



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**LIBERACIÓN DE ARABINOXILANOS A PARTIR DE MASILLA
DE CERVECERÍA APLICANDO TRATAMIENTO DE
EXTRUSIÓN Y FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON
UNA CEPA DE *Fusarium oxysporum***

Por:

Joel Gerardo Cervantes Ramírez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

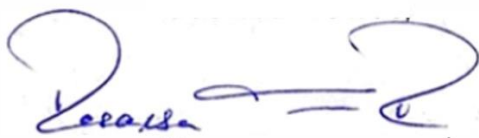
Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de Joel Gerardo Cervantes Ramírez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



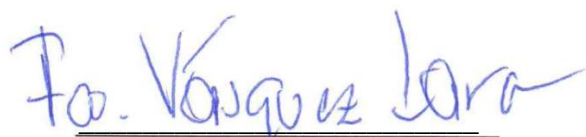
Dra. Alma Rosa Islas Rubio
Directora de Tesis



Dr. Erick Heredia Olea
Co-director de Tesis



Dra. Rosalba Troncoso Rojas
Integrante del comité de tesis



Dr. Francisco Vásquez Lara
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Liberación de Arabinoxilanos a partir de Masilla de Cervecería Aplicando Tratamiento de Extrusión y Fermentación en Estado Sólido con una Cepa de *Fusarium oxysporum*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Joel Gerardo Cervantes Ramírez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por su apoyo económico brindado durante el posgrado, al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por brindarme la oportunidad de desarrollarme académicamente durante estos 2 años. A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) por facilitarme el uso de los equipos en distintos laboratorios, de igual manera al Instituto Tecnológico y Estudios Superiores de Monterrey campus Monterrey (ITESM).

A la Dra. Alma Rosa Islas Rubio por aceptarme y apoyarme en el desarrollo de este trabajo, pero sobre todo gracias por preocuparse por mi estado de salud, tanto física como emocional. A la Dra. Rosalba Troncoso Rojas por apoyarme con el uso de equipos de su laboratorio y por siempre brindarme muy buenas recomendaciones en cada reunión de comité. Al Dr. Francisco Vásquez Lara por sus retroalimentaciones en cada reunión de comité y por el tiempo dedicado a la revisión de tesis.

Muchas gracias al doctor Erick Heredia Olea, por haberme aceptado bajo su cargo de codirección, por siempre estar al pendiente y confiar en mí. Por todos los problemas y dificultades que afronte en el ITESM no se hubieran resuelto sin su apoyo y dedicación. Agradezco mucho la amistad que me brindó, el conocimiento, las interminables correcciones que le hizo a mis escritos y presentaciones y especialmente, las risas que compartimos.

Al Dr. Sergio Serna le agradezco profundamente, por darme la motivación de seguir superándome en mi profesión académica. Gracias por apoyarme y guiarme en mis estudios, no solo por ser la persona tan brillante que es, sino por esa calidez que tiene y muy pocas personas cuentan con ella.

Muchas gracias a mis padres, Gerardo Cervantes y Claudia Ramírez. Por su amor, esfuerzo, perseverancia y buen ejemplo me criaron y me formaron para ser la persona que hoy soy. Nunca tendré las palabras para decirles lo mucho que los amo y lo agradecido que estoy por tenerlos a ambos, tanto por estar en mis logros como por apoyarme siempre que he tropezado y caído. Les

debo todo. Gracias por esperar el tiempo que realice mis estudios lejos de ustedes.

A mi hermana Anna Cervantes, por apoyarme en mis decisiones, por siempre estar en el momento que más la necesitaba, por siempre escucharme. Estoy feliz de contar con mi hermana ya que para mí es un ejemplo a seguir, a pesar de la distancia que estemos uno del otro nuestro amor y cariño siempre permanecerán, y de igual manera agradezco a su esposo Zvonimir por cuidar y preocuparse por ella, definitivamente es una persona que tiene mi respeto y confianza.

Agradezco a todos y a cada uno de mis amigos (Adrián, Cecilia, José, Karla, Mary, Valeria), estoy completamente agradecido por apoyarme, preocuparse y estar al pendiente de mí. Mas allá de compartir los estudios les agradezco por su amistad que me dieron durante estos dos años. Atesoro mucho nuestra amistad y las risas compartidas, definitivamente espero verlos triunfar a cada uno de ustedes y poder vernos dentro de poco tiempo.

A todos mis familiares y amigos cercanos que desde Monterrey me brindaron su apoyo.

Por último y no por menos importante quiero agradecerme a mí mismo por seguir creyendo en mí, que, a pesar de estar cerca de declinar del posgrado seguí confiando en mí, fue un proceso difícil, pero sin duda me conocí más. Gracias Joel por insistir, persistir, resistir y no desistir.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi familia y a las futuras generaciones que tengan el espíritu de seguir aprendiendo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Producción y Proceso Cervecerero	17
2.1.1 Masilla de Cervecería	18
2.1.2 Composición Química de la Masilla de Cervecería	18
2.1.2.1 Celulosa	19
2.1.2.2 Hemicelulosa	19
2.1.2.3 Lignina	20
2.1.2.4 Proteína	20
2.1.2.5 Lípidos, Vitaminas y Minerales	21
2.1.3 Deterioro y Preservación de la Masilla de Cervecería	21
2.1.4 Usos y Aplicaciones de la Masilla de Cervecería	22
2.2 Fibra Dietaria y sus Beneficios en la Salud Humana	22
2.2.1 Clasificación de la Fibra Dietaria	22
2.2.2 Arabinoxilanos y sus Características Estructurales	23
2.2.3 Beneficios a la Salud que Promueven los Arabinoxilanos	25
2.2.3.1 Prebiótico	26
2.2.3.2 Antioxidante	26
2.3 Métodos Utilizados para la Degradación de Material Lignocelulósico y Extracción de Compuestos	27
2.3.1 Químicos	27
2.3.1.1 Extracción con Soluciones Alcalinas	28
2.3.1.2 Extracción con Soluciones Ácidas	28
2.3.2 Enzimáticos	29
2.3.2.1 Xilanasas	29
2.3.3 Físicos	31
2.3.3.1 Molienda	31
2.3.3.2 Extracción con Agua	32
2.3.3.3 Autohidrólisis	32

CONTENIDO (Continuación)

2.3.3.4 Irradiación por Microondas	32
2.3.3.5 Extracción Asistida por Ultrasonido	33
2.3.3.6 Extracción por Extrusión	33
2.3.4 Biológicos	34
2.4 <i>Fusarium oxysporum</i>	35
2.4.1 Filogenia de <i>Fusarium oxysporum</i>	35
2.4.2 Producción de Enzimas Lignocelulósicas.....	36
2.5 Sistemas de Fermentación	36
2.5.1 Fermentación Sumergida	37
2.5.2 Fermentación en Estado Sólido	37
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo General	40
4.2 Objetivos Específicos	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1 Caracterización Química de la Masilla de Cervecería, Determinación de Distribución de Tamaño de Partículas y Absorción y Solubilidad en Agua	41
5.1.1 Composición Química de Masilla de Cervecería	41
5.1.2 Distribución de Tamaño de Partículas de Masilla de Cervecería.....	42
5.1.3 Índice de Absorción y Solubilidad en Agua de Masilla de Cervecería	42
5.2 Tratamientos Físicos de Molienda y Extrusión	43
5.2.1 Molienda	43
5.2.2 Proceso de Extrusión	43
5.3 Proceso de Fermentación en Estado Sólido con una Cepa de <i>Fusarium oxysporum</i> <i>f. sp. melonis</i>	44
5.3.1 Condiciones de Inóculo.....	44
5.3.2 Proceso de Fermentación en Estado Sólido	44
5.4 Cuantificación de Arabinosilanos Solubles Extraídos de la Masilla de Cervecería.....	45
5.4.1 Extracción y Purificación de Arabinosilanos Solubles	45
5.4.2 Determinación de Arabinosilanos	46
5.5 Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales, Ácidos Fenólicos y Capacidad Antioxidante.....	47
5.5.1 Extracción de Compuestos Fenólicos Libres	47
5.5.2 Extracción de Compuestos Fenólicos Ligados	48
5.5.3 Compuestos Fenólicos Totales	48
5.5.4 Ácidos Fenólicos por HPLC	49
5.5.5 Capacidad Antioxidante por DPPH.....	49
5.6 Diseño Experimental y Análisis Estadístico	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.1 Masilla de Cervecería Tratada por Procesos de Molienda y Extrusión	52
6.1.1 Proceso de Secado en la Masilla de Cervecería	52

CONTENIDO (Continuación)

