Ferreira I (2016) Valorization of brewers' spent grain and spent yeast through protein hydrolysates with antioxidant properties. *Eur Food Res Technol* 242 (11):1975-1984. doi:10.1007/s00217-016-2696-y
53. Celus I, Brijs K, Delcour JA (2006) The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of Cereal Science* 44 (2):203-211. doi:10.1016/j.jcs.2006.06.003
54. McCarthy AL, O'Callaghan YC, Connolly A, Piggott CO, FitzGerald RJ, O'Brien NM (2013) *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory effects of brewers' spent grain protein rich isolate and its associated hydrolysates. *Food Res Int* 50 (1):205-212. doi:10.1016/j.foodres.2012.10.022
55. Kotlar CE, Ponce AG, Roura SI (2013) Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically. *LWT - Food Science and Technology* 50 (2):378-385. doi:10.1016/j.lwt.2012.09.005
56. Ikram S, Huang LY, Zhang HJ, Wang J, Yin M (2017) Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain. *J Food Sci* 82 (10):2232-2242. doi:10.1111/1750-3841.13794
57. McCarthy AL, O'Callaghan YC, Piggott CO, FitzGerald RJ, O'Brien NM (2013) Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. *The Proceedings of the Nutrition Society* 72 (1):117-125. doi:10.1017/S0029665112002820
58. Martins S, Mussatto SI, Martinez-Avila G, Montanez-Saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA (2011) Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol Adv* 29 (3):365-373. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.008
59. Cooray ST, Chen WN (2018) Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *Journal of Functional Foods* 42:85-94. doi:10.1016/j.jff.2017.12.027
60. Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y (2001) Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 59:59-62
61. Mussatto SI, Roberto IC (2006) Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81:268-274. doi:10.1002/jctb.1374



62. Xiros C, Topakas E, Katapodis P, Christakopoulos P (2008) Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresour Technol* 99 (13):5427-5435. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.010
63. Carvalheiro F, Esteves MP, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM (2004) Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresour Technol* 91 (1):93-100. doi:10.1016/S0960-8524(03)00148-2
64. Canedo MS, de Paula FG, da Silva FA, Vendruscolo F (2016) Protein enrichment of brewery spent grain from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Bioprocess Biosystems Eng* 39 (7):1105-1113. doi:10.1007/s00449-016-1587-8
65. Mollea C, Marmo L, Bosco F (2013) Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy Industry. In: Mazzalupo I (ed) Food industry. InTECH. doi:10.5772/53159
66. Yadav JSS, Yan S, Pilli S, Kumar L, Tyagi RD, Surampalli RY (2015) Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol Adv* 33 (6):756-774. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.07.002
67. Carvalho F, Prazeres AR, Rivas J (2013) Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci Total Environ* 445-446:385-396. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.038
68. Yadav JSS, Yan S, Ajila CM, Bezawada J, Tyagi RD, Surampalli RY (2016) Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. *Food Bioprod Process* 99:156-165. doi:10.1016/j.fbp.2016.04.012
69. Willetts A, Ugalde U (1987) The production of single-cell protein from whey. *Biotechnol Lett* 9 (11):795-800. doi:10.1007/bf01028286
70. Chatterjee S, Guha AK (2014) A study on biochemical changes during cultivation of *Rhizopus oryzae* in deproteinized whey medium in relation to chitosan production. *Lett Appl Microbiol* 59 (2):155-160. doi:10.1111/lam.12259
71. Chatterjee S, Chatterjee BP, Guha AK (2008) Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones. *Int J Biol Macromol* 42 (2):120-126. doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.10.006
72. FAO (2017) Citrus fruit - fresh and processed statistical bulletin 2016. Trade and Market Division. Rome.
73. Tripodo MM, Lanuzza F, Micali G, Coppolino R, Nucita F (2004) Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. *Bioresour Technol* 91 (2):111-115. doi:10.1016/S0960-8524(03)00183-4
74. Rezzadori K, Benedetti S, Amante ER (2012) Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. *Food Bioprod Process* 90 (4):606-614. doi:10.1016/j.fbp.2012.06.002
75. Negro V, Mancini G, Ruggeri B, Fino D (2016) Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: review on limonene case study and energy valorization. *Bioresour Technol* 214:806-815. doi:10.1016/j.biortech.2016.05.006
76. Ozturk B, Parkinson C, Gonzalez-Miquel M (2018) Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Separation and Purification Technology* 206:1-13. doi:doi.org/10.1016/j.seppur.2018.05.052

77. Cypriano DZ, da Silva LL, Tasic L (2018) High value-added products from the orange juice industry waste. *Waste Manage* 79:71-78. doi:doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.028
78. Kantifedaki A, Kachrimanidou V, Mallouchos A, Papanikolaou S, Koutinas AA (2018) Orange processing waste valorisation for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. *Journal of Cleaner Production* 185:882-890. doi:10.1016/j.jclepro.2018.03.032
79. Benny GL, Humber RA, Morton JB (2001) *Zygomycota: Zygomycetes*. In: McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA (eds) *Systematics and Evolution: Part A*. Springer Berlin, Heidelberg, pp 113-146. doi:10.1007/978-3-662-10376-0\_6
80. Lennartsson PR, Taherzadeh MJ, Edebo L (2014) *Rhizopus*. In: Batt CA (ed) *Encyclopedia of food microbiology. Reference module in food safety*. pp 284-290. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00391-8
81. Zheng RY, Chen GQ, Huang H, Liu XY (2007) A monograph of *Rhizopus*. *Sydowia* 59 (2):273-372
82. Schipper MAA, Stalpers JA (1984) A revision of the genus *Rhizopus*. *Studies in mycology*; no. 25. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.
83. Lennartsson PR (2012) *Zygomycetes* and cellulose residuals: hydrolysis, cultivation and applications. Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden .
84. Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and food spoilage*. Third edition edn. Springer. doi:10.1007/978-0-387-92207-2
85. Ghosh B, Ray RR (2011) Current Commercial Perspective of *Rhizopus oryzae*: A Review. *Journal of Applied Science* 11 (14):2470-2486. doi:10.3923/jas.2011.2470.2486
86. Ma LJ, Ibrahim AS, Skory C, Grabherr MG, Burger G, Butler M, Elias M, Idnurm A, Lang BF, Sone T, Abe A, Calvo SE, Corrochano LM, Engels R, Fu JM, Hansberg W, Kim JM, Kodira CD, Koehrsen MJ, Liu B, Miranda-Saavedra D, O'Leary S, Ortiz-Castellanos L, Poulter R, Rodriguez-Romero J, Ruiz-Herrera J, Shen YQ, Zeng QD, Galagan J, Birren BW, Cuomo CA, Wickes BL (2009) Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genet* 5 (7). doi:10.1371/journal.pgen.1000549
87. Meussen BJ, de Graaff LH, Sanders JP, Weusthuis RA (2012) Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol* 94 (4):875-886. doi:10.1007/s00253-012-4033-0
88. Maas RH, Springer J, Eggink G, Weusthuis RA (2008) Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on L+-lactic acid production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35 (6):569-578. doi:10.1007/s10295-008-0318-9
89. Denter J, Rehm HJ, Bisping B (1998) Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation. *Int J Food Microbiol* 45 (2):129-134. doi:10.1016/s0168-1605(98)00155-x
90. Nagel FJ, Oostra J, Tramper J, Rinzema A (1999) Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. *Process Biochem* 35 (1-2):69-75. doi:10.1016/s0032-9592(99)00034-5
91. Zhang ZY, Jin B, Kelly JM (2006) Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (2):229-236. doi:10.1007/s11274-006-9218-1

92. Sun J, Zhu J, Li W (2012) L-(+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using pretreated dairy manure as carbon and nitrogen source. *Biomass Bioenergy* 47:442-450. doi:10.1016/j.biombioe.2012.09.011
93. Ghosh B, Ray RR (2013) Isolation of hyperamylolytic mutant strain of *Rhizopus oryzae* PR7 by classical mutagenesis. *International Journal of Pharma Sciences and Research* 4 (3):36-41
94. Zhang B, Yang S-T (2012) Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae*: effects of overexpressing *fumR* gene on cell growth and fumaric acid biosynthesis from glucose. *Process Biochem* 47 (12):2159-2165. doi:10.1016/j.procbio.2012.08.009
95. Zhang B, Skory CD, Yang ST (2012) Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae*: effects of overexpressing *pyc* and *pepc* genes on fumaric acid biosynthesis from glucose. *Metab Eng* 14 (5):512-520. doi:10.1016/j.ymben.2012.07.001
96. Chen X, Wang Y, Dong X, Hu G, Liu L (2017) Engineering rTCA pathway and C4-dicarboxylate transporter for L-malic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi:10.1007/s00253-017-8141-8
97. Song P, Li S, Ding Y, Xu Q, Huang H (2011) Expression and characterization of fumarase (FUMR) from *Rhizopus oryzae*. *Fungal biology* 115 (1):49-53. doi:10.1016/j.funbio.2010.10.003
98. Chen XL, Song W, Gao C, Qin W, Luo QL, Liu J, Liu LM (2016) Fumarate production by *Torulopsis glabrata*: engineering heterologous fumarase expression and improving acid tolerance. *PLoS One* 11 (10). doi:10.1371/journal.pone.0164141
99. Nout MJR, Aidoo KE (2011) Asian fungal fermented food. In: Hofrichter M (ed) *Industrial Applications*. Springer Berlin, Heidelberg, pp 29-58. doi:10.1007/978-3-642-11458-8\_2
100. Hachmeister KA, Fung DYC (1993) Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Crit Rev Microbiol* 19 (3):137-188. doi:10.3109/10408419309113527
101. Cantabrana I, Perise R, Hernández I (2015) Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 2 (2):103-111. doi:10.1016/j.ijgfs.2015.01.001
102. Lv X-C, Huang Z-Q, Zhang W, Rao P-F, Ni L (2012) Identification and characterization of filamentous fungi isolated from fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing. *J Gen Appl Microbiol* 58 (1):33-42. doi:10.2323/jgam.58.33
103. Baumann U, Bisping B (1995) Proteolysis during tempe fermentation. *Food Microbiol* 12 (1):39-47. doi:10.1016/s0740-0020(95)80077-8
104. Munguia Pérez R, Reyes Matías M, Espinosa Taxis A, Navarro A, Melgoza Palma N (2008) Estudio sobre la fermentación de soya (*Glycine max*) con *Rhizopus oryzae*. *Cienc en la Front Rev Cienc y Tecnol la Univ Autónoma Ciudad Juárez* VI:85-90
105. Asadollahzadeh M, Ghasemian A, Saraeian A, Resalati H, Taherzadeh M (2018) Production of fungal biomass protein by filamentous fungi cultivation on liquid waste streams from pulping process. *BioResources* 13 (1):5013-5031. doi:10.15376/biores.13.3.5013-5031
106. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Carbohydrase from *Rhizopus oryzae*. <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=807>. Accessed 2019/01/26