6.1.2	Proceso de Molienda en la Masilla de Cervecería.....	52
6.1.3	Proceso de Extrusión en la Masilla de Cervecería	53
6.2	Composición Química de la Masilla de Cervecería.....	53
6.2.1	Cuantificación de Carbohidratos Estructurales	53
6.2.2	Contenido de Humedad.....	54
6.2.3	Contenido de Cenizas	54
6.2.4	Contenido de Lípidos.....	55
6.2.5	Contenido de Proteínas	55
6.2.6	Contenido de Fibra Dietaria Insoluble, Soluble y Total	56
6.3	Caracterización Física de la Masilla de Cervecería	58
6.3.1	Distribución de Tamaño de Partículas	58
6.3.2	Índices de Absorción y Solubilidad en Agua	59
6.4	Proceso de Fermentación en Estado Sólido.....	61
6.4.1	Fermentación en Estado Sólido con una Cepa de <i>Fusarium oxysporum f. sp. melonis</i>	61
6.5	Cuantificación de Arabinosilanos Solubles	64
6.5.1	Contenido de Arabinosilanos Solubles en los Extractos de la Masilla de Cervecería	64
6.5.2	Rendimiento de Arabinosilanos Solubles en los Extractos de la Masilla de Cervecería	66
6.6	Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales, Ácidos Fenólicos y Capacidad Antioxidante en Masilla de Cervecería	68
6.6.1	Compuestos Fenólicos Totales	68
6.6.2	Ácidos Fenólicos	70
6.6.3	Capacidad Antioxidante por DPPH.....	74
7.	CONCLUSIONES	76
8.	RECOMENDACIONES	77
9.	REFERENCIAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Composición típica de la masilla de cervecería.....	19
2. Principales componentes de la lignina	20
3. Posición de arabinosa en arabinosilanos	25
4. Enzimas hidrolíticas que actúan sobre los arabinosilanos y sus sitios de acción.....	30
5. Distribución de tamaño de partículas de la masilla de cervecería sin tratamiento (MC), masilla de cervecería molida (MCM) y masilla de cervecería extruida (MCE)	59
6. Fermentación en estado sólido de masilla de cervecería con una cepa de <i>Fusarium oxysporum f. sp. meloni</i> . (A) Masilla de cervecería sin tratamiento (MC), (B) Masilla de cervecería molida (MCM) y (C) Masilla de cervecería extruida (MCE)	61
7. Actividad de agua a lo largo de la cinética de fermentación de la masilla de cervecería sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecería molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecería extruida fermentada (MCEF), por <i>Fusarium oxysporum</i> durante 24 h, 48 h, 72, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h	63
8. Contenido de arabinosilanos solubles en los extractos de la masilla de cervecería sin tratamiento (MC), masilla de cervecería molida (MCM) y masilla de cervecería extruida (MCE), fermentada con <i>Fusarium oxysporum</i> durante 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h	65
9. Rendimiento de arabinosilanos solubles de la masilla de cervecería sin tratamiento (MC), masilla de cervecería molida (MCM) y masilla de cervecería extruida (MCE), fermentada con <i>Fusarium oxysporum</i> durante 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Contenido de arabinoxilanos de varios cereales y subproductos de cereales.....	24
2. Rendimiento de extracción de arabinoxilanos de algunos cereales mediante tratamiento enzimático	31
3. Principales hallazgos del efecto de extrusión de fibra dietética y solubilidad de arabinoxilanos	34
4. Microorganismos utilizados para tratamiento biológico de residuos agroindustriales	35
5. Características y ventajas de la fermentación en estado sólido	38
6. Diseño experimental.....	51
7. Lista de tratamientos y códigos de muestras	51
8. Cuantificación de los carbohidratos estructurales de la masilla de cervecería sin tratamiento (MC)	54
9. Composición química de la masilla de cervecería sin tratamiento (MC), masilla de cervecería molida (MCM) y masilla de cervecería extruida (MCE).....	57
10. Índices de absorción de agua y solubilidad en agua en la masilla de cervecería sin tratamiento (MC), masilla de cervecería molida (MCM) y masilla de cervecería extruida (MCE).	60
11. Contenido de compuestos fenólicos totales de la masilla de cervecería sin tratamiento (MC), masilla de cervecería molida (MCM), masilla de cervecería extruida (MCE) y masilla de cervecería sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecería molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecería extruida fermentada (MCEF) por <i>Fusarium oxysporum</i> durante 48 h y 96 h.....	70
12. Contenido de ácido cafeico en masilla de cervecería sin tratamiento (MC), masilla de cervecería molida (MCM), masilla de cervecería extruida (MCE) y masilla de cervecería sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecería molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecería extruida fermentada (MCEF) por <i>Fusarium oxysporum</i> durante 48 h y 96 h.....	72
13. Contenido de ácido p-cumárico en masilla de cervecería sin tratamiento (MC), masilla de cervecería molida (MCM), masilla de cervecería extruida (MCE) y masilla de cervecería sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecería molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecería extruida fermentada (MCEF) por <i>Fusarium oxysporum</i> durante 48 h y 96 h.	73
14. Contenido de ácido ferúlico en masilla de cervecería sin tratamiento (MC), masilla de cervecería molida (MCM), masilla de cervecería extruida (MCE) y masilla de cervecería sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecería molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecería extruida fermentada (MCEF)	

por *Fusarium oxysporum* durante 48 h y 96 h..... 73

15. Actividad antioxidante de extractos fenólicos determinada por el ensayo de DPPH de la masilla de cervecería sin tratamiento, molida, extruida y masilla de cervecería fermentada sin tratamiento, molida y extruida, por *Fusarium oxysporum* durante 48 y 96 h 75

RESUMEN

México genera anualmente más de 2 millones de t de masilla de cervecería (MC). La MC es un material rico en hemicelulosa compuesta de arabinosilanos (AX). Sin embargo, el alto entrecruzamiento de este material provoca una baja disponibilidad de AX, por lo que es necesario aplicar distintos tratamientos para incrementar su liberación. El objetivo de este trabajo fue mejorar la liberación de arabinosilanos por medio de fermentación en estado sólido con la cepa *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* utilizando masilla de cervecería tratada por extrusión. Primeramente, se realizaron dos tipos de tratamientos físicos a la MC, extrusión a 20% de humedad, 200 rpm y 50°C (MCE), y el segundo por molienda utilizando un molino de cuchillas (MCM). A cada una de las muestras (MC, MCE y MCM) se le determinó análisis proximal, distribución de tamaño de partículas, índice de absorción en agua (WAI) y solubilidad en agua (WSI). Posteriormente, se llevó el proceso de fermentación en estado sólido (FES) a cada una de las muestras, se realizó una cinética de fermentación durante 7 días a 30°C. Concluida la FES se llevó a cabo la extracción y purificación de los AX para ser determinados mediante el ensayo colorimétrico de floroglucinol, por último, se cuantificaron los compuestos fenólicos totales, ácidos fenólicos y la capacidad antioxidante por ensayo DPPH. Los datos obtenidos del contenido de proteína, lípidos, ceniza y fibra dietaria total no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre cada una de las muestras, en donde si existió diferencia significativa ($p \leq 0.05$) fue en el contenido de fibra soluble e insoluble, distribución de tamaño de partículas, WAI y WSI, siendo la MCE y MCM las que presentaron valores mayores comparados con la MC. Por otra parte, los rendimientos de AX solubles presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) tanto para los tratamientos sin proceso de FES (MC 0.03%, 0.53 MCM% y 0.70% MCE), como a los que si se les realizó la FES (MC 2.95%, 6.24% MCM y 9.58% MCE). Además, las muestras sometidas al proceso de FES presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de compuestos fenólicos libres, ácidos fenólicos libres y el porcentaje de inhibición de los extractos libres por el ensayo de DPPH con respecto a aquellas que no fueron sometidas a FES. Por lo que el tratamiento de extrusión y FES incrementó la liberación de AX extraídos a partir de la MC, así como su capacidad antioxidante.

Palabras claves: Masilla de cervecería, arabinosilanos, extrusión, fermentación en estado sólido, *Fusarium oxysporum*

ABSTRACT

Mexico, generates more than 2 million t of brewer's spent grain (BSG) per year. BSG is a material rich in hemicellulose composed of arabinoxylans (AX). However, the high crosslinking of this material causes a low availability of AX, for which it is necessary to apply different treatments. The objective of this research is to increase the release of arabinoxylans through solid state fermentation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* using extruded brewery spent grain. Firstly, the BSG was subjected to two types of physical treatments, the first one by extrusion at 20% moisture, 200 rpm and 50°C (BSGe), and the second one by blade mill (BSGm). The chemical composition, particle size distribution, water absorption index (WAI) and water solubility index (WSI) were determined for each sample (BSG, BSGe and BSGm). Subsequently, the solid state fermentation process (SSF) was carried out on each sample, the fermentation kinetics for 7 days at 30°C was monitored, once the SSF concluded, the extraction and purification of AX by the phloroglucinol colorimetric assay was determined, and finally, the total phenolic compounds, phenolic acids and antioxidant capacity by DPPH were quantified. No significant differences ($p \geq 0.05$) on protein, lipids, ash, and total dietary fiber contents among samples, were found, where significant differences ($p \leq 0.05$) were found was on the content of soluble fiber and insoluble, particle size distribution, WAI and WSI, being the BSGe and BSGm those with higher values than BSG. On the other hand, the yields of soluble AX presented significant differences ($p \leq 0.05$) on non-fermented samples (BSG 0.03%, 0.53% BSGm and 0.70% BSGe), and with SSF (BSG 2.95%, 6.24% BSGm and 9.58% BSGe). In addition, significant differences ($p \leq 0.05$) on the content of free phenolic compounds, free phenolic acids and the percentage of inhibition of free extracts by DPPH of samples subjected to SSF, respect to non-fermented samples, were found. Therefore, extrusion and FES treatment increases the AX release from BSG as well as their antioxidant capacity.

Key words: Brewer's spent grain, arabinoxylans, extrusion, solid state fermentation, *Fusarium oxysporum*.

1. INTRODUCCIÓN

La masilla de cervecería (MC) es el principal residuo obtenido durante el proceso de filtración para la elaboración de cerveza, el cual representa el 85% del subproducto total obtenido, de esta industria. A nivel mundial se produce alrededor de 39 millones de toneladas anuales, siendo México el cuarto productor de cerveza a nivel mundial, con una producción de 2.1 millones de toneladas anuales de masilla de cervecería (Kirin Holdings, 2018). Al ser un subproducto con alto contenido de humedad (70%) y polisacáridos (40-50% en peso seco) esto lo hace susceptible al crecimiento y deterioro microbiano después de unos días de almacenamiento a temperatura ambiente (Lynch *et al.*, 2016). Por lo tanto, su uso principal es como alimento para animales o se desecha en basureros, sin embargo, ha vuelto a ser estudiado ya que existe interés para reducir los desechos industriales y ser reutilizado en aplicaciones biotecnológicas para obtener productos de alto valor agregado. La composición química de la masilla varía según el tipo de cerveza y las condiciones de proceso, no obstante, está constituido de material lignocelulósico en su mayoría (30-50%), de la cual la hemicelulosa representa entre el 20-25% (Mussatto, 2014). Este polímero posee una estructura polimérica de gran tamaño, formada principalmente por arabinosilanos (AX) y ácido ferúlico (AF), los cuales resultan benéficos para la salud (Reis y Abu-Ghannam, 2014). Sin embargo, el alto entrecruzamiento del material lignocelulósico provoca una baja disponibilidad de AX y AF para su digestión intestinal (Steiner *et al.*, 2015). Hughes en el año 2007 estudió que al fraccionar los AX en polímeros de menor peso molecular (66 kDa) se tiende a incrementar la estimulación prebiótica *in vitro*. En virtud a la alta cantidad de compuestos bioactivos presentes en la masilla de cervecería se han utilizado distintos tratamientos para aumentar su disponibilidad, mediante uso de métodos físicos, enzimáticos y químicos (Fadel *et al.*, 2018). Estos últimos han sido los más utilizados para hidrolizar la estructura de la MC. A pesar de ello, el uso de agentes químicos cambia las propiedades funcionales de los AX, por lo que tiende a dar fracciones de alto peso molecular (100-200 kDa) y liberan el AF, además de generar residuos peligrosos al medio ambiente. Por otra parte, el tratamiento enzimático produce fracciones de bajo peso molecular y un mayor contenido de AF, pero tiene como limitante el costo (Zhou *et al.*, 2010). Se han aplicado tratamientos físicos como la extrusión, en donde la materia prima se expone a las condiciones de temperatura, presión y cizallamiento; lo que conlleva a la fragmentación estructural (Liu *et al.*,

2011). Este procesamiento se ha usado recientemente para aumentar la solubilidad y disminuir el peso molecular de los AX a partir de fuentes alimenticias y residuos agroindustriales. Xiros *et al.* (2009), modificaron la masilla utilizando un extracto fúngico de *Fusarium oxysporum* con actividad de xilanasas y feruloil esterases, utilizando fermentaciones sumergidas y agentes químicos, obteniendo una liberación del 40% del AF. Se ha estudiado el proceso de fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés) a partir de extractos filamentosos para la producción de enzimas como xilanasas y feruloil esterases. Este proceso presenta varias ventajas tecnológicas y operativas en comparación con la fermentación sumergida (Yang, 2011). El objetivo de esta investigación se centra en los métodos y técnicas utilizadas para la extracción de los arabinosilanos presentes en el subproducto generado por la industria cervecera.