107. Partida-Martinez LP, Flores de Looss C, Ishida K, Ishida M, Roth M, Buder K, Hertweck C (2006) Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the *Zygomycota*, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. *Appl Environ Microbiol* 73 (3):793-797. doi:10.1128/aem.01784-06
108. Varga J, Peteri Z, Tabori K, Teren J, Vagvolgyi C (2005) Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *Int J Food Microbiol* 99 (3):321-328. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.034
109. Hackbart HCS, Machado AR, Christ-Ribeiro A, Prietto L, Badiale-Furlong E (2014) Reduction of aflatoxins by *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*. *Mycotoxin Res* 30 (3):141-149. doi:10.1007/s12550-014-0202-6
110. Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Maryam R (2006) Reduction of aflatoxin B1 in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination. *Mycopathologia* 162 (4):307-311. doi:10.1007/s11046-006-0047-4
111. Kusumaningtyas E, Widiastuti R (2007) *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhizopus oligosporus*, the promising agent for controlling of aflatoxin B1 contamination in poultry feed. Department of mycology, Research institute for veterinary science, Bogor, Indonesia.
112. Azeke MA, Fretzdorff B, Buening-Pfaue H, Betsche T (2007) Comparative effect of boiling and solid substrate fermentation using the tempeh fungus (*Rhizopus oligosporus*) on the flatulence potential of African yambean (*Sphenostylis stenocarpa* L.) seeds. *Food Chem* 103 (4):1420-1425. doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.058
113. Suzuki T, Ushikoshi S, Morita H, Fukuoka H (2007) Aqueous extracts of *Rhizopus oryzae* induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *J Health Sci* 53 (6):760-765. doi:10.1248/jhs.53.760
114. Brar SK, Dhillon GS, Soccol CR (2014) Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals. Springer, New York. doi:10.1007/978-1-4614-8005-1
115. Mamma D, Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P (2009) Biotechnological potential of fruit processing industry residues. In: Nigam PS, Pandey A (eds) *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. Springer, pp 273-291. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7\_14
116. Liu Z, Liao W, Liu Y (2016) A sustainable biorefinery to convert agricultural residues into value-added chemicals. *Biotechnology for biofuels* 9:197. doi:10.1186/s13068-016-0609-8
117. Nigam PS, Pandey A (2009) *Biotechnology for agro-industrial residues utilization*. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7
118. Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementation. *Bioresour Technol* 87 (2):167-198. doi:10.1016/s0960-8524(02)00167-0
119. Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 5 (1). doi:10.1186/s40643-017-0187-z
120. Kosseva MR (2013) Chapter 5 - Recovery of commodities from food wastes using solid-state fermentation. In: *Food Industry Wastes*. Academic Press, San Diego, pp 77-102. doi:10.1016/B978-0-12-391921-2.00005-6

121. Parveen J, Md. Zahangir A, Nurul U (2007) Potential strain to produce bioprotein from cheaper carbon source: hope for millions. *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3 (2):42-46. doi:10.3844/ajbbbsp.2007.42.46
122. Robinson T, Nigam P (2003) Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochem Eng J* 13 (2-3):197-203. doi:10.1016/s1369-703x(02)00132-8
123. Thomas L, Larroche C, Pandey A (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 81:146-161. doi:10.1016/j.bej.2013.10.013
124. Ugwuanyi JO, McNeil B, Harvey LM (2009) Production of protein-enriched feed using agro-industrial residues as substrates. In: Nigam PS, Pandey A (eds) *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. pp 77-103. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7\_5
125. Arora S, Rani R, Ghosh S (2018) Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *J Biotechnol* 269:16-34. doi:10.1016/j.jbiotec.2018.01.010
126. Soccol CR, da Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LPdS (2017) Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation* 1 (1):52-71. doi:10.1016/j.biori.2017.01.002
127. Lizardi-Jimenez MA, Hernandez-Martinez R (2017) Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech* 7 (1):44. doi:10.1007/s13205-017-0692-y
128. Orzua MC, Mussatto SI, Contreras-Esquivel JC, Rodriguez R, de la Garza H, Teixeira JA, Aguilar CN (2009) Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products* 30 (1):24-27. doi:10.1016/j.indcrop.2009.02.001
129. Lopez E, Deive FJ, Longo MA, Sanroman MA (2010) Strategies for utilisation of food-processing wastes to produce lipases in solid-state cultures of *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess Biosyst Eng* 33 (8):929-935. doi:10.1007/s00449-010-0416-8
130. Soccol CR, Iloki I, Marin B, Raimbault M (1994) Comparative production of alpha-amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid-state fermentations. *J Food Sci Technol-Mysore* 31 (4):320-323
131. Lincoln L, More SS (2018) Comparative evaluation of extracellular -d-fructofuranosidase in submerged and solid-state fermentation produced by newly identified *Bacillus subtilis* strain. *J Appl Microbiol* 125 (2):441-456. doi:10.1111/jam.13881
132. Raimbault M, Toro CR (1997) Growth of *Rhizopus* sp. on ungelatinized cassava flour in solid state fermentation for protein enrichment. In: Roussos S, Lonsane BK, Raimbault M, ViniestraGonzalez G (eds) *Advances in Solid State Fermentation*. pp 169-181. doi:10.1007/978-94-017-0661-2\_14
133. El-Bakry M, Abraham J, Cerda A, Barrena R, Ponsá S, Gea T, Sánchez A (2015) From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. *Crit Rev Environ Sci Technol* 45 (18):1999-2042. doi:10.1080/10643389.2015.1010423
134. Abu Yazid N, Barrena R, Komilis D, Sánchez A (2017) Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. *Sustainability* 9 (2):224. doi:10.3390/su9020224

135. Pandey A (2003) Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13:81-84. doi:doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3
136. Ali HKQ, Zulkali MMD (2011) Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 25 (2):255-266
137. Durand A (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem Eng J* 13 (2-3):113-125. doi:10.1016/s1369-703x(02)00124-9
138. M Stuart D, Mitchell D (2003) Mathematical model of heat transfer during solid-state fermentation in well-mixed rotating drum bioreactors. *J Chem Technol Biotechnol* 78 (11):1180-1192. doi:10.1002/jctb.920
139. Suryanarayan; S, Mazumdar K (2001) Solid State Fermentation. EE.UU. Patent N°. 6197573. Washington D.C. Patent and Trademark Office.
140. Andersen C, Korsholm L, Rezaei F, Chang F, Saadat AP (2015) Solid state bioreactor adapted for automation. European Patent EP2859085A2. European Patent Organisation.
141. Villas-Boas SG, Esposito E, Mitchell DA (2002) Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Anim Feed Sci Technol* 98 (1-2):1-12. doi:10.1016/s0377-8401(02)00017-2
142. Smith H, Doyle S, Murphy R (2015) Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. *Food Chem* 185:389-397. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.134
143. Aggelopoulos T, Katsieris K, Bekatorou A, Pandey A, Banat IM, Koutinas AA (2014) Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chem* 145:710-716. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.105
144. Kupski L, Cicolatti E, da Rocha M, Oliveira MD, Souza-Soares LD, Badiale-Furlong E (2012) Solid-state fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55 (6):937-942. doi:10.1590/S1516-89132012000600018
145. Oliveira MdS, Feddern V, Kupski L, Cicolatti EP, Badiale-Furlong E, de Souza-Soares LA (2010) Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. Caracterización físico-química de la biomasa del salvado de arroz fermentado. *CyTA - Journal of Food* 8 (3):229-236. doi:10.1080/19476330903450274
146. Dulf FV, Vodnar DC, Socaciu C (2016) Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chem* 209:27-36. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.016
147. Buenrostro-Figueroa JJ, Velázquez M, Flores-Ortega O, Ascacio-Valdés JA, Huerta-Ochoa S, Aguilar CN, Prado-Barragán LA (2017) Solid state fermentation of fig (*Ficus carica* L.) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. *Process Biochem* 62:16-23. doi:10.1016/j.procbio.2017.07.016
148. Albuquerque PM, Koch F, Trossini TG, Esposito E, Ninow JL (2006) Production of *Rhizopus oligosporus* protein by solid state fermentation of apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49:91-100
149. Kayode RMO, Sani A (2010) Mineral compositions and amino acid profile of mono-culture fungal fermented mango (*Mangifera Indica*) kernel cake. *J Agric Sci* 2 (3):69-74

150. Gibbs PA, Seviour RJ, Schmid F (2000) Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol* 20 (1):17-48. doi:10.1080/07388550091144177
151. Liu T, Miura S, Yaguchi M, Arimura T, Park EY, Okabe M (2006) Scale-up of L-lactic acid production by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 from 0.003 m<sup>3</sup> to 5 m<sup>3</sup> in airlift bioreactors. *J Biosci Bioeng* 101 (1):9-12. doi:10.1263/jbb.101.9
152. Papagianni M (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22 (3):189-259. doi:10.1016/j.biotechadv.2003.09.005
153. Liu Y, Liao W, Chen S (2008) Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. *Biotechnol Bioeng* 99 (1):117-128. doi:10.1002/bit.21531
154. Karmakar M, Ghosh B, Ray RR (2012) Effect of extracellular factors on growth and dimorphism of *Rhizopus oryzae* with multiple enzyme synthesizing ability. *Indian J Microbiol* 52 (2):215-221. doi:10.1007/s12088-011-0197-z
155. Jin B, Yu Q, van Leeuwen JH, Hung Y-T (2010) An integrated biotechnological process for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. In: Wang LK, Tay J-H, Tay STL, Hung Y-T (eds) *Environmental Bioengineering: Volume 11*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 699-721. doi:10.1007/978-1-60327-031-1\_20
156. Nair RB, Kabir MM, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ, Horvath IS (2018) Integrated process for ethanol, biogas, and edible filamentous fungi-based animal feed production from dilute phosphoric acid-pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotechnol* 184 (1):48-62. doi:10.1007/s12010-017-2525-1
157. Nair RB, Taherzadeh MJ (2016) Valorization of sugar-to-ethanol process waste vinasse: a novel biorefinery approach using edible *ascomyces* filamentous fungi. *Bioresour Technol* 221:469-476. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.074
158. Mahboubi A, Ferreira J, Taherzadeh M, Lennartsson P (2017) Production of fungal biomass for feed, fatty acids, and glycerol by *Aspergillus oryzae* from fat-rich dairy substrates. *Fermentation* 3 (4):48. doi:10.3390/fermentation3040048
159. Mahboubi A, Ferreira JA, Taherzadeh MJ, Lennartsson PR (2017) Value-added products from dairy waste using edible fungi. *Waste Manag* 59:518-525. doi:10.1016/j.wasman.2016.11.017
160. Souza Filho PF, Nair RB, Andersson D, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ (2018) Vegan-mycoprotein concentrate from pea-processing industry byproduct using edible filamentous fungi. *Fungal biology and biotechnology* 5:5. doi:10.1186/s40694-018-0050-9
161. Ferreira JA, Lennartsson PR, Niklasson C, Lundin M, Edebo L, Taherzadeh MJ (2012) Spent sulphite liquor for cultivation of an edible *Rhizopus* sp. *Bioresources* 7 (1):173-188
162. Nitayavardhana S, Issarapayup K, Pavasant P, Khanal SK (2013) Production of protein-rich fungal biomass in an airlift bioreactor using vinasse as substrate. *Bioresour Technol* 133:301-306. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.073
163. Nigam PS, Pandey A (2009) Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. In: Nigam PS, Pandey A (eds) *Biotechnology for agro-industrial residues utilization* Springer, 2009, pp 197-221. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7\_10

164. Battaglia E, Benoit I, van den Brink J, Wiebenga A, Coutinho PM, Henrissat B, de Vries RP (2011) Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. *BMC Genomics* 12:38. doi:10.1186/1471-2164-12-38
165. Benoit I, Coutinho PM, Schols HA, Gerlach JP, Henrissat B, de Vries RP (2012) Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. *BMC Genomics* 13:321. doi:10.1186/1471-2164-13-321
166. Freitas A, Escaramboni B, Carvalho A, Lima V, Oliva-Neto P (2014) Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. *Chemical Papers* 68 (4):442-450. doi:10.2478/s11696-013-0466-x
167. Kupski L, de Carvalho Silvello MA, Fontes MRV, Lima TS, Treichel H, Badiale Furlong E (2015) *R. oryzae* cellulases: a new approach to degrading lignocellulosic material. *J Food Biochem* 39 (2):129-138. doi:10.1111/jfbc.12097
168. Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, Fukuda H (2001) Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem Eng J* 8 (1):39-43. doi:10.1016/s1369-703x(00)00133-9
169. Bramorski A, Christen P, Ramirez M, Soccol CR, Revah S (1998) Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates. *Biotechnol Lett* 20 (4):359-362. doi:10.1023/a:1005323229125
170. Huang LP, Jin B, Lant P, Zhou J (2005) Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochem Eng J* 23 (3):265-276. doi:10.1016/j.bej.2005.01.009
171. Zheng YX, Wang YL, Pan J, Zhang JR, Dai Y, Chen KY (2017) Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid content. *Bioresour Technol* 241:1138-1144. doi:10.1016/j.biortech.2017.06.066
172. Massarolo KC, Denardi de Souza T, Collazzo CC, Badiale Furlong E, Souza Soares LAd (2017) The impact of *Rhizopus oryzae* cultivation on rice bran: gamma-oryzanol recovery and its antioxidant properties. *Food Chem* 228:43-49. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.127
173. Liao W, Liu Y, Frear C, Chen S (2008) Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material – dairy manure – using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Bioresour Technol* 99 (13):5859-5866. doi:10.1016/j.biortech.2007.10.006
174. Tai C, Li S, Xu Q, Ying H, Huang H, Ouyang P (2010) Chitosan production from hemicellulose hydrolysate of corn straw: impact of degradation products on *Rhizopus oryzae* growth and chitosan fermentation. *Lett Appl Microbiol* 51 (3):278-284. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02893.x
175. Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K (2015) Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits. *J Biosci Bioeng* 119 (1):10-18. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.06.003



176. Xu Q, Li S, Fu Y, Tai C, Huang H (2010) Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresour Technol* 101 (15):6262-6264. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.086
177. Ferreira JA, Lennartsson PR, Edebo L, Taherzadeh MJ (2013) *Zygomycetes*-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresour Technol* 135:523-532. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.064
178. Wright BE, Longacre A, Reimers J (1996) Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*. *J Theor Biol* 182 (3):453-457. doi:10.1006/jtbi.1996.0186
179. Kubicek CP, Punt P, Visser J (2011) Production of organic acids by filamentous fungi. In: Hofrichter M (ed) *Industrial Applications*. Springer Berlin, Heidelberg, pp 215-234. doi:10.1007/978-3-642-11458-8\_10
180. Abe A, Oda Y, Asano K, Sone T (2007) *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers. *Mycologia* 99 (5):714-722. doi:10.3852/mycologia.99.5.714
181. Saito K, Hasa Y, Abe H (2012) Production of lactic acid from xylose and wheat straw by *Rhizopus oryzae*. *J Biosci Bioeng* 114 (2):166-169. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.03.007
182. Das RK, Brar SK, Verma M (2015) A fermentative approach towards optimizing directed biosynthesis of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* 1526 utilizing apple industry waste biomass. *Fungal Biol* 119 (12):1279-1290. doi:10.1016/j.funbio.2015.10.001
183. Yu S, Huang D, Wen J, Li S, Chen Y, Jia X (2012) Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by femtosecond laser irradiation. *Bioresour Technol* 114:610-615. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.087
184. Bai DM, Zhao XM, Li XG, Xu SM (2004) Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. *Biochem Eng J* 18 (1):41-48. doi:10.1016/s1369-703x(03)00126-8
185. Magnuson JK, Lasure LL (2004) Organic acid production by filamentous fungi. In: Tkacz JS, Lange L (eds) *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. Springer US, Boston, MA, pp 307-340. doi:10.1007/978-1-4419-8859-1\_12
186. Foster JW, Carson SF, Anthony DS, Davis JB, Jefferson WE, Long MV (1949) Aerobic formation of fumaric acid in the mold *Rhizopus nigricans*-synthesis by direct C-2 condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 35 (12):663-672. doi:10.1073/pnas.35.12.663
187. Zhang K (2012) Fumaric acid fermentation by *Rhizopus oryzae* with integrated separation technologies. The Ohio State University.,
188. Yu M-C, Wang R-C, Wang C-Y, Duan K-J, Sheu D-C (2007) Enhanced production of L(+)-lactic acid by flocc-form culture of *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 38 (3-4):223-228. doi:10.1016/j.jcice.2007.02.005
189. Zhou ZX, Du GC, Hua ZZ, Zhou JW, Chen J (2011) Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. *Bioresour Technol* 102 (20):9345-9349. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.120
190. Liu Y, Lv CW, Xu Q, Li S, Huang H, Ouyang PK (2015) Enhanced acid tolerance of *Rhizopus oryzae* during fumaric acid production. *Bioprocess Biosystems Eng* 38 (2):323-328. doi:10.1007/s00449-014-1272-8

191. Muhammet Şaban T (2012) Optimization of lactic acid production with immobilized *Rhizopus oryzae*. African Journal of Biotechnology 11 (34):8546-8552. doi:10.5897/ajb11.1706
192. Tay. A, S.T Y (2002) Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. Biotechnol Bioeng 80 (1):1-12
193. Lin J, Zhou M, Zhao X, Luo S, Lu Y (2007) Extractive fermentation of L-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized bed. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 46 (5):369-374. doi:10.1016/j.cep.2006.06.015
194. Upadhyaya S, Tiwari S, Arora N, Singh DP (2016) Microbial protein: a valuable component for future food security. In: Singh JS, Singh DP (eds) Microbes and environmental management. Studium press, India. doi:10.13140/rg.2.1.1775.8801
195. Suman G, Nupur M, Anuradha S, Pradeep B (2015) Single Cell Protein production: a review. International Journal of Current Microbiology and Applied Science 4 (9):251-262
196. Anupama, Ravindra P (2000) Value-added food: Single cell protein. Biotechnol Adv 18 (6):459-479. doi:10.1016/S0734-9750(00)00045-8
197. FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition (2007). vol 935. Geneva.
198. Bankefors J, Kaszowska M, Schleichriem C, Pickova J, Brännäs E, Edebo L, Kiessling A, Sandström C (2011) A comparison of the metabolic profile on intact tissue and extracts of muscle and liver of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – Application to a short feeding study. Food Chem 129 (4):1397-1405. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.081
199. Abro R, Moazzami AA, Lindberg JE, Lundh T (2014) Metabolic insights in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) fed with *Zygomycetes* and fish meal diets as assessed in liver using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. International Aquatic Research 6. doi:10.1007/s40071-014-0063-9
200. Ghormade V, Pathan EK, Deshpande MV (2017) Can fungi compete with marine sources for chitosan production? International journal of biological macromolecules 104:1415-1421. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112
201. Goksungur Y (2004) Optimization of the production of chitosan from beet molasses by response surface methodology. J Chem Technol Biotechnol 79 (9):974-981. doi:10.1002/jctb.1065
202. Dhillon GS, Kaur S, Sarma SJ, Brar SK (2013) Integrated process for fungal citric acid fermentation using apple processing wastes and sequential extraction of chitosan from waste stream. Industrial Crops and Products 50:346-351. doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.010
203. Satari B, Karimi K, Taherzadeh MJ, Zamani A (2016) Co-production of fungal biomass derived constituents and ethanol from citrus wastes free sugars without auxiliary nutrients in airlift bioreactor. International journal of molecular sciences 17 (3):302. doi:10.3390/ijms17030302
204. Kitts DD, Weiler K (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. Curr Pharm Des 9 (16):1309-1323. doi:10.2174/1381612033454883