2. ANTECEDENTES

2.1 Producción y Proceso Cervecerero

La cerveza es una de las bebidas más consumidas en el mundo, siendo los países líderes en su producción, China, Estados Unidos, Brasil y México, representando el 75% del consumo global de bebidas alcohólicas (Kirin Holdings, 2020). El proceso para la elaboración de cerveza se divide en cinco operaciones: malteado, maceración, filtración, cocción y fermentación. El malteado, es un proceso aplicado a los granos de cereales, los que germinan bajo condiciones controladas seguido de un secado, una vez que se completa el secado, los granos se denominan malta y pasan a la molienda con el objetivo de convertir el almidón en azúcares simples (Serna-Saldívar, 2013).

En el proceso de maceración, se mezcla la malta de cebada y los adjuntos con agua, después se calientan para permitir a las enzimas hidrolizar el almidón en azúcares, para crear un líquido maltoso llamado mosto. En la filtración, el mosto pasa a un tanque con fondo falso en donde se separa de los granos gastados o masilla de cervecería. Una vez filtrado el mosto pasa a un tanque para la cocción, en donde se esteriliza, se inactivan enzimas y se extraen compuestos solubles del lúpulo, lo cual hace que precipiten algunas proteínas, en este paso los taninos del lúpulo ligan a las proteínas haciéndolas insolubles (Serna-Saldívar, 2013).

Después de la ebullición se utiliza un colador para retirar el lúpulo, posteriormente se enfría el mosto lo cual genera proteína insoluble, de manera que el mosto se vuelve a filtrar antes de pasar al proceso de fermentación. En el proceso de fermentación, el mosto se enfría y se añade levadura iniciando el proceso de fermentación, el cual se realiza en 2 etapas, la primera a temperaturas de 7-15°C y la segunda etapa a temperatura de 0°C, en ambas etapas de fermentación las células de levadura transforman la maltosa a glucosa, la cual a su vez es transformada en etanol, bióxido de carbono y otros metabolitos como ácidos orgánicos (Serna-Saldívar, 2013).

2.1 1. Masilla de Cervecería

La segunda etapa para la elaboración de cerveza es el proceso de filtración, en esta etapa se obtiene el mosto y se filtra la parte insoluble conocida como masilla de cervecería (MC) la cual representa el 85% del subproducto total generado. Se considera la obtención de 39 millones de t anuales a nivel mundial, debido a que se produce alrededor de 20 kg de MC húmeda por cada 100 L de cerveza elaborada (Lynch *et al.*, 2016). El INEGI reportó en el año 2016 una producción de 10.5 mil millones de litros de cerveza en México, obteniendo 2.1 millones de t de masilla de cervecería.

2.1.2. Composición Química de la Masilla de Cervecería

La masilla de cervecería se encuentra conformada por la cáscara, pericarpio y capa aleurona que cubren el grano de cebada, y los adjuntos. La composición química puede sufrir alteraciones significativas debido a diversos factores como el tipo de malta, el momento de la cosecha, el tipo de lúpulo, tipo de adjuntos, proceso de maceración y calidad de los cereales utilizados en el proceso, lo que conlleva a una variada composición (Mussatto, 2014). Sin embargo, su componente primario es material lignocelulósico, cuyos componentes principales son fibra (hemicelulosa y celulosa), proteínas y lignina (Figura 1).

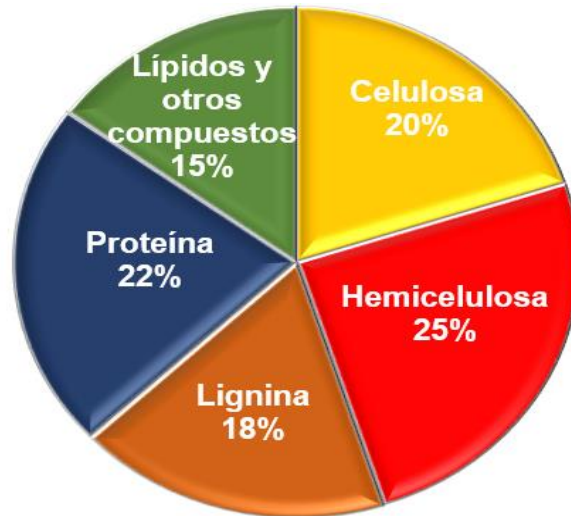


Figura 1. Composición típica de la masilla de cervecería (Xiros y Christakopoulos, 2012).

2.1.2.1. Celulosa. Es uno de los componentes estructurales de las capas externas de los granos de cereales, junto con la hemicelulosa y la lignina representan entre 12-15% del total de la materia seca (Forssell *et al.*, 2008). Debido a su linealidad y su naturaleza, las moléculas de celulosa se asocian entre sí, formando fibras policristalinas (Damodaran y Parkin, 2017). Su composición estructural se define por residuos de glucosas unidos por enlaces β -(1,4) y enlaces (1,3 -1,4) - β -D-glucano, considerándola como uno de los compuestos de fibra insolubles presente en la masilla de cervecería. A los β -D-glucanos provenientes de cereales se le han atribuido efectos benéficos sobre la microbiota intestinal, considerándolos prebióticos, ya que forman soluciones viscosas en soluciones acuosas retrasando el vaciamiento gástrico además de reducir las concentraciones plasmáticas de colesterol (Serna-Saldívar, 2013).

2.1.2.2. Hemicelulosa. Es un polisacárido no almidonoso y representa entre 20-35% del material lignoceluloso (Mamman *et al.*, 2008), está constituida por polímeros heterogéneos de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa), ácido glucurónico y residuos de ácido galacturónico en su mayoría. La hemicelulosa se compone principalmente de polímeros de gran tamaño, conocidos como arabinoxilanos (AX) cuya estructura está constituida por una cadena lineal de xilosas unidas por enlaces β -(1,4), que pueden sustituirse por residuos de arabinosa, en los cuales se encuentra el ácido ferúlico en forma esterificada en el residuo de arabinosa (Mendis

y Simsek, 2014). Debido a su localización dentro de la fibra insoluble de la masilla, éstos compuestos fenólicos no se encuentran disponibles para la digestión enzimática en el intestino delgado, a los cuales se les ha atribuido cierto potencial prebiótico y capacidad antioxidante (Ikram *et al.*, 2017).

2.1.2.3. Lignina. Representa aproximadamente entre 10-28% del total de la materia seca y se define como una macromolécula de polifenoles con estructura compleja, importante para mantener la rigidez e integridad de la pared celular (Ikram *et al.*, 2017). La lignina se conforma a partir de tres monómeros; alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Figura 2), los cuales se encuentran unidos entre sí formando una estructura de red ramificada mediante una reacción de condensación inducida por radicales. Dentro de su red contiene una cantidad considerable de compuestos fenólicos incluyendo ácido ferúlico, p-cumárico, vanílico e hidroxibenzoico (Mussatto, 2014). Sin embargo, una de las limitantes para poder disponer de sus componentes, es la resistencia a la hidrólisis en el intestino, al igual que la celulosa y la hemicelulosa (Lynch *et al.*, 2016).

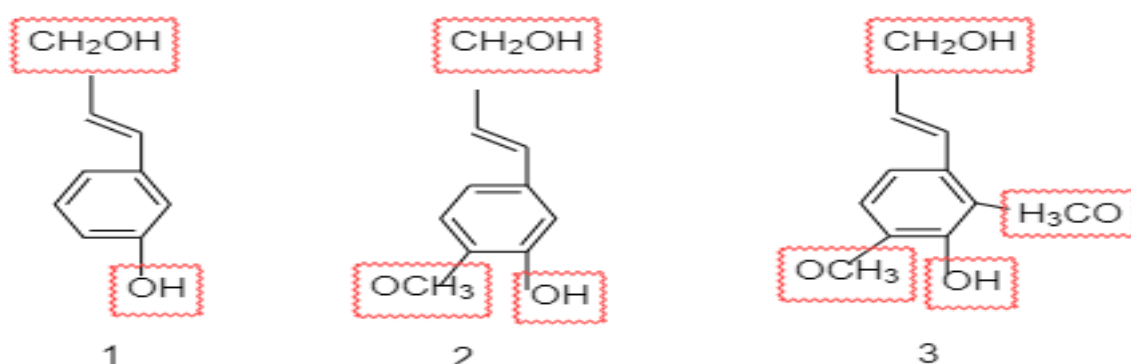


Figura 2. Principales componentes de la lignina: 1. Alcohol p-cumarílico. 2. Alcohol coniferílico 3. Alcohol sinapílico (Chavez-Sifontes y Domine., 2013).

2.1.2.4. Proteína. El contenido de proteína de la MC varía entre el 10-30% del total de la materia seca, los factores que influyen en la composición son; los adjuntos utilizados, la composición de la

malta y el tipo de cerveza que se produzca (Robertson *et al.*, 2010). Dentro de sus componentes proteicos, se encuentran con mayor abundancia las hordeínas, seguido de glutelinas, globulinas y albúminas (Celus, 2006). Durante el proceso de elaboración de cerveza la mayor parte de proteína insoluble permanece en la masilla, ya que estas proteínas se encuentran dentro de las células aleurónicas y en los fragmentos del endospermo almidonoso, se estima que aproximadamente un 65% se encuentre retenida (Ikram *et al.*, 2017). Además, los aminoácidos esenciales representan el 30% del contenido total de proteínas, siendo la lisina la más abundante (Waters, 2012), por lo que ha sido de gran interés, ya que en la mayoría de los cereales éste es el aminoácido limitante.