205. Sánchez A, Vázquez A (2017) Bioactive peptides: a review. *Food Quality and Safety* 1 (1):29-46. doi:10.1093/foodsafe/fyx006
206. Rizzello CG, Nionelli L, Coda R, Gobbetti M (2012) Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutr Cancer* 64 (1):111-120. doi:10.1080/01635581.2012.630159
207. Coda R, Rizzello CG, Pinto D, Gobbetti M (2012) Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Appl Environ Microbiol* 78 (4):1087-1096. doi:10.1128/aem.06837-11
208. Sarmadi BH, Ismail A (2010) Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 31 (10):1949-1956. doi:10.1016/j.peptides.2010.06.020
209. Rizzello CG, Tagliacozzi D, Babini E, Sefora Rutella G, Taneyo Saa DL, Gianotti A (2016) Bioactive peptides from vegetable food matrices: research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods* 27:549-569. doi:10.1016/j.jff.2016.09.023
210. Hayes M, Tiwari BK (2015) Bioactive carbohydrates and peptides in foods: an overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities. *International journal of molecular sciences* 16 (9):22485-22508. doi:10.3390/ijms160922485
211. Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C (2004) Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int* 37 (2):123-131. doi:10.1016/j.foodres.2003.09.010
212. Meinschmidt P, Ueberham E, Lehmann J, Schweiggert-Weisz U, Eisner P (2016) Immunoreactivity, sensory and physicochemical properties of fermented soy protein isolate. *Food Chem* 205:229-238. doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.016
213. Roubos-van den Hil PJ, Nout MJ, van der Meulen J, Gruppen H (2010) Bioactivity of tempe by inhibiting adhesion of ETEC to intestinal cells, as influenced by fermentation substrates and starter pure cultures. *Food Microbiol* 27 (5):638-644. doi:10.1016/j.fm.2010.02.008
214. Abd Razak DL, Abd Rashid NY, Jamaluddin A, Sharifudin SA, Abd Kahar A, Long K (2017) Cosmeceutical potentials and bioactive compounds of rice bran fermented with single and mix culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 16 (2):127-134. doi:10.1016/j.jssas.2015.04.001
215. Kimatu BM, Zhao L, Biao Y, Ma G, Yang W, Pei F, Hu Q (2017) Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. *Food Chem* 230:58-67. doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.030
216. Connolly A, O'Keeffe MB, Piggott CO, Nongonierma AB, FitzGerald RJ (2015) Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewers' spent grain protein isolate. *Food Chem* 176:64-71. doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.027
217. García MC, Puchalska P, Esteve C, Marina ML (2013) Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta* 106:328-349. doi:10.1016/j.talanta.2012.12.041
218. Smolskaitė L, Venskutonis PR, Talou T (2015) Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT - Food Science and Technology* 60 (1):462-471. doi:10.1016/j.lwt.2014.08.007

219. Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R (2005) Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochem* 40 (5):1701-1705. doi:10.1016/j.procbio.2004.06.047
220. Gul A, Baig S, Naz M, Nadeem M (2012) Efficient utilization of dairy industry waste for hyper-production and characterization of a novel cysteine protease. *Pakistan JZool* 44 (3):713-721
221. Amadioha AC (1999) Effect of cultural conditions on the growth and amylolytic enzyme production by *Rhizopus oryzae*. *Discov Innov* 11 (1-2):69-73
222. Ray RC (2004) Extracellular amylase(s) production by fungi *Botryodiplodia theobromae* and *Rhizopus oryzae* grown on cassava starch residue. *J Environ Biol* 25 (4):489-495
223. Ghosh B, Ray RR (2011) Extra-cellular isoamylase production by *Rhizopus oryzae* in solid-state fermentation of agro wastes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54 (5):867-876. doi:10.1590/S1516-89132011000500003
224. Saito K, Takakuwa N, Oda Y (2004) Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. *Microbiol Res* 159 (1):83-86. doi:10.1016/j.micres.2004.01.001
225. Hamdy HS (2006) Purification and characterization of the pectin lyase secreted within the macerating fluid of *Rhizopus oryzae* (Went & Prinsen Geerligs) grown on orange peel. *Indian J Biotechnol* 5:284-291
226. Mertens JA, Bowman MJ (2011) Expression and Characterization of Fifteen *Rhizopus oryzae* 99-880 Polygalacturonase Enzymes in *Pichia pastoris*. *Curr Microbiol* 62 (4):1173-1178. doi:10.1007/s00284-010-9842-8
227. Mertens JA, Burdick RC, Rooney AP (2008) Identification, biochemical characterization, and evolution of the *Rhizopus oryzae* 99-880 polygalacturonase gene family. *Fungal Genet Biol* 45 (12):1616-1624. doi:10.1016/j.fgb.2008.09.009
228. Hamdy HS (2005) Purification and characterization of the pectin lyase produced by *Rhizopus oryzae* grown on orange peels. *Annals of microbiology* 55 (3):205-211
229. Murashima K, Nishimura T, Nakamura Y, Koga J, Moriya T, Sumida N, Yaguchi T, Kono T (2002) Purification and characterization of new endo-1,4-beta-D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microb Technol* 30 (3):319-326. doi:10.1016/s0141-0229(01)00513-0
230. Kupski L, Pagnussatt FA, Buffon JG, Furlong EB (2014) Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: production, characterization, and thermal stability. *Appl Biochem Biotechnol* 172 (1):458-468. doi:10.1007/s12010-013-0518-2
231. Karmakar M (2013) Inducing effect of salicin for extracellular endoglucanase synthesis in *Rhizopus oryzae* PR7 MTCC 9642. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 49 (4):391-395. doi:10.1134/S0003683813040078
232. Karmakar M, Ray RR (2011) A statistical approach for optimization of simultaneous production of beta-glucosidase and endoglucanase by *Rhizopus oryzae* from solid-state fermentation of water hyacinth using central composite design. *Biotechnology research international* 2011:574-983. doi:10.4061/2011/574983

233. Pandey AK, Edgard G, Negi S (2016) Optimization of concomitant production of cellulase and xylanase from *Rhizopus oryzae* SN5 through EVOP-factorial design technique and application in Sorghum Stover based bioethanol production. *Renewable Energy* 98:51-56. doi:10.1016/j.renene.2016.05.071
234. Selle PH, Ravindran V, Caldwell A, Bryden WL (2000) Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutrition Research Reviews* 13 (2):255-278. doi:10.1079/095442200108729098
235. Pandey A, Szakacs G, Socol CR, Rodriguez-Leon JA, Socol VT (2001) Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresour Technol* 77 (3):203-214. doi:10.1016/s0960-8524(00)00139-5
236. Ramachandran S, Roopesh K, Nampoothiri KM, Szakacs G, Pandey A (2005) Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. *Process Biochem* 40 (5):1749-1754. doi:10.1016/j.procbio.2004.06.040
237. Rani R, Ghosh S (2011) Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. *Bioresour Technol* 102 (22):10641-10649. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.075
238. Richa R, Sudhir K, Sanjoy G (2014) Optimization of aqueous extraction process to enhance the production of phytase by *Rhizopus oryzae* using response surface methodology coupled with artificial neural network. *African Journal of Biotechnology* 13 (7):874-883. doi:10.5897/ajb2013.11984
239. Suresh S, Radha KV (2015) Effect of a mixed substrate on phytase production by *Rhizopus oligosporus* MTCC 556 using solid state fermentation and determination of dephytinization activities in food grains. *Food Science and Biotechnology* 24 (2):551-559. doi:10.1007/s10068-015-0072-5
240. Suresh S, Radha KV (2016) Statistical optimization and mutagenesis for high level of phytase production by *Rhizopus oligosporus* MTCC 556 under solid state fermentation. *J Environ Biol* 37 (2):253-259
241. Arora S, Dubey M, Singh P, Rani R, Ghosh S (2017) Effect of mixing events on the production of a thermo-tolerant and acid-stable phytase in a novel solid-state fermentation bioreactor. *Process Biochem* 61:12-23. doi:10.1016/j.procbio.2017.06.009
242. Starzynska-Janiszewska A, Stodolak B, Wikiera A (2015) Proteolysis in tempeh-type products obtained with *Rhizopus* and *Aspergillus* strains from grass pea (*Lathyrus sativus*) seeds. *Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria* 14 (2):125-132. doi:10.17306/J.AFS.2015.2.14
243. Kumar CG, Takagi H (1999) Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv* 17 (7):561-594. doi:10.1016/s0734-9750(99)00027-0
244. Maryati Y, Susilowati A, Melanie H, Lotulung PD (2017) Effect of hydrolysis enzymatic process of corn using protease crude (*Rhizopus oligosporus*-C1) to produce corn hydrolysate rich folic acid. In: Tursiloadi S, Rinaldi N (eds) *Proceedings of the 3rd International Symposium on Applied Chemistry*, vol 1904. AIP Conference Proceedings. Amer Inst Physics, Melville. doi:10.1063/1.5011892
245. Sircar G, Saha B, Mandal RS, Pandey N, Saha S, Bhattacharya SG (2015) Purification, cloning and immuno-biochemical characterization of a fungal aspartic protease allergen Rhi o