2.1.2.5. Lípidos, Vitaminas y Minerales. El contenido de lípidos de la MC se encuentra entre 4-10% del total de la materia seca, consiste principalmente en triglicéridos (55%) y ácidos grasos (30%), los ácidos grasos presentes en la masilla son los ácidos linoleico, palmítico y oleico (Parekh *et al.*, 2017). Las principales vitaminas son el ácido fólico, niacina, biotina, tiamina, colina, ácido pantoténico, riboflavina y piridoxina. La mayoría de los estudios realizados sobre las vitaminas de la masilla se centran en los tocotrienoles y tocoferoles, comúnmente conocidos como vitamina E (Ikram *et al.*, 2017). Los minerales más abundantes son fósforo, calcio, magnesio y sodio (6000, 3600, 1900 y 137 mg/kg, respectivamente), y también se encuentran otros minerales, pero en concentraciones bajas (Meneses *et al.*, 2013).

2.1.3. Deterioro y Preservación de la Masilla de Cervecería

La masilla de cervecería contiene entre 70-80% de agua, este alto nivel de humedad aunado al contenido de polisacáridos y proteínas, hacen que la MC sea susceptible al crecimiento y deterioro microbiano, siendo de gran riesgo para su uso y aplicación (Lynch *et al.*, 2016). Por lo tanto, la masilla debe estabilizarse y almacenarse en condiciones apropiadas para su etapa posterior. Bartolomé *et al.* (2002) evaluaron diversos métodos para la preservación de la masilla, encontraron que el secado en horno es el método más adecuado, para prolongar el tiempo de almacenamiento, sugiriendo que se debe reducir a 10% de humedad.

2.1.4. Usos y Aplicaciones de la Masilla de Cervecería

El uso principal de la masilla es para alimentación animal, generalmente las industrias cerveceras suministran este subproducto a bajo costo a los ganaderos para la alimentación del ganado bovino (Mussatto, 2014). Sin embargo, la masilla de cervecería es un material de gran interés para su aplicación en diferentes áreas debido a su composición química, precio bajo y alta disponibilidad a lo largo del año, es por ello que se han realizado estudios para evaluar sus posibles aplicaciones en; alimentación humana, producción de energía, procesos químicos y obtención de productos biotecnológicos (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2019).

2.2 Fibra Dietaria y sus Beneficios en la Salud Humana

La AACCC en el año 2001, definió a la fibra dietaria como la parte de los carbohidratos presentes en las plantas que es resistente a la digestión y absorción en el intestino, con una fermentación parcial o completa en el intestino grueso. Dentro de los diferentes tipos de fibra que existen se consideran a los siguientes como los más importantes: inulina, pectina, lignina, arabinosilanos, celulosa, hemicelulosa, β -glucanos, agar y sustancias vegetales asociadas (Lattimer y Haub, 2010).

2.2.1. Clasificación de la Fibra Dietaria

La fibra dietaria se ha clasificado por su grado de dispersión en medio acuoso, conocida como fibra soluble e insoluble. La fibra soluble o también conocida como fibra totalmente fermentable, se refiere a los polisacáridos no celulósicos (pectinas, gomas, mucílagos), que tienen la capacidad de formar geles en contacto con el agua, además de ser la parte comestible que es resistente al proceso de digestión y ser fermentada por bacterias colónicas a ácidos grasos de cadena corta en el intestino

grueso (Lattimer y Haub, 2010). La fibra soluble está constituida por: pectinas, β -glucano y hemicelulosa solubles, teniendo por función la reducción de la absorción de colesterol y glucosa, disminuyendo su concentración a nivel sanguíneo (Dai y Chau, 2017). Por otra parte, la fibra insoluble no se disuelve en agua y está constituida por: celulosa, lignina y hemicelulosa insoluble, su función se centra en favorecer el crecimiento de la microbiota intestinal (Serna-Saldívar, 2013). Desde el punto de vista fisiológico, ambas fibras generan efectos benéficos a la salud. La reutilización de la masilla de cervecería en la elaboración de alimentos para la dieta humana es de gran interés, debido a los beneficios nutricionales, además de generar alternativas económicas y ambientales.

2.2.2. Arabinosilanos y sus Características Estructurales

Los polisacáridos no almidonosos no son digeribles por las enzimas intestinales humanas, por lo tanto, se denominan fibra dietaria. Los polisacáridos no almidonosos constituyen el 75% de la pared celular y están compuestos de glucomanano, β -glucano, celulosa y pentosanos o arabinosilanos (Fadel *et al.*, 2018). Los arabinosilanos (AX) son componentes de los polisacáridos no almidonosos, se encuentran en la pared celular y en el endospermo almidonado de diferentes cereales. En el Cuadro 1 se reporta el contenido de arabinosilanos de distintos tipos de cereales y subproductos (Zhang *et al.*, 2014).

Los AX están constituidos por cadenas lineales de β -(1-4)-xilopiranosas, a las que las unidades de α -L-arabinofuranosa están unidas a la cadena principal de xilosa en la posición del carbono 2 y/o 3, lo que resulta en 4 estructuras diferentes: monosustituida, disustituida y no sustituida (Mendez-Encinas *et al.*, 2018) (Figura 3), por este motivo la estructura química de los AX puede variar en cuanto a su complejidad de una fuente a otra. Izydorczyk y Biliaderis, (2006) investigaron que los AX de los granos de cereales del arroz, sorgo, mijo y maíz tienen cadenas laterales más complejas que aquellos a base de cereales tales como trigo, centeno y cebada, ya que además de arabinosa contienen residuos de xilosa, galactosa y ácido glucurónico. Una característica única de estos polisacáridos, es la presencia de ácido hidroxicinámico con el ferúlico y cumárico, que se encuentra esterificado a la arabinosa en la posición del carbono 5 (Zhang *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Contenido de arabinoxilanos de varios cereales y subproductos de cereales (base seca) (adaptado de Zhang *et al.*, 2014).

Tipo de grano	Materia prima	AX totales (%)	WEAX (%)	Referencias
Trigo	Grano integral	5.8	0.6	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987
	Salvado	21.4	NR	Courtin y Delcour, 2001
	Harina	1.4-2.1	0.5-0.7	Izydorzcyk <i>et al.</i> , 1991
	Trigo duro	4.0-6.0	0.4-0.6	Lempereur <i>et al.</i> , 1997
Cebada	Grano integral	6.1	0.3	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987
	Grano integral	3.4-4.1	NR	Izydorzcyk y MacGregor, 2000
	Grano integral	NR	0.4-0.9	Oscarsson <i>et al.</i> , 1996
	Grano integral	6.4-8.6	0.4-0.8	Fleury <i>et al.</i> , 1997
	Harina perla	NR	0.3-1.0	Dervilly <i>et al.</i> , 2001
Maíz	Salvado	27.2	NR	Yadav <i>et al.</i> , 2007
	Salvado	29.9	0.3	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987
Centeno	Grano integral	7.6	NR	Bengtsson y Aman, 1990
	Grano integral	8.0-12.1	2.6-4.1	Hansen <i>et al.</i> , 2003
	Salvado	NR	1.7	Figueroa-Espinoza <i>et al.</i> , 2004
Avena	Harina	3.2-3.6	2.2-2.6	Cyran <i>et al.</i> , 2003
	Grano integral	2.7	0.2	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987b
	Cascarilla	3.5	0.3	Beaugrand <i>et al.</i> , 2004
Arroz	Salvado	3.0	0.2	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987
	Grano integral	2.7	0.1	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987
	Cascarilla	8.4-9.3	0.1	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987
Sorgo	Salvado	4.8-5.1	0.3-0.8	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987
	Grano integral	1.8	0.1	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987
Soja	Cascarilla	13.1	1.33	Hashimoto <i>et al.</i> , 1987

NR= No reportado, AX= Arabinoxilanos, WEAX= Arabinoxilanos extraíbles en agua.

Los AX poseen características estructurales que pueden variar y afectar sus propiedades fisicoquímicas, una de ellas es la proporción arabinosa/xilosa (A/X). La relación A/X se refiere al grado de ramificación o sustitución de los arabinoxilanos e indica el número de unidades de arabinosa unidas a la cadena principal de xilosa, esta proporción puede variar de 0.3 a 1.1 dependiendo del origen del polisacárido (Mendez-Encinas *et al.*, 2018).

Los AX se clasifican de acuerdo con su solubilidad en agua, como no extraíbles en agua (WUAX, por sus siglas en inglés) o extraíbles en agua (WEAX, por sus siglas en inglés). En los granos de

cereales, los WEAX se localizan principalmente en el endospermo y los WUAX en la capa aleurona y cascarilla (Niño-Medina *et al.*, 2010). Los WEAX han demostrado que su estructura es similar a los WUAX, pero con valores más altos de peso molecular (Zhang *et al.*, 2014). Susaki y Matsuki (2000), investigaron la capacidad de extracción en agua de los AX y encontraron que la diferencia se debe al grado de enlaces cruzados de la pared celular, además puede deberse a enlaces covalentes entre los grupos carboxilo de ácidos urónicos y los grupos hidroxilo de los AX, así como a la formación de puentes diferúlicos entre las cadenas adyacentes (Mendez-Encinas *et al.*, 2018). Los enlaces cruzados dificultan la extracción de AX y existe la necesidad de utilizar tratamientos con enzimas, agentes químicos y físicos, para extraer eficazmente los AX (Jacquemin *et al.*, 2012).

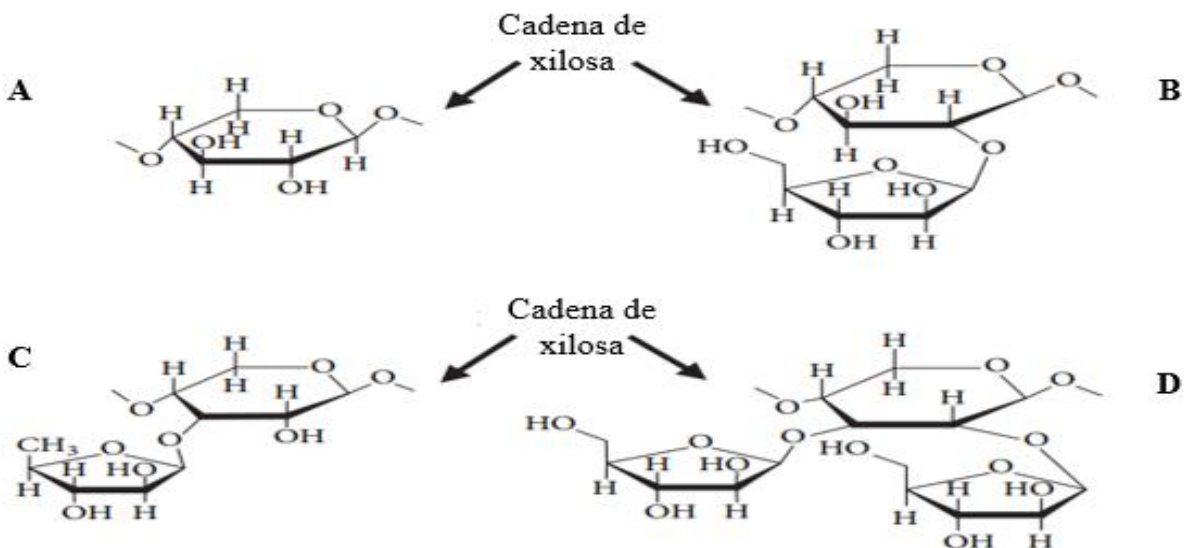


Figura 3. Posición de arabinosa en arabinoxilanos. A) No sustituida, B) Monosustituida en O-2, C) Monosustituida en O-3 residuo de ácido ferúlico esterificado en arabinosa y D) Disustituida en O-2,3. (adaptado de Mendez-Encinas *et al.*, 2018).

2.2.3. Beneficios a la Salud que Promueven los Arabinoxilanos

Las fibras dietéticas de los granos de cereales presentan compuestos fitoquímicos como: fenoles, β -glucanos y arabinoxilanos, entre otros; estos componentes químicos secretados por las plantas, actualmente no se clasifican como nutrientes esenciales, pero pueden ser factores importantes en

la salud humana (Lattimer y Haub, 2010). Se han investigado los fitoquímicos presentes en la fibra dietética como tratamiento y prevención de enfermedades, los cuales tienen acción prebiótica y antioxidante, entre otras.

2.2.3.1. Prebiótico. Se define como un compuesto no digerible que, a través de su metabolización por microorganismos en el intestino, modula la composición y actividad de la microbiota intestinal, lo que confiere un efecto fisiológico benéfico en el huésped (Bindels *et al.*, 2015). Los prebióticos generalmente se componen de polisacáridos no digeribles, caracterizados por su degradación en el intestino grueso por la microbiota bacteriana, principalmente por: *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* (Ikram *et al.*, 2017). Estos microorganismos mejoran el estado de salud intestinal, debido a que promueven el crecimiento de bacterias benéficas, formando una población saludable con un pH intestinal óptimo (Reis *et al.*, 2014).

Los prebióticos tienen la capacidad de supervivencia en los cultivos bacterianos benéficos del colon, los cuales influyen en el crecimiento y metabolismo de los probióticos, por lo que previenen las enfermedades principalmente del tracto gastrointestinal. La fibra dietaria contiene una gran cantidad de polisacáridos, entre los que se encuentran los AX que se metabolizan para la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por medio de las *Bifidobacterias*, los cuales son utilizados como fuente de energía por los enterocitos del colon, mejorando la respuesta inmune y la contracción intestinal (Cencic y Chingwaru, 2010). Por lo tanto, los beneficios para la salud de los AX están relacionados con su fermentación.

2.2.3.2. Antioxidantes. Los radicales libres de oxígeno se producen constantemente durante los procesos metabólicos, y los bajos niveles de radicales libres juegan un papel importante en las funciones fisiológicas del cuerpo humano. Sin embargo, la sobreproducción de radicales libres puede causar estrés oxidativo, lo que lleva a un daño estructural celular, incluido el de los lípidos, membranas, proteínas y ADN (Shahidi y Chandrasekara, 2010). Por lo tanto, muchas enfermedades humanas, como cáncer, aterosclerosis, diabetes y enfermedades neurodegenerativas, están asociadas con el estrés oxidativo (Popolo *et al.*, 2013).

Muchos polisacáridos presentan compuestos fenólicos, los cuales actúan como antioxidante, así como eliminador de radicales libres, y pueden desempeñar efecto protector en contra del daño oxidativo (Wang *et al.*, 2019). Los AX son polisacáridos no almidonosos que se encuentran esterificados con ácido ferúlico. Chen *et al.* (2018) descubrieron que los AX disminuyen las enfermedades metabólicas asociadas con los lípidos y suprimen su peroxidación. Malunga *et al.* (2017) investigaron que el consumo de dietas con aumento de AX ferulados proporcionan protección contra el daño oxidativo, por lo tanto, las propiedades antioxidantes de los AX están relacionadas con la composición de ácidos fenólicos.

2.3. Métodos Utilizados para la Degradación de Material Lignocelulósico y Extracción de Compuestos

La liberación de los AX de la pared celular lignificada es algunas veces restringida por la presencia de lignina o de un enlace éster formando enlaces lignina-carbohidrato, por lo tanto, existe la necesidad de fragmentar la materia lignocelulósica para incrementar los rendimientos de extracción y mejorar la solubilidad de la fracción de WUAX (Fadel *et al.*, 2018). Existen diferentes tipos de métodos para la extracción de AX, cada uno proporciona diferentes rendimientos, distribución de peso molecular y grados de ramificación; los cuales son de gran importancia, ya que determinan la estructura, propiedades físicas y funcionales de los arabinosilanos (Taherzadeh y Karimi, 2008). Se han desarrollado, investigado y reportado diferentes tipos de métodos para la extracción y purificación de AX.

2.3.1. Métodos Químicos

El uso de agentes químicos tiene como objetivo solubilizar la hemicelulosa y, de este modo, hacer que la celulosa sea más accesible (Tomás-Pejo *et al.*, 2011). Típicamente se utilizan ácidos o bases para descomponer y purificar una de las fracciones de la fibra, obteniendo una parte soluble y un

precipitado, los cuales requerirán de ser neutralizados para su posterior procesamiento. A continuación, se hace un breve resumen de estas técnicas y los métodos más representativos de esta categoría.

2.3.1.1. Extracción con Soluciones Alcalinas. Este método implica la ruptura de los enlaces covalentes e hidrógeno de la pared celular de la matriz de los polisacáridos. Se han estudiado técnicas para extraer AX utilizando soluciones alcalinas en las que, los ácidos urónicos cambian su carga a forma negativa causando repulsión entre moléculas, lo cual genera un aumento en la capacidad de extracción de AX (Fadel *et al.*, 2018).

La primera solución utilizada o reportada para liberar WUAX de los cereales fue con hidróxido de bario. Los iones de bario forman complejos insolubles con β -glucano, lo que resulta en la liberación del 80% del WUAX de la harina de trigo y el 50% de WUAX se extrajo del salvado de trigo (de-Figueiredo *et al.*, 2017). Por otro lado, las soluciones alcalinas diluidas como el peróxido de hidrógeno se han utilizado para extraer WUAX, lo que resulta en rendimientos de alrededor del 69% del contenido total de AX del salvado de trigo. Aunque el rendimiento sea mayor que la extracción con agua, se ha reportado que la extracción alcalina afecta la estructura molecular de los AX debido a la interrupción de los enlaces cruzados, lo que resulta en estructuras moleculares diferentes y características funcionales diferentes (Zheng y Wang, 2011).

2.3.1.2. Extracción con Soluciones Ácidas. El tratamiento con soluciones ácidas fragmenta las moléculas de hemicelulosa, debido a que la hidrólisis ácida separa las cadenas laterales de xilanos con soluciones ácidas que incluyen ácido acético, ácido fórmico, metanol y etanol combinados con 0.1% de HCl (Fadel *et al.*, 2018). El tratamiento con ácido orgánico puede ser un método de extracción más efectivo para obtener rendimientos altos de AX, en comparación con el uso de solventes orgánicos. Sin embargo, cuando hay una hidrólisis química extensa, una pequeña porción de los AX podría degradarse en compuestos de muy bajo peso molecular y disolverse en un solvente orgánico, contribuyendo a la pérdida de AX durante la hidrólisis y por ende disminuyendo los rendimientos de extracción (Zhang *et al.*, 2014).

2.3.2. Métodos Enzimáticos

La hidrólisis enzimática es un método que comúnmente se utiliza, ya que presenta una mayor especificidad para hidrolizar los componentes lignocelulósicos. Sin embargo, factores fisicoquímicos, estructurales y de composición hacen que el material lignocelulósico sea recalcitrante y difícil de hidrolizar por enzimas. Entre estos se encuentran la cristalinidad (medida como índice de cristalinidad (CI)), grado de polimerización (DP), área de superficie específica, área de superficie accesible y tamaño de partícula (Vidal *et al.*, 2011), por lo tanto, es necesario de tratamientos previos. El objetivo del pretratamiento es descomponer la estructura de la lignina e interrumpir la estructura cristalina de la celulosa para aumentar la accesibilidad enzimática (Mosier *et al.*, 2005). Los pretratamientos generalmente se clasifican en físicos, biológicos y fisicoquímicos, el mecanismo para hacer que el material lignocelulósico sea más accesible a las enzimas depende del tratamiento previo empleado y la naturaleza de la materia prima (Tomás-Pejo *et al.*, 2011). Posterior al pretratamiento se acondiciona el material para tener las condiciones de pH, carga de sólidos y temperatura para que las enzimas trabajen de manera óptima.

2.3.2.1. Xilanasas. Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que hidrolizan aleatoriamente el xilano, estas enzimas son producidas por hongos y bacterias, se han clasificado como glicosil hidrolasas (GH), el complejo de enzimas GH incluyen: endo- β -1,4-xilanasas, endo- β -D-xilosidasa y esterases (Beg *et al.* 2001). Entre las enzimas involucradas en el aislamiento de AX, las endo- β -(1,4)-xilanasas son las enzimas más comunes, las endoxilanasas atacan el esqueleto de xilano, ingresando en la pared celular e hidrolizando los enlaces internos β -(1,4), lo cual ayuda en la extracción de arabinoxilanos (Fadel *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2014) (Figura 4).