- 1 from the airborne mold *Rhizopus oryzae*. PLoS One 10 (12). doi:10.1371/journal.pone.0144547
246. Mushtaq Z, Irfan M, Nadeem M, Naz M, Syed Q (2015) Kinetics study of extracellular detergent stable alkaline protease from *Rhizopus oryzae*. Brazilian Archives of Biology and Technology 58 (2):175-184. doi:10.1590/s1516-8913201400071
247. M'hir S, Mejri A, Sifaoui I, Slama MB, Mejri M, Thonart P, Hamdi M (2012) Improvement of protease production by *Rhizopus oryzae* CH4 grown on wheat. Archives of Applied Science Research, 4 (2):1110-1116
248. Hsiao N-W, Chen Y, Kuan Y-C, Lee Y-C, Lee S-K, Chan H-H, Kao C-H (2014) Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. Electron J Biotechnol 17 (2):89-94. doi:10.1016/j.ejbt.2014.02.002
249. Katak JB, Bagade AV, Mahajan SA, Pawar SP, Shouche YS, Prabhune AA (2011) Isolation, identification and optimization of a new extracellular lipase producing strain of *Rhizopus* sp. Appl Biochem Biotechnol 164 (7):969-978. doi:10.1007/s12010-011-9188-0
250. Su F, Li GL, Fan YL, Yan YJ (2015) Enhancing biodiesel production via a synergic effect between immobilized *Rhizopus oryzae* lipase and Novozym 435. Fuel Process Technol 137:298-304. doi:10.1016/j.fuproc.2015.03.013
251. Katak JB, Prabhune AA (2012) Characterization of smallest active monomeric lipase from novel *Rhizopus* strain: application in transesterification. Appl Biochem Biotechnol 166 (7):1769-1780. doi:10.1007/s12010-012-9584-0
252. Barrigon JM, Montesinos JL, Valero F (2013) Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut(+) phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? Biochem Eng J 75:47-54. doi:10.1016/j.bej.2013.03.018
253. Ghattas N, Abidi F, Galai S, Marzouki MN, Ben Salah A (2014) Monoolein production by triglycerides hydrolysis using immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. Int J Biol Macromol 68:1-6. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.04.017
254. Ray J, Nagy ZK, Smith KW, Bhagga K, Stapley AGF (2013) Kinetic study of the acidolysis of high oleic sunflower oil with stearic-palmitic acid mixtures catalysed by immobilised *Rhizopus oryzae* lipase. Biochem Eng J 73:17-28. doi:10.1016/j.bej.2012.12.018
255. Pashangeh K, Akhond M, Karbalaee-Heidari HR, Absalan G (2017) Biochemical characterization and stability assessment of *Rhizopus oryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. Int J Biol Macromol 105:300-307. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.035
256. Jiao LC, Zhou QH, Su ZX, Xu L, Yan YJ (2018) High-level extracellular production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* via a strategy combining optimization of gene-copy number with co-expression of ERAD-related proteins. Protein Expression Purif 147:1-12. doi:10.1016/j.pep.2018.02.005
257. Li DM, Qin XL, Wang JR, Yang B, Wang WF, Huang WL, Wang YH (2015) Hydrolysis of soybean oil to produce diacylglycerol by a lipase from *Rhizopus oryzae*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 115:43-50. doi:10.1016/j.molcatb.2015.01.009
258. Bhanja Dey T, Kuhad RC (2014) Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. Biotechnology reports 4:120-127. doi:10.1016/j.btre.2014.09.006

259. Bhanja Dey T, Kuhad RC (2014) Upgrading the antioxidant potential of cereals by their fungal fermentation under solid-state cultivation conditions. *Lett Appl Microbiol* 59 (5):493-499. doi:10.1111/lam.12300
260. Schmidt CG, Gonçalves LM, Prietto L, Hackbart HS, Furlong EB (2014) Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rhizopus oryzae*. *Food Chem* 146:371-377. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.101
261. Sadh PK, Saharan P, Duhan S, Duhan JS (2017) Bio-enrichment of phenolics and antioxidant activity of combination of *Oryza sativa* and *Lablab purpureus* fermented with GRAS filamentous fungi. *Resource-Efficient Technologies* 3 (3):347-352. doi:10.1016/j.refit.2017.02.008
262. Sadh PK, Saharan P, Duhan JS (2017) Bio-augmentation of antioxidants and phenolic content of *Lablab purpureus* by solid state fermentation with GRAS filamentous fungi. *Resource-Efficient Technologies* 3 (3):285-292. doi:10.1016/j.refit.2016.12.007
263. Shin H-Y, Kim S-M, Lee JH, Lim S-T (2019) Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. *Food Chem* 272:235-241. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.174
264. Christen P, Bramorski A, Revah S, Soccol CR (2000) Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Bioresour Technol* 71 (3):211-215. doi:10.1016/s0960-8524(99)00084-x
265. Guneser O, Demirkol A, Yuceer YK, Togay SO, Hosoglu MI, Elibol M (2017) Production of flavor compounds from olive mill waste by *Rhizopus oryzae* and *Candida tropicalis*. *Braz J Microbiol* 48 (2):275-285. doi:10.1016/j.bjm.2016.08.003
266. Abedinifar S, Karimi K, Khanahmadi M, Taherzadeh MJ (2009) Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass Bioenerg* 33 (5):828-833. doi:10.1016/j.biombioe.2009.01.003
267. Millati R, Edebo L, Taherzadeh MJ (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme Microb Technol* 36 (2-3):294-300. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.09.007
268. Thongchul N, Navankasattusas S, Yang ST (2010) Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess Biosystems Eng* 33 (3):407-416. doi:10.1007/s00449-009-0341-x
269. Taherzadeh M (2003) Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. *Bioresour Technol* 88 (3):167-177. doi:10.1016/s0960-8524(03)00010-5
270. Nitayavardhana S, Khanal SK (2010) Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient. *Bioresour Technol* 101 (23):9078-9085. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.048
271. Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ (2006) Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 40 (1):138-144. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.046
272. FazeliNejad S, Ferreira JA, Brandberg T, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ (2016) Fungal protein and ethanol from lignocelluloses using *Rhizopus* pellets under simultaneous

saccharification, filtration and fermentation (SSFF). *Biofuel Research Journal* 3 (1):372-378. doi:10.18331/brj2016.3.1.7

273. Kasana RC, 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. *Curr Microbiol* 57 (5):503-507. doi:10.1007/s00284-008-9276-8

274. Kurniawati. Titik, Indrati R, Sardjono (2014) Isolation of *Rhizopus oryzae* from rotten fruit and its potency for lactic acid production in glucose medium with and without addition of calcium carbonate. *Agritech* 34 (2):170-176

275. Meteorología y climatología de Navarra. <http://meteo.navarra.es/>. Accessed 2017/07/21

276. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3):426-428. doi:10.1021/ac60147a030

277. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 (8):911-917. doi: 10.1139/o59-099

278. Centro de Investigación y Control de la Calidad. Análisis de alimentos: métodos oficiales y recomendados por el Centro de Investigación y Control de la Calidad (1985). Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

279. AOAC (1996) Fiber (acid detergent) and lignin (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in animal feed.

280. UNE EN ISO. Animal feeding stuffs — Determination of amylase-treated neutral detergent fibre content (aNDF) (2006).

281. BOE. Real Decreto 2257/1994 de 25 de noviembre, por el que se aprueba los métodos oficiales de análisis de piensos o alimentos para animales y sus primeras materias (1994).

282. Waghmare AG, Salve MK, LeBlanc JG, Arya SS (2016) Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing* 3 (1). doi:10.1186/s40643-016-0094-8

283. Zamani A, Edebo L, Sjostrom B, Taherzadeh MJ (2007) Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of *zygomycetes* fungi by dilute sulfuric acid. *Biomacromolecules* 8 (12):3786-3790. doi:10.1021/bm700701w

284. Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci* 66 (5):642-646. doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x

285. Bougherra F, Dilmi-Bouras A, Balti R, Przybylski R, Adoui F, Elhameur H, Chevalier M, Flahaut C, Dhulster P, Naima N (2017) Antibacterial activity of new peptide from bovine casein hydrolyzed by a serine metalloprotease of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* BR16. *Journal of Functional Foods* 32 (Supplement C):112-122. doi:10.1016/j.jff.2017.02.026

286. Connolly A, Piggott CO, FitzGerald RJ (2013) Characterisation of protein-rich isolates and antioxidative phenolic extracts from pale and black brewers' spent grain. *Int J Food Sci Technol* 48 (8):1670-1681. doi:10.1111/ijfs.12137

287. Safi C, Ursu AV, Laroche C, Zebib B, Merah O, Pontalier P-Y, Vaca-Garcia C (2014) Aqueous extraction of proteins from microalgae: effect of different cell disruption methods. *Algal Research* 3:61-65. doi:10.1016/j.algal.2013.12.004



288. Remer DS, Mattos FB (2003) Cost and scale-up factors, international inflation indexes and location factors. *International Journal of Production Economics* 84 (1):1-16. doi:10.1016/S0925-5273(02)00374-2
289. Mendes FB, Ibraim Pires Atala D, Thoméo JC (2017) Is cellulase production by solid-state fermentation economically attractive for the second generation ethanol production? *Renewable Energy* 114:525-533. doi:10.1016/j.renene.2017.07.062
290. Zhang H, Matsuto T (2011) Comparison of mass balance, energy consumption and cost of composting facilities for different types of organic waste. *Waste Manage* 31 (3):416-422. doi:10.1016/j.wasman.2010.09.010
291. Kwan TH, Pleissner D, Lau KY, Venus J, Pommeret A, Lin CSK (2015) Techno-economic analysis of a food waste valorization process via microalgae cultivation and co-production of plasticizer, lactic acid and animal feed from algal biomass and food waste. *Bioresour Technol* 198:292-299. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.003
292. Liaud N, Navarro D, Vidal N, Sigoillot JC, Raouche S (2014) High throughput automated colorimetric method for the screening of L-lactic acid producing microorganisms. *MethodsX* 1:254-257. doi:10.1016/j.mex.2014.10.001
293. Huang L, Wei PL, Zang R, Xu ZN, Cen PL (2010) High-throughput screening of high-yield colonies of *Rhizopus oryzae* for enhanced production of fumaric acid. *Annals of microbiology* 60 (2):287-292. doi:10.1007/s13213-010-0039-y
294. Ciriminna R, Meneguzzo F, Delisi R, Pagliaro M (2017) Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chem Cent J* 11. doi:10.1186/s13065-017-0251-y
295. Abe A, Sone T, Sujaya IN, Saito K, Oda Y, Asano K, Tomita F (2003) rDNA ITS sequence of *Rhizopus oryzae*: its application to classification and identification of lactic acid producers. *Biosci Biotechnol Biochem* 67 (8):1725-1731. doi:10.1271/bbb.67.1725
296. Saito K, Saito A, Ohnishi M, Oda Y (2004) Genetic diversity in *Rhizopus oryzae* strains as revealed by the sequence of lactate dehydrogenase genes. *Arch Microbiol* 182 (1):30-36. doi:10.1007/s00203-004-0691-3
297. Odoni DI, Tamayo-Ramos JA, Sloothaak J, van Heck RGA, dos Santos V, de Graaff LH, Suarez-Diez M, Schaap PJ (2017) Comparative proteomics of *Rhizopus delemar* ATCC 20344 unravels the role of amino acid catabolism in fumarate accumulation. *PeerJ* 5. doi:10.7717/peerj.3133
298. Roa Engel CA, Straathof AJJ, Zijlmans TW, van Gulik WM, van der Wielen LAM (2008) Fumaric acid production by fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 78 (3):379-389. doi:10.1007/s00253-007-1341-x
299. Das RK, Brar SK, Verma M (2016) Application of calcium carbonate nanoparticles and microwave irradiation in submerged fermentation production and recovery of fumaric acid: a novel approach. *RSC Adv* 6 (31):25829-25836. doi:10.1039/c6ra00316h
300. Roa Engel CA, van Gulik WM, Marang L, van der Wielen LA, Straathof AJ (2011) Development of a low pH fermentation strategy for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microb Technol* 48 (1):39-47. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.09.001
301. Naude A, Nicol W (2018) Improved continuous fumaric acid production with immobilised *Rhizopus oryzae* by implementation of a revised nitrogen control strategy. *N Biotechnol* 44:13-22. doi:10.1016/j.nbt.2018.02.012