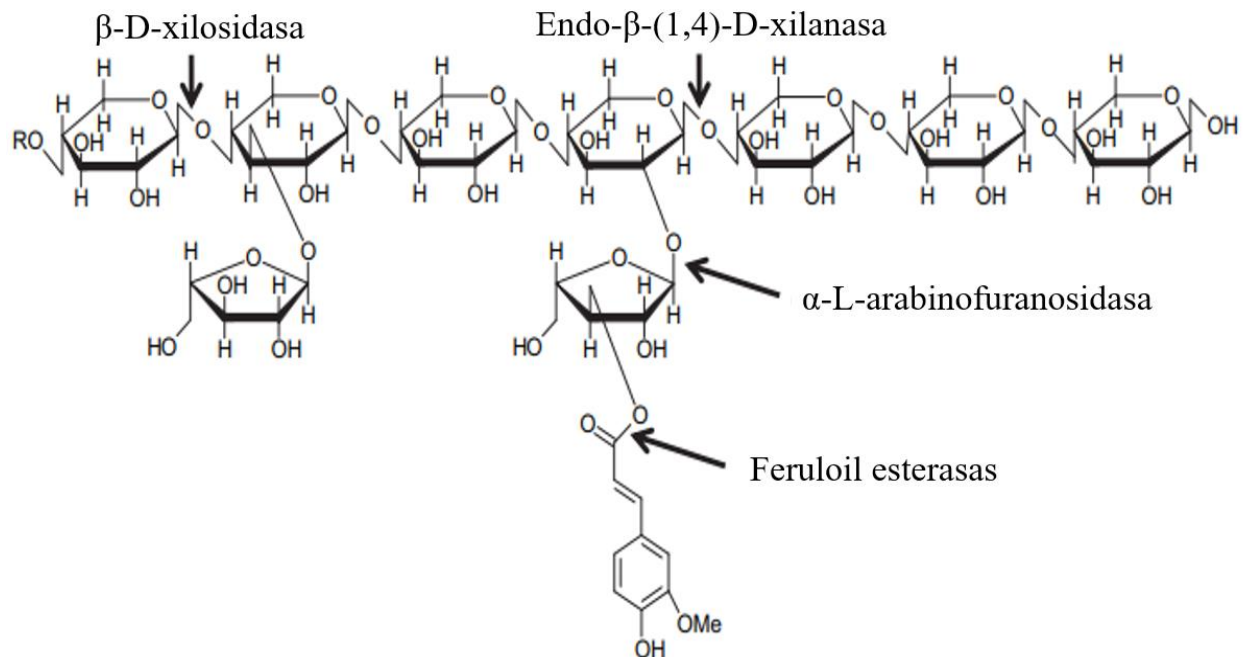


Figura 4. Enzimas hidrolíticas que actúan sobre los arabinoxilanos y sus sitios de acción. (Dornez *et al.*, 2008).

El Cuadro 2 muestra el rendimiento de extracción de AX de algunos cereales y subproductos de cereales mediante hidrólisis enzimática. La comparación entre los métodos de extracción con enzimas y los alcalinos, muestran un menor rendimiento al utilizar enzimas, aunque, el rendimiento de extracción por enzimas no es mayor que la extracción alcalina, la acción de las soluciones alcalinas produce residuos peligrosos y pueden liberar ácido ferúlico, debido a la ruptura de los enlaces éster entre los AX y la cadena lateral del ácido ferúlico, lo que resulta en la pérdida de la funcionalidad como agente antioxidante (Zhou *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Rendimiento de extracción de AX de algunos cereales mediante tratamiento enzimático.

Fuentes	Aplicación	Rendimiento de los AXs (%)	Ara/Xil	Referencias
Salvado de trigo sin almidón	Xilanasa 150 unidades, escala de laboratorio	12.4	0.56	Zhou <i>et al.</i> , 2010
Salvado de trigo sin almidón	Pentopan mono BG 0.75%, escala de laboratorio	15.28	NR	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Salvado de maíz	E-XYLNP 1500 U / mg de <i>Neocallimastix Patriciarum</i> , escala de laboratorio	88.1	0.89	Zhang <i>et al.</i> , 2016
Salvado de centeno	Xilanasa termoestable RmXyn10A de <i>Rhodothermus marinus</i>	41-53	0.38	Falck <i>et al.</i> , 2014
Harina de centeno	20 U β -glucosidasa, 250 U (1-3,1-4)- β -glucano 4-glucano-hidrolasa y 400 U amiloglucosidasa, escala de laboratorio	1.08	0.5	Dervilly-Pinel <i>et al.</i> , 2001

NR= No reportado, Ara/Xil= Relación arabinosa/xilosa.

2.3.3. Métodos Físicos

El pretratamiento físico es utilizado para reducir el tamaño de partícula y la cristalinidad del material lignocelulósico, con el fin de aumentar el área superficial y reducir el grado de polimerización, por lo que incrementa la accesibilidad enzimática a la hidrólisis. Además de ser un método amigable con el medio ambiente, al no generar residuos nocivos (Tomás-Pejo *et al.*, 2011). Asimismo, se han estudiado tecnologías mecánicas como pretratamientos para mejorar el rendimiento de extracción de AX.

2.3.3.1. Molienda. Este método tiene como objetivo reducir el tamaño de partícula y el grado de cristalinidad del material lignocelulósico (Taherzadeh y Karimi, 2008). La reducción en el tamaño de partículas conduce a un aumento del rendimiento de la hidrólisis, en la mayoría de los casos en un 5–25% (dependiendo del material y tipo de molienda). Sin embargo, una reducción del tamaño de partícula por debajo de malla 40 tiene un bajo efecto sobre el rendimiento de la hidrólisis (Zeng *et al.*, 2007).

2.3.3.2. Extracción con Agua. El agua a alta temperatura puede hidratar la celulosa y eliminar la hemicelulosa y parte de la lignina, los carbohidratos de las hemicelulosas se disuelven como oligosacáridos solubles en líquido y se pueden separar (Taherzadeh y Karimi, 2008). La extracción con agua es uno de los métodos más comunes para aislar los AX de diferentes cereales, seguido de precipitación con etanol al 65%. La extracción con agua tiene ventajas a nivel ecológico. Sin embargo, se ha reportado que el uso de esta técnica no es suficiente para romper los enlaces cruzados entre los AX y la matriz de la pared celular (Zhang *et al.*, 2014).

2.3.3.3. Autohidrólisis. También conocida como LHW (Liquid Hot Water, por sus siglas en inglés) es un pretratamiento hidrotérmico que utiliza agua a altas presiones para mantener el estado líquido a temperaturas elevadas (160-240°C) y provocar alteraciones en la estructura de la lignocelulosa (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2019). Durante el pretratamiento de LHW, la mayor parte de la hemicelulosa se solubiliza, haciendo que la celulosa sea más accesible. Se ha investigado que LHW elimina hasta el 80% de la hemicelulosa y mejora la digestibilidad enzimática del material pretratado en materias primas como mazorca de maíz, bagazo de caña de azúcar y paja de trigo (Tomás-Pejo *et al.*, 2011). En general, los pretratamientos de LHW son atractivos debido al nulo uso de agentes químicos y a la poca preparación posterior de los compuestos extraídos que podrían usarse en otras industrias, como la industria alimentaria.

2.3.3.4. Irradiación por Microondas. El pretratamiento a base de microondas combina los efectos térmicos y no térmicos generados en un entorno acuoso, el movimiento de los iones y la vibración de las moléculas polares generan calor y extensas colisiones intermoleculares que aceleran los procesos químicos, físicos y biológicos (Rose y Inglett, 2010). Este tipo de extracción utiliza temperaturas elevadas haciendo la extracción más rápida que otro tipo de extracciones, además no se producen desechos durante este proceso. La energía del microondas se utiliza para calentar el disolvente en contacto con la muestra, esto hace que los analitos se separen de la matriz de la muestra y pasen al solvente (Zhang *et al.*, 2014). La irradiación por microondas es un medio eficaz y confiable de producir arabinosilanos ferulados solubles (AXOS) a partir de salvado de maíz, las ventajas del método asistido por microondas son: tiempos de extracción más cortos y tratamientos con altas temperatura (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2019).

2.3.3.5. Extracción Asistida por Ultrasonido. El método de extracción asistida por ultrasonido (EAU) causa variaciones de presión, formando burbujas microscópicas que colapsan después de su formación (Zhang *et al.*, 2014). Las ondas de ultrasonido fragmentan la pared celular, sin embargo, la intensidad del ultrasonido puede descomponer los polímeros, lo cual puede afectar la funcionalidad de los polisacáridos (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2019). Reis *et al.* (2015) utilizaron extracción asistida por ultrasonido para extraer AX de la masilla de cervecera, en este estudio se determinó el tiempo de extracción y el consumo de energía y se compararon con la extracción alcalina convencional. El tiempo de extracción de AX se redujo de 7 h a 25 min, recuperando el 60% de AX de la MC.

2.3.3.6. Extracción por Extrusión. La extrusión es un proceso en el que los materiales pueden exponerse a una combinación de temperatura, presión y fuerzas de corte, lo que puede conducir a una variedad de reacciones químicas y transformación molecular (Tomás-Pejo *et al.*, 2011). El uso de extrusión se ha utilizado para incrementar la solubilidad de la fibra dietética, sin embargo, se ha reportado incremento en los WEAX y el efecto positivo sobre el peso molecular en fibra de maíz, lo cual aumenta sus beneficios biológicos para la salud (Fadel *et al.*, 2018). En estudios previos se ha observado que los efectos de los AX de bajo peso molecular (66 kDa) tienen una estimulación prebiótica más alta, en comparación con los AX de alto peso molecular (Hughes *et al.*, 2007). Las ventajas del método asistido por extrusión son menor tiempo de residencia y menor consumo de agua, lo que indica que es posible desarrollar el procedimiento como un proceso respetuoso con el medio ambiente (Zhang y Li, 2014). En el Cuadro 3 se resume el efecto de extrusión en la solubilidad de fibra dietética y arabinosilanos.

Cuadro 3. Principales hallazgos del efecto de extrusión de fibra dietética y solubilidad de arabinosilanos.