302. Wang G, Huang D, Li Y, Wen J, Jia X (2015) A metabolic-based approach to improve xylose utilization for fumaric acid production from acid pretreated wheat bran by *Rhizopus oryzae*. *Bioresour Technol* 180:119-127. doi:10.1016/j.biortech.2014.12.091
303. Papadaki A, Papapostolou H, Alexandri M, Kopsahelis N, Papanikolaou S, de Castro AM, Freire DMG, Koutinas AA (2018) Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes. *Environmental science and pollution research international*. doi:10.1007/s11356-018-1791-y
304. Liu H, Ma J, Wang M, Wang W, Deng L, Nie K, Yue X, Wang F, Tan T (2016) Food waste fermentation to fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* RH7-13. *Appl Biochem Biotechnol* 180 (8):1524-1533. doi:10.1007/s12010-016-2184-7
305. Das RK, Brar SK (2014) Enhanced fumaric acid production from brewery wastewater and insight into the morphology of *Rhizopus oryzae* 1526. *Appl Biochem Biotechnol* 172 (6):2974-2988. doi:10.1007/s12010-014-0739-z
306. van Leeuwen J, Rasmussen ML, Sankaran S, Koza CR, Erickson DT, Mitra D, Jin B (2012) Fungal treatment of crop processing wastewaters with value-added co-products. In: Gopalakrishnan K, van Leeuwen J, Brown R (eds) *Sustainable Bioenergy and Bioproducts. Green Energy and Technology*. Springer, London, pp 13-44. doi:10.1007/978-1-4471-2324-8\_2
307. Yunoki K, Musa R, Kinoshita M, Oda Y, Ohnishi M (2004) Determinations of triacylglycerol and fatty acid esters in potato pulp fermented with lactic acid-producing fungus. *Journal of Oil Chemists' Society, Japan* 53 (11):565-569. doi:10.5650/jos.53.565
308. Oda Y, Yajima Y, Kinoshita M, Ohnishi M (2003) Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. *Food Microbiol* 20 (3):371-375. doi:10.1016/s0740-0020(02)00131-4
309. Couto SR, Sanromán MÁ (2006) Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J Food Eng* 76 (3):291-302. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022
310. Budziszewska. J, Wilk. M, Wrzosek. M (2010) Taxonomic revision of the genus *Rhizomucor*. Paper presented at the IMC9: The Biology of Fungi, Edinburgh
311. Kim H-R, Kim J-H, Bai D-H, Ahn B-H (2011) Identification and characterization of useful fungi with alpha-amylase activity from the Korean traditional Nuruk. *Mycobiology* 39 (4):278-282. doi:10.5941/myco.2011.39.4.278
312. Bakir U, Sebnem Y, Ferda G, Aysegul E (2001) An endo-1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme Microb Technol* 29:328-334. doi:10.1016/S0141-0229(01)00379-9
313. Karmakar M, Ray RR (2010) Extra cellular endoglucanase production by *Rhizopus oryzae* in solid and liquid state fermentation of agro wastes. *Asian J Biotechnol* 2 (1):27-32
314. Hamdy HS (2013) Production of mini-food by *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* using orange peels. *Rom Biotech Lett* 18 (1):7929-7946
315. Musa R, Yunoki K, Kinoshita M, Oda Y, Ohnishi M (2004) Increased levels of policosanol and very long-chain fatty acids in potato pulp fermented with *Rhizopus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68 (11):2401-2404. doi:10.1271/bbb.68.2401
316. Massarolo KC, de Souza TD, Ribeiro AC, Furlong EB, de Souza Soares LA (2016) Influence of cultivation *Rhizopus oryzae* on rice bran on lipid fraction: fatty acids and

- phospholipids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8:204-208. doi:10.1016/j.bcab.2016.10.002
317. Verdú JM (2009) Tabla de composición de alimentos. 5 edn. Universidad de Granada, Granada.
318. Vendruscolo F, da Silva Ribeiro C, Esposito E, Ninow JL (2009) Protein enrichment of apple pomace and use in feed for Nile tilapia. *Appl Biochem Biotechnol* 152 (1):74-87. doi:10.1007/s12010-008-8259-3
319. Usaquen SM (2008) Aprovechamiento y valorización del alpeorujo tratado termicamente como: fertilizante biológico y fuente de hidroxitirosol Pontificia Universidad Javeriana, Granada, Spain.
320. Oboh G, Elusiyana CA (2007) Changes in the nutrient and anti-nutrient content of micro-fungi fermented cassava flour produced from low- and medium-cyanide variety of cassava tubers. *African Journal of Biotechnology* 6 (18):2150-2157
321. Oliveira MD, Feddern V, Kupski L, Cicolatti EP, Badiale-Furlong E, de Souza-Soares LA (2011) Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. *Bioresour Technol* 102 (17):8335-8338. doi:10.1016/j.biortech.2011.06.025
322. Devrajan A, Joshi VK, Gupta K, Sheikher C, Lal BB (2004) Evaluation of apple pomace based reconstituted feed in rats after solid state fermentation and ethanol recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47 (1):93-106. doi:10.1590/s1516-89132004000100013
323. Joshi VK, Sandhu DK (1996) Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresour Technol* 56 (2-3):251-255. doi:10.1016/0960-8524(96)00040-5
324. FAO/WHO. Protein advisory group guidelines no.15 on the nutritional and safety aspects of novel sources of protein for animal feeding (1974). Rome.
325. Wu G, Bazer FW, Dai Z, Li D, Wang J, Wu Z (2014) Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond. *Annual review of animal biosciences* 2:387-417. doi:10.1146/annurev-animal-022513-114113
326. Angenent LT, Karim K, Al-Dahhan MH, Wrenn BA, Domínguez-Espinosa R (2004) Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol* 22 (9):477-485. doi:10.1016/j.tibtech.2004.07.001
327. Turner TL, Kim E, Hwang C, Zhang GC, Liu JJ, Jin YS (2017) Short communication: Conversion of lactose and whey into lactic acid by engineered yeast. *J Dairy Sci* 100 (1):124-128. doi:10.3168/jds.2016-11784
328. Zhang Z, Liu D, Feng F, Li J, Li M, Pang Q, Chen K (2013) Optimization of the nutrition for biodegradation of vinasse by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology. *Water Science and Technology* 67 (4):772-779. doi:10.2166/wst.2012.631
329. Ferreira JA, Mahboubi A, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ (2016) Waste biorefineries using filamentous *ascomycetes* fungi: Present status and future prospects. *Bioresour Technol* 215:334-345. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.018
330. Li X, Zhou J, Ouyang S, Ouyang J, Yong Q (2017) Fumaric acid production from alkali-pretreated corncob by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation combined

with separated hydrolysis and fermentation at high solids loading. *Appl Biochem Biotechnol* 181 (2):573-583. doi:10.1007/s12010-016-2232-3

331. Zheng Y, Wang Y, Zhang J, Pan J (2016) Using tobacco waste extract in pre-culture medium to improve xylose utilization for L-lactic acid production from cellulosic waste by *Rhizopus oryzae*. *Bioresour Technol*. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.071

332. Vaseghi Z, Najafpour GD, Mohseni S, Mahjoub S (2013) Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: solid state fermentation in a tray bioreactor. *Int J Food Sci Tech* 48 (2):283-289. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03185.x

333. Thadathil N, Velappan SP (2014) Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: a review. *Food Chem* 150:392-399. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.083

334. Souza Filho PF, Zamani A, Taherzadeh MJ (2017) Production of edible fungi from potato protein liquor (PPL) in airlift bioreactor. *Fermentation* 3 (12). doi:10.3390/fermentation3010012

335. Souza Filho PF, Zamani A, Taherzadeh MJ (2018) Edible protein production by filamentous fungi using starch plant wastewater. *Waste and Biomass Valorization*. doi:10.1007/s12649-018-0265-2

336. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Estimación de precios de piensos: Mayo 2016 (Semanas 18 a 21) (2016). Gobierno de España.

337. Büyükkileci AO (2007) Investigation of sugar metabolism in *Rhizopus oryzae*. Middle East technical university

338. Gajdhane SB, Bhagwat PK, Dandge PB (2016) Statistical media optimization for enhanced production of  $\alpha$ -galactosidase by a novel *Rhizopus oryzae* strain SUK. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8:301-309. doi:10.1016/j.bcab.2016.08.016

339. Anderson JM, Whitcomb JP (2004) RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments. New York. doi:10.4324/9781482293777

340. Liu Y, Liao W, Chen S (2008) Co-production of lactic acid and chitin using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* cultured on cull potatoes and glucose. *J Appl Microbiol* 105 (5):1521-1528. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03913.x

341. Ye X, Yoshida S, Ng TB (2000) Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin B and  $\beta$ -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32 (11):1143-1150. doi:10.1016/S1357-2725(00)00063-7

342. Ibarruri J, Hernández I (2018) *Rhizopus oryzae* as fermentation agent in food derived sub-products. *Waste and Biomass Valorization* 9 (11):2107-2115. doi:10.1007/s12649-017-0017-8

343. Innes JK, Calder PC (2018) Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 132:41-48. doi:10.1016/j.plefa.2018.03.004

344. Guerzoni ME, Lanciotti R, Cocconcelli PS (2001) Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology-(UK)* 147:2255-2264. doi:10.1099/00221287-147-8-2255

345. National Research Council. Composition of feed ingredients (1998). In: Nutrient requirements of swine. The National Academies Press, Wasington DC, USA, pp 124-142. doi:10.17226/6016
346. Oliva-Teles A (2012) Nutrition and health of aquaculture fish. J Fish Dis 35 (2):83-108. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x
347. Edebo L (2009) *Zygomycetes* for fish feed. EE.UU. Patent N° 20090136617.
348. FEDNA. Tablas de ingredientes para piensos: harina de pescado 70/9/13. [http://fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_piensos/harina-de-pescado-70913](http://fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-pescado-70913). Accessed 2018/11/18
349. FEDNA. Tablas de ingredientes para piensos: Harina de soja 44% PB. [http://fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_piensos/harina-de-soja-44-pb](http://fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-soja-44-pb). Accessed 2018/11/18
350. Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC (2006) Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. Journal of Cereal Science 43 (1):1-14. doi:10.1016/j.jcs.2005.06.001
351. Santos M, Jiménez JJ, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C, del Nozal MJ (2003) Variability of brewer's spent grain within a brewery. Food Chem 80 (1):17-21. doi:10.1016/S0308-8146(02)00229-7
352. Ozturk S, Ozboy O, Cavidoglu I, Koksel H (2002) Effects of brewer's spent grain on the quality and dietary fibre content of cookies. J Inst Brew 108 (1):23-27
353. Weger A, Jung R, Stenzel F, Hornung A (2017) Optimized energetic usage of brewers' spent grains. Chemical Engineering & Technology 40 (2):306-312. doi:10.1002/ceat.201600186
354. Russ W, Mörtel H, Meyer-Pittroff R (2005) Application of spent grains to increase porosity in bricks. Construction and Building Materials 19 (2):117-126. doi:10.1016/j.conbuildmat.2004.05.014
355. Mishra PK, Gregor T, Wimmer R (2017) Utilising brewer's spent grain as a source of cellulose nanofibres following separation of protein-based biomass. Bioresources 12 (1):107-116. doi:10.15376/biores.12.1.107-116
356. Chiang PC, Chang P, You JH (1992) Innovative technology for controlling VOC emissions. J Hazard Mater 31 (1):19-28. doi:10.1016/0304-3894(92)87036-f
357. Almeida AD, Geraldo MRF, Ribeiro LF, Silva MV, Maciel M, Haminiuk CWI (2017) Bioactive compounds from brewer's spent grain: phenolic compounds, fatty acids and *in vitro* antioxidant capacity. Acta Sci-Technol 39 (3):269-277. doi:10.4025/actascitechnol.v39i3.28435
358. Radosavljevic M, Pejin J, Kocic-Tanackov S, Mladenovic D, Djukic-Vukovic A, Mojovic L (2018) Brewers' spent grain and thin stillage as raw materials in L-(+)-lactic acid fermentation. J Inst Brew 124 (1):23-30. doi:10.1002/jib.462
359. Gregori A, Švagelj M, Pahor B, Berovič M, Pohleven F (2008) The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. N Biotechnol 25 (2):157-161. doi:10.1016/j.nbt.2008.08.003

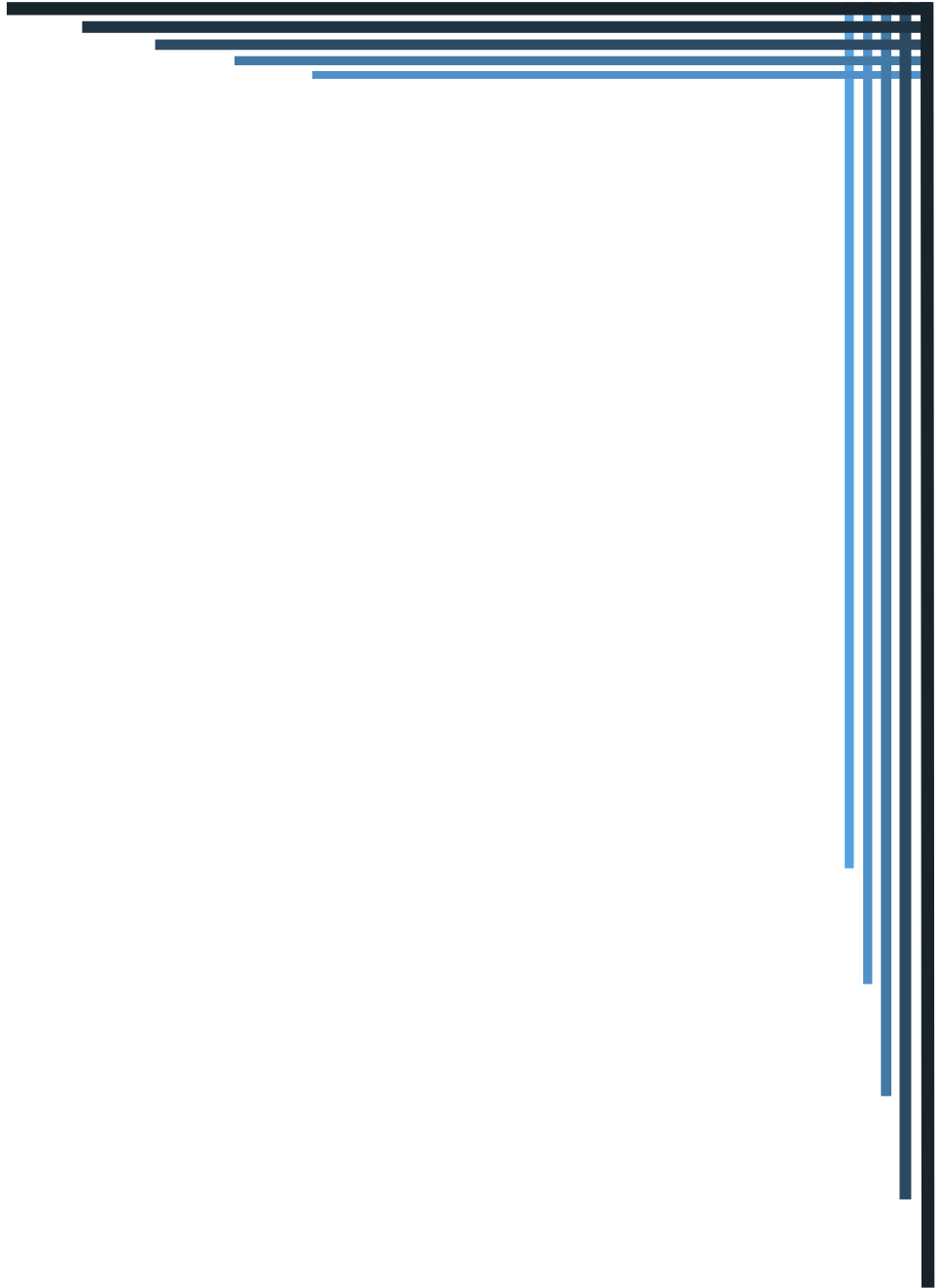
360. Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A (2005) Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem* 40 (8):2689-2694. doi:10.1016/j.procbio.2004.12.001
361. Rajesh N, Imelda J, Raj RP (2010) Value addition of vegetable wastes by solid-state fermentation using *Aspergillus niger* for use in aquafeed industry. *Waste Manag* 30 (11):2223-2227. doi:10.1016/j.wasman.2009.12.017
362. Ajila CM, Gassara F, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valéro JR (2012) Polyphenolic antioxidant mobilization in apple pomace by different methods of solid-state fermentation and evaluation of its antioxidant activity. *Food and Bioprocess Technology* 5 (7):2697-2707. doi:10.1007/s11947-011-0582-y
363. Fruet APB, Stefanello FS, Rosado Júnior AG, Souza ANMd, Tonetto CJ, Nörnberg JL (2016) Whole grains in the finishing of culled ewes in pasture or feedlot: performance, carcass characteristics and meat quality. *Meat Science* 113:97-103. doi:10.1016/j.meatsci.2015.11.018
364. Paraskevakis N (2015) Effects of dietary dried Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) supplementation on blood and milk enzymatic antioxidant indices, on milk total antioxidant capacity and on productivity in goats. *Anim Feed Sci Technol* 209:90-97. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.09.001
365. Castillo C, Pereira V, Abuelo A, Hernandez J (2013) Effect of supplementation with antioxidants on the quality of bovine milk and meat production. *The Scientific World Journal* 2013:616098. doi:10.1155/2013/616098
366. Wang D, Sakoda A, Suzuki M (2001) Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresour Technol* 78 (3):293-300. doi:10.1016/S0960-8524(01)00002-5
367. Correia RTP, McCue P, Magalhães MMA, Macêdo GR, Shetty K (2004) Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochem* 39 (12):2167-2172. doi:10.1016/j.procbio.2003.11.034
368. FEDNA. Fibra neutro detergente, Ácido detergente Y Lignina (FND,FAD,LAD secuenciales). [http://fundacionfedna.org/tecnicas\\_de\\_analisis/fibra-neutro-detergente-%C3%A1cido-detergente-y-lignina-fndfadlad-secuenciales](http://fundacionfedna.org/tecnicas_de_analisis/fibra-neutro-detergente-%C3%A1cido-detergente-y-lignina-fndfadlad-secuenciales). Accessed 2018/09/30
369. Kaur V (2004) Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps. *Bioresour Technol* 91 (1):101-104. doi:10.1016/s0960-8524(03)00073-7
370. Wei D, Li M, Zhang X, Ren Y, Xing L (2004) Identification and characterization of a novel delta12-fatty acid desaturase gene from *Rhizopus arrhizus*. *FEBS Lett* 573 (1-3):45-50. doi:10.1016/j.febslet.2004.06.100
371. Wadhwa M, Bakshi MPS, Makkar HPS (2015) Waste to worth: fruit wastes and by-products as animal feed. *CAB Reviews* 10 (31):1-26. doi:10.1079/PAVSNNR201510031
372. Bakshi MPS, Wadhwa M, Makkar HPS (2016) Waste to worth: vegetable wastes as animal feed. *CAB Reviews* 11 (12):1-26. doi:10.1079/PAVSNNR201611012
373. Collins English Dictionary. HarperCollins. <https://www.collinsdictionary.com/dictionary/english/bioconversion>. Accessed 2018/09/02