Fuentes	Condiciones de extrusión	Cambio de FD/AX	Referencias
Fibra de maíz	Extrusor de doble tornillo, relación L/D 24: 1, diámetro de matriz de 3.0 mm, humedad; 30, 40 y 50%, velocidad de tornillo fija de 200 rpm y velocidad de avance de 9 kg/h.	El AX soluble aumentó de 463 g/kg a 530 g/kg y 586.3 g/kg a 30 y 40% de humedad.	Singkhornart <i>et al.</i> , 2013
Paja de trigo y salvado de trigo	Extrusor de doble tortillo, longitud del cañón 1.6 m, relación líquida/sólido 7, velocidad de alimentación 13.8 kg/h, velocidad del tornillo 150 rpm y temperatura fija a 50°C.	El rendimiento de extracción de hemicelulosa disminuyó de 59% a 24% y el xilano disminuyó del 76% al 53% al utilizar el extrusor.	Zeitoun <i>et al.</i> , 2010
Salvado de trigo	Extrusor de doble tornillo con un diámetro de tornillo de 57 mm, relación L/D 24: 1, humedad 20, 25 y 30%, temperatura de 165, 175 y 185°C, velocidades de tornillo a 180, 190 y 200 rpm.	La solubilidad de la fibra dietética a una temperatura de 175°C, un 25% de humedad y una velocidad de tornillo de 200 rpm fue del 11.75% en comparación con el 2.54% para el salvado de trigo sin tratar.	Long <i>et al.</i> , 2014

FD= Fibra dietaria, AX= Arabinosilanos.

2.3.4. Biológicos

Los microorganismos también se pueden usar para mejorar la hidrólisis enzimática, ya que degradan la pared celular (Taherzadeh y Karimi 2008). La degradación fúngica ocurre mediante dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: el sistema hidrolítico, que produce hidrolasas que son responsables de la degradación de los polisacáridos; y un sistema ligninolítico oxidativo y extracelular único, que degrada la lignina y abre los anillos fenilo (Sánchez, 2009). En el Cuadro 4 se resumen algunos de los microorganismos utilizados para tratamiento biológico de residuos agroindustriales. Por otro lado, el pretratamiento biológico ha sido investigado para la producción de enzimas, azúcares reductores, etanol, proteínas y aminoácidos, carbohidratos, lípidos, fenoles, entre otros (Chen *et al.*, 2010).

Cuadro 4. Microorganismos utilizados para tratamiento biológico de residuos agroindustriales.

Hongo	Fuentes	Enzimas	Referencias
<i>Aspergillus niger</i>	Bagazo de caña de azúcar	Xilanasas, celulasas	Park <i>et al.</i> , 2002.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Residuos de maíz, avena y granos gastados de cervecería	β -galactosidasa, xilanasas, Feruloil esterases.	Mikan y Castellano, 2004, Xiros y Christakopoulos, 2009.
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bagazo de caña de maíz paja	Xilanasas, celulasas, lacasa	Márquez <i>et al.</i> , 2007.

2.4 *Fusarium oxysporum*

2.4.1 Filogenia de *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum Species Complex (FOSC) es un grupo de especies fúngicas aisladas de los suelos, que incluyen cepas patógenas y no patógenas, que son morfológicamente similares, pero filogenéticamente distintas (Achari *et al.*, 2020). La taxonomía de *F. oxysporum* ha sido definida por la morfología de las estructuras reproductivas asexuales. Esto lleva a una definición amplia de *F. oxysporum*, debido a la variabilidad y diversidad genética dentro de la especie (Kistler, 1997). La subdivisión se ha centrado principalmente en el concepto de *forma specialis* (f.sp) basado en el huésped de la planta infectada del que se aisló una cepa particular, existen más de 105 *forma speciales* (*ff. spp*) infectando más de 100 especies de plantas que causan la enfermedad de marchitez o pudrición (Gordon y Martyn, 1997). Es un hongo con capacidad de sobrevivir en material orgánico por periodos prolongados, debido al tipo de esporas que lo caracterizan, denominadas clamidosporas (Leslie y Summerell, 2008). A *F. oxysporum* se le ha conferido gran capacidad para degradar la pared celular por medio de su producción enzimática.

2.4.2 Producción de Enzimas Lignocelulósicas

Al hongo *Fusarium oxysporum* se le ha conferido gran capacidad para degradar paredes celulares del hospedero por medio de su producción enzimática, siendo las principales enzimas celulasas, glucanasas, glucosidasas, pectinasas, α -L-arabinofuranosidasas, feruloil esterasas y xilanasas (Xiros y Christakopoulos, 2009). Este hongo tiene la capacidad de convertir la lignina, celulosa y hemicelulosa en polímeros de menor tamaño, los cuales son utilizados como estímulo para la producción de las enzimas antes mencionadas, utilizando como fuente de carbono un sustrato con alta cantidad de material lignoceluloso (Bribiesca, 2013). Polizelli *et al.* (2005) han propuesto un posible mecanismo para la producción de las xilanasas por *F. oxysporum*, tiene como pH óptimo 6.0 y temperatura entre los 30-50°C. Se ha investigado que las xilanasas actúan en sinergia con las feruloil esterasas, es decir, es necesario el rompimiento de las estructuras de AX para poder disponer del ácido ferúlico y compuestos fenólicos presentes y romper los enlaces éster, de esta manera estimular la producción de las feruloil esterasas (Xiros *et al.*, 2009).

2.5 Sistemas de Fermentación

La producción de enzimas a escala industrial se realiza mediante el crecimiento de microorganismos sobre medios de cultivo. Actualmente existen dos métodos para llevar a cabo la propagación de hongos, fermentación sumergida (SmF, por sus siglas en inglés) y fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés).

2.5.1. Fermentación Sumergida

La fermentación sumergida (SmF) implica el uso de cultivo líquido, los cuales fluyen libremente como la melaza y caldos. Estos permiten un mayor control de las condiciones de cultivo, como la

temperatura, concentración de oxígeno y el pH (Singh *et al.*, 2014), sin embargo, el sustrato de los medios utilizados se consume con bastante rapidez; por lo tanto, necesitan ser reemplazados o suplementados constantemente con nuevos nutrientes. Los compuestos bioactivos que se encuentran en forma constitutiva o los que son inducidos, se secretan en el caldo de fermentación y pueden mostrar diferentes patrones de producción, dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo (Subramaniyam y Vimala, 2012). De igual manera, este método de fermentación ofrece facilidad en la separación de biomasa, mezcla de compuestos, aireación y facilidad de escalamiento.

2.5.2. Fermentación en Estado Sólido

La fermentación en estado sólido (SSF) se aplica en muchos procesos tradicionales de fermentación de alimentos y ofrece posibilidades para mejorar la producción de productos e ingredientes alimentarios nuevos y existentes (Te-Biesebeke *et al.*, 2002). La fermentación en estado sólido es simple, requiere menor capital, tiene una productividad superior, presenta menores niveles de represión de catabolitos e inhibición del producto final, reduce el requerimiento de energía, utiliza medios de cultivo simples y no requiere de control riguroso de los parámetros de fermentación.

La SSF es más adecuada para las técnicas de fermentación que involucran hongos y microorganismos que requieren menos contenido de humedad (Subramaniyam y Vimala, 2012). En desarrollos recientes, los organismos se usan en SSF para producir altos rendimientos de enzimas puras que se producen mucho más eficientemente que en fermentaciones sumergidas. Actualmente, la SSF está experimentando un renovado interés, principalmente debido a las oportunidades que brinda en términos de aumentar la productividad y la concentración del producto en comparación con SmF. Adicionalmente, crea nuevas posibilidades de productos, una recuperación más barata y la posibilidad de utilizar una amplia gama de productos y flujos de residuos de la agroindustria como sustratos (Yang, 2011). El Cuadro 5 resume las principales características y ventajas de la fermentación en estado sólido.

Cuadro 5. Características y ventajas de la fermentación en estado sólido.

Características	Ventajas
Bajo contenido de humedad	<ul style="list-style-type: none"> • Menor volumen de reactor requerido para cierta productividad • Bajos costos de purificación por mayor concentración de producto
Mayor relación de área superficial volumen de líquido	<ul style="list-style-type: none"> • Aireación fácilmente lograda • Menor requerimiento energético.
Simulación de ambiente natural microbiano	<ul style="list-style-type: none"> • Algunos productos se producen a mejores niveles en SSF o solo se producen en este estado • Rendimientos reproducibles
Medio simple	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de granos no procesados con o sin suplementos • Pueden ser desechos agroindustriales
Disponibilidad de sustrato	<ul style="list-style-type: none"> • Incrementa o se mantiene estable

Fuente: *Yang, (2011).*

3. HIPÓTESIS

El tratamiento de extrusión y la fermentación en estado sólido con una cepa nativa de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* incrementa la liberación de arabinosilanos de la masilla de cervecería.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la liberación de arabinosilanos a partir de la fermentación en estado sólido con una cepa de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* utilizando como sustrato masilla de cervecería tratada por extrusión.

4.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar químicamente la masilla de cervecería, determinar la distribución de tamaño de partículas y la absorción y solubilidad en agua.
2. Cuantificar el contenido de arabinosilanos solubles en masilla de cervecería tratada por extrusión y molienda.
3. Evaluar la liberación de arabinosilanos solubles obtenidos mediante la fermentación en estado sólido con el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* en la masilla de cervecería sin pretratamiento, molida y extruida.
4. Determinar el efecto de los tratamientos de extrusión y molienda con y sin fermentación sobre el contenido de arabinosilanos solubles en la masilla de cervecería.
5. Evaluar el contenido de compuestos fenólicos totales, ácidos fenólicos y la capacidad antioxidante de la masilla de cervecería sin tratamiento, molida, extruida, fermentada sin tratamiento, molida y extruida.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey campus Monterrey (ITESM) en el Centro de Biotecnología FEMSA, y en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), en la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal.

La masilla de cervecería fue donada por la empresa Heineken México, ubicada en Monterrey Nuevo León, y transportada al ITESM campus Monterrey, donde se sometió a un proceso de secado en un horno (Zanussi, IT) a 45-50°C durante 48 h. El hongo *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Postcosecha del CIAD, A.C. el cual fue aislado de frutos de melón cantaloupe (*Cucumis melo*) e identificado de acuerdo a las características morfológicas y microscópicas reportadas por Leslie y Summerell, (2008).

Todos los productos químicos, disolventes y reactivos utilizados en este estudio fueron de grado analítico.