374. Adams A, Demyttenaere JCR, De Kimpe N (2003) Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum*— investigation of the culture conditions. Food Chem 80 (4):525-534. doi:10.1016/S0308-8146(02)00322-9
375. Badee AZM, Helmy SA, Morsy NFS (2011) Utilisation of orange peel in the production of  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202). Food Chem 126 (3):849-854. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.046
376. FEDNA. Tablas de ingredientes para piensos: cebada 2C nacional 11,3% PB (rev. Nov. 2016). <http://fundacionfedna.org/node/368>. Accessed 2018/11/24
377. FEDNA. Tablas de ingredientes para piensos: Maíz nacional (rev. Nov. 2016). <http://fundacionfedna.org/node/370>. Accessed 2018/11/24
378. FEDNA. Tablas de ingredientes para piensos: trigo duro nacional (rev. Nov. 2016). <http://fundacionfedna.org/node/378>. Accessed 2018/11/24
379. FEDNA. Cascarilla de avena. FEDNA. [http://fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_pensos/cascarilla-de-avena](http://fundacionfedna.org/ingredientes_para_pensos/cascarilla-de-avena). 2018/11/10
380. FEDNA. Paja de cereales (trigo y cebada). [http://fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_pensos/paja-de-cereales-trigo-y-cebada](http://fundacionfedna.org/ingredientes_para_pensos/paja-de-cereales-trigo-y-cebada). 2018/11/10
381. Chouinard PY, Girard V, Brisson GJ (1997) Lactational response of cows to different concentrations of calcium salts of canola oil fatty acids with or without bicarbonates. J Dairy Sci 80 (6):1185-1193. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76046-6
382. DePeters EJ, Cant JP (1992) Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A Review. J Dairy Sci 75 (8):2043-2070. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)77964-8
383. Benhissi H, García-Rodríguez A, Beltrán de Heredia I (2014) Effect of type and inclusion level of cold-pressed oilseed cakes on *in vitro* rumen fermentation. Animal Production Science 54 (10):1709-1713. doi:10.1071/AN14258
384. Chen HZ, He Q (2013) A novel structured bioreactor for solid-state fermentation. Bioprocess Biosystems Eng 36 (2):223-230. doi:10.1007/s00449-012-0778-1
385. Levis JW, Barlaz MA (2013) Composting process model documentation. NC State University.
386. Preciogas. <https://preciogas.com/faq/precio-kwh>. Accessed 2018/11/28
387. Tarifaluzhora. <https://tarifaluzhora.es/>. Accessed 2018/11/28
388. Yilmaz Balaman Ş, Selim H (2014) Multiobjective optimization of biomass to energy supply chains in an uncertain environment. In: Klemeš JJ, Varbanov PS, Liew PY (eds) Computer Aided Chemical Engineering, vol 33. Elsevier, pp 1267-1272. doi:10.1016/B978-0-444-63455-9.50046-5
389. Shahidi F, Zhong Y (2008) Bioactive peptides. J AOAC Int 91 (4):914-931
390. Saltarelli R, Ceccaroli P, Iotti M, Zambonelli A, Buffalini M, Casadei L, Vallorani L, Stocchi V (2009) Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. Food Chem 116 (1):143-151. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.023

391. Ashok A, Kumar DS (2017) Different methodologies for sustainability of optimization techniques used in submerged and solid state fermentation. *3 Biotech* 7 (5):301. doi:10.1007/s13205-017-0934-z
392. Tasar OC, Erdal S, Taskin M (2016) Chitosan production by psychrotolerant *Rhizopus oryzae* in non-sterile open fermentation conditions. *International journal of biological macromolecules* 89:428-433. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.05.007
393. Xu Q, Liu Y, Li S, Jiang L, Huang H, Wen J (2016) Transcriptome analysis of *Rhizopus oryzae* in response to xylose during fumaric acid production. *Bioprocess Biosyst Eng* 39 (8):1267-1280. doi:10.1007/s00449-016-1605-x



## 8. SUPPLEMENTARY MATERIAL





Valorization of cheese whey and orange molasses for fungal biomass production by submerged fermentation with *Rhizopus* sp.

Supplementary material Table 1. Experimental conditions tested for model development.

Run	pH	Glucose (g/l)	Nitrogen (g/l)	Time (days)
1	6.25	37.5	2.25	3
2	6.25	82.5	2.25	3
3	6.25	7.5	2.25	3
4	5.5	60	3	2
5	5.5	60	1.5	2
6	7	60	3	4
7	6.25	37.5	3.75	3
8	6.25	37.5	2.25	3
9	7	15	3	2
10	6.25	37.5	2.25	1
11	5.5	60	3	4
12	7	15	1.5	4
13	7	60	1.5	2
14	6.25	37.5	2.25	5
15	7	60	1.5	4
16	5.5	60	1.5	4
17	6.25	37.5	0.75	3
18	5.5	15	1.5	4
19	7	15	3	4
20	5.5	15	3	4
21	7	15	1.5	2
22	5.5	15	3	2
23	6.25	37.5	2.25	3
24	4.75	37.5	2.25	3
25	5.5	15	1.5	2
26	7.75	37.5	2.25	3
27	7	60	3	2

Supplementary material Table 2. Observed and predicted results of CCRD for studied variables. Biomass (g/l), biomass yield (g/g consumed glucose), protein (% DM), chitosan (% DM), fumaric acid (g/l), glucose consumption (%).

	Biomass		Biomass yield		Protein		Chitosan		Fumaric acid		Glucose consumption	
	Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs	Pre	Obs
1	5.83	5.29	0.20	0.17	31.3	32.8	1.92	1.53	2.00	1.78	88.8	82.4
2	5.93	5.33	0.15	0.12	32.0	33.1	1.89	1.72	0.74	0.66	63.9	56.2
3	3.73	3.19	0.37	0.43	41.1	41.6	2.54	1.38	0.01	0.08	105.4	98.1
4	6.78	7.36	0.19	0.16	24.1	24.1	1.64	2.18	0.56	0.9	61.3	77.9
5	4.43	5.26	0.15	0.20	32.6	26.5	1.36	1.25	0.72	0.58	46.8	45.0
6	8.08	9.35	0.12	0.17	30.8	33.9	3.52	3.48	2.93	2.88	88.0	93.1
7	70.4	7.2	0.21	0.21	39.6	40.5	2.85	2.74	0.78	0.64	84.9	89.7
8	5.83	6.66	0.20	0.21	31.3	31.4	1.92	2.29	2.00	2.13	88.8	84.9
9	3.31	2.45	0.23	0.17	49.8	55.4	3.71	3.31	0.24	0.29	96.0	98.2
10	3.84	3.65	0.15	0.24	42.5	45.5	2.94	1.19	1.04	0.47	61.0	40.9
11	7.39	7.12	0.09	0.14	31.6	30.0	3.47	1.84	2.59	2.50	88.0	83.6
12	5.25	5.21	0.37	0.35	28.1	32.9	3.78	3.76	0.87	0.56	101.6	99.7
13	4.09	4.36	0.12	0.09	41.4	47.6	1.95	2.04	1.72	2.11	59.8	82.4
14	7.83	6.56	0.25	0.18	36.6	35.0	3.95	5.02	2.97	3.38	94.8	99.8
15	6.07	5.4	0.11	0.11	27.9	27.5	3.78	3.54	2.94	2.71	86.5	80.8
16	6.42	7.6	0.13	0.15	28.7	27.7	3.19	4.07	2.25	2.23	73.5	82.5
17	4.63	3.5	0.19	0.19	28.4	28.7	3.47	2.89	1.15	1.24	68.9	49.0
18	6.71	8.27	0.48	0.56	28.9	26.9	2.31	1.48	0.64	ND	88.6	99.2
19	5.31	5.01	0.34	0.34	47.8	50.5	2.89	3.21	0.66	0.82	103.1	99.0
20	5.74	5.79	0.40	0.39	48.6	45.1	1.95	2.05	0.77	0.41	103.1	99.5
21	1.88	2.45	0.16	0.17	41.5	38.7	4.61	6.4	0.95	1.06	94.4	98.7
22	3.74	4.93	0.29	0.33	41.0	35.0	2.78	3.51	0.04	0.29	96.0	98.1
23	5.83	6.15	0.20	0.17	31.3	29.6	1.92	2.59	2.00	2.17	88.8	94.1
24	6.22	4.66	0.24	0.18	23.9	33.6	1.62	1.98	2.02	ND	82.3	69.3
25	3.34	2.62	0.28	0.18	32.7	32.1	3.13	3.41	0.41	0.48	81.4	98.3
26	5.45	6.6	0.16	0.18	31.9	23.4	3.14	2.1	2.91	2.86	95.3	98.3
27	7.47	6.21	0.22	0.20	32.9	29.5	1.69	2.96	1.22	1.24	61.4	59.0

Pre: predicted; obs: observed; ND: not determined.

Solid state fermentation of Brewer's spent grain using *Rhizopus* sp. to enhance nutritional value.

Supplementary material Figure 1. Fermentation evolution in BSG



Figure 1a. Day 0 unfermented BSG.



Figure 1b. 72 h of BSG fermentation.

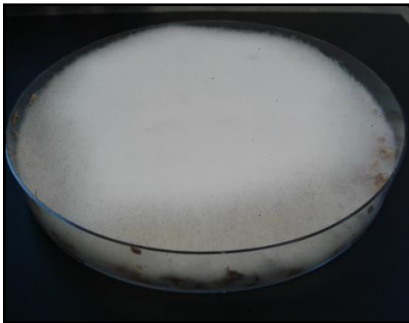


Figure 1c. 120 h of BSG fermentation.



Figure 1d. 144 h of BSG fermentation.



Figure 1e. 168 h of BSG fermentation.



Figure 1f. 192 h of BSG fermentation.