5.1 Caracterización Química, Distribución de Tamaño de Partículas, Absorción y Solubilidad en Agua de la Masilla de Cervecería

5.1.1 Composición Química de Masilla de Cervecería

Para la determinación de humedad, ceniza, fibra dietaria total, proteína y grasa, se utilizaron los procedimientos de la AACC (2000), métodos 44-15.02, 08-01.01, 32-05.01, 46-13.01 y 30-20.01, respectivamente. Para la determinación de los carbohidratos estructurales se utilizaron dos extracciones para remover materiales solubles en agua y etanol, esto para evitar cualquier variación de resultados. Los materiales solubles en agua incluyen material inorgánico, azúcares no estructurales, material nitrogenado, y la fracción soluble en etanol incluye pigmentos y ceras. Este primer paso fue realizado de acuerdo al método establecido por Sluiter *et al.* (2008a), después, el

material insoluble se hidrolizó con agentes químicos y se filtró para la cuantificación de azúcares estructurales en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), (Waters Breeze, Milford, MA) con una columna Sp0810 (Shodex, JP), como lo describió Sluiter *et al.* (2008b). Cada análisis se realizó por triplicado.

5.1.2 Distribución de Tamaño de Partículas de Masilla de Cervecería

Para determinar los intervalos de tamaño de partículas de las diferentes muestras (masilla sin tratamiento, masilla molida y masilla extruida) se llevó a cabo un análisis de tamiz de agitación, siguiendo la metodología de acuerdo a Serna-Saldívar (2003). Se utilizaron 100 g de muestra colocándolo en el tamiz superior de un conjunto de tamices (Seedburo, Chicago, IL, USA) y se agitó por 5 min en un tamizador automático Ro-Tap (Advantech Manufacturing, Inc., USA). Se pesaron las fracciones retenidas en los tamices US No. 20, 40, 60, 80, 100. Se realizaron tres determinaciones para cada muestra.

5.1.3 Índice de Absorción y Solubilidad en Agua de Masilla de Cervecería

Se evaluó el índice de absorción de agua (WAI) e índice de solubilidad de agua (WSI) de las diferentes muestras (masilla sin tratamiento, masilla molida y masilla extruida). El WAI se determinó como la cantidad (g) de agua absorbida por cada gramo de muestra como describen Anderson *et al.* (1970). Se mezcló 2.5 g de muestra con 25 mL de agua destilada en un tubo de centrífuga de 50 mL y se agitó en una incubadora con agitación (Shel Lab® SMI2, USA) a 110 rpm durante 30 min a 30°C. Después, los tubos se centrifugaron (Thermo Fisher Scientific, USA) a 3,000 xg durante 20 min. El sobrenadante se vertió cuidadosamente en una placa de evaporación tarada, se pesó el precipitado (muestra) con el cual se calculó el WAI a partir de su peso original. Para determinar el WSI se utilizó el peso de sólidos secos recuperados al evaporar el sobrenadante del WAI que se acaba de describir. El WSI se expresó como porcentaje de sólidos secos en la

muestra de 2.5 g. Esta técnica se realizó por triplicado.

5.2 Tratamientos Físicos de Molienda y Extrusión en la Masilla de Cervecería

5.2.1 Molienda

La masilla seca se molió en un molino de cuchillas (Wiley Mill®, Swedesboro, NJ, USA) equipado con un tamiz con orificios de 2 mm de diámetro nominal. La muestra fue resguardada en bolsas resellables (Ziploc®) y confinada dentro de un recipiente plástico para evitar la variación en la humedad después del secado. La muestra se mantuvo almacenada a temperatura ambiente.

5.2.2 Proceso de Extrusión

Se utilizó un extrusor de doble tornillo (BTSM-30, Bühler AG, Uzwil, SUI) con un barril compuesto de cinco zonas y dos alimentadores independientes para la materia prima sólida y el agua. La temperatura de la quinta zona del barril se controló mediante un dispositivo de intercambiador de calor (Tool Temp, Bühler AG, Uzwil, SUI). La longitud total y el diámetro exterior de los tornillos fueron de 800 mm y 30 mm respectivamente y la relación L/D fue de 20. Se utilizó una matriz con un solo orificio de 4 mm. La configuración de los tornillos se componía de tres secciones diferenciadas: sección de entrada/elementos de transporte (para la introducción y transporte de la materia prima seca y agua), sección de elementos de mezcla y sección de elementos de trabajo final compuesta por elementos de amasado y retroceso. La masilla de cerveza previamente seca y sin moler, se introdujo en la tolva para ser extruida. Se utilizó una velocidad de tornillos de 200 rpm, una temperatura de 50°C al final del cañón y una humedad del 20%, siendo estos los parámetros establecidos por Heredia *et al.* (2015). La masilla extruida se secó en un horno (Zanussi, IT) a 50-60°C por 1 h y se guardó en bolsas plásticas para su posterior análisis.

5.3 Fermentación en Estado Sólido con una Cepa de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*

5.3.1 Condiciones del Inóculo

El ensayo inició con el crecimiento de la cepa del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*, aislado previamente del fruto del melón cantaloupe (*Cucumis melo*) cultivados en la Costa de Hermosillo, Sonora, y conservado bajo refrigeración en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Postcosecha del CIAD, A.C. La cepa del hongo se inóculo en placas Petri con agar papa-dextrosa (PDA) (BD Bioxon®, México) y se incubó por 10 días a 30°C en una incubadora (Shel Lab® SMI2, USA). Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas a la cual se añadieron 15 mL de agua estéril con 100 µL de polisorbato 80, sobre la superficie de la colonia del hongo. Se raspó la superficie de la colonia y la suspensión de esporas se ajustó a una concentración de 1.3×10^7 esporas/mL, utilizando una cámara de Neubauer (Bright-Line, Buffalo, NY, USA). Se tomó una alícuota de la suspensión de esporas (5 mL) y se añadió a 100 mL del medio de cultivo mineral descrito por Xiros *et al.* (2008), adicionando 20 g/L de masilla de cervecería como fuente de carbono (pH 6.0) y se incubó durante 3 días a 30°C con una velocidad de 250 rpm, para la producción de micelio.

5.3.2 Proceso de Fermentación en Estado Sólido de Masilla de Cervecería

Para la fermentación en estado sólido se siguió la metodología establecida por Xiros *et al.* (2008), con algunas modificaciones. El proceso se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 g de fuente de carbono (masilla de cervecería sin tratamiento, extruida y molida), se humedeció con 10 mL de medio mineral hasta asegurar una actividad de agua (A_w) de 0.9. La A_w fue medida mediante el equipo AquaLab (4Te, METER Group, Inc., USA). Antes de someter a esterilización el medio de cultivo, se midió el pH ajustándolo a 6.0 con HCl 1 N y NaOH 1 N. El medio se esterilizó a 110°C durante 15 min (Yamato SE-510, Yamato Scientific, USA).

Finalizando la esterilización, se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 10 mL del cultivo del hongo *F. oxysporum* con un tiempo de incubación de 72 h (preparado como se describió anteriormente), este procedimiento se realizó dentro de una campana de flujo laminar (Labconco, Kansas City, MI, USA). Los matraces se incubaron a 30°C durante 7 días. A intervalos de tiempo (24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h), se retiraron tres matraces de cada concentración y se esterilizaron a 121°C, 15 psi, 15 min para detener el proceso de fermentación y proceder a realizar la extracción de AX solubles, de acuerdo con el tratamiento establecido como se describe en la siguiente sección.

5.4 Cuantificación de Arabinosilanos Solubles Extraídos de la Masilla de Cervecería

5.4.1 Extracción y Purificación de Arabinosilanos Solubles en Agua

Los AX se extrajeron y purificaron utilizando el método descrito por Fadel *et al.*, (2018), con algunas modificaciones. Se pesaron 25 g (base seca) de las muestras y se añadieron en tubos de centrífuga con capacidad de 250 mL. Posteriormente, se agregó a cada muestra 225 mL de agua, incubando los tubos en un baño de agua con agitación (Hot Shaker, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA) durante 2 h a 40°C. Enseguida se centrifugaron las muestras a 6,000 xg por 40 min a 10°C (Hermle Labortechnik GmbH, DEU), se ajustó el pH a 7 en el sobrenadante usando NaOH 1 M o HCl 1 M, después se incubó agregando 183.75 µL de α -amilasa termoestable (340 Unidades/mg) (Thermozyme® L340) proporcionada por ENMEX (Tlalnepantla, México) en baño maría (Mirak, Thermolyne, USA) con agitación a 91°C durante 60 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se les adicionó 104.16 µL de alcalasa (2.4 Unidades/mg) (Novozymes, Bagsvaerd, DK) a 50°C durante 14 h. Luego, la proteasa se inactivó colocando las muestras en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4,600 xg por 20 min a 10°C. Se añadió etanol (70% v/v) (DEQ, Monterrey, México) a los sobrenadantes y se almacenaron a 4°C durante la noche. El precipitado que se formó se recuperó mediante centrifugación a 4,600 xg por 20 min a 10°C, descartando el sobrenadante y reteniendo el residuo. El residuo se pesó antes de lavar y agitar dos

veces con 20 mL de etanol absoluto (mínimo 99% v/v) (DEQ, Monterrey, México). Finalmente, se agregaron 20 mL de acetona (DEQ, Monterrey, México) y las muestras se agitaron en vórtex (Vortex Mixer, Labnet, USA) durante un minuto seguido de una centrifugación a 4,600 gx durante 20 min a 10°C. Los precipitados finales se secaron durante 24 h a 45°C en un horno de secado (Fisher Scientific, USA), una vez secos se registró el peso de los extractos y se guardaron en bolsas resellables para realizar la cuantificación de AX, de acuerdo con el método establecido. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

5.4.2 Determinación de Arabinoxilanos

Se empleó un ensayo colorimétrico para determinar el contenido de pentosanos (arabinosa y xilosa) de acuerdo con el método descrito por Douglas, (1981). Se utilizó D-xilosa (Sigma, St, Louis, MO, USA) para construir una curva de calibración a concentraciones de 0.05, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/mL. El reactivo de color se preparó previamente mezclando 5 mL de floroglucinol en etanol absoluto (20% p/v) con 110 mL de ácido acético glacial (DEQ, Monterrey, México), 2 mL de ácido clorhídrico (DEQ, Monterrey, México) y 1 mL de solución de glucosa en agua (1.75% p/v) (Sigma, St, Louis, MO, USA). Se mezclaron alícuotas de 2 mL por triplicado de cada dilución estándar con 10 mL del reactivo colorimétrico. Inmediatamente, los tubos que contenían las mezclas se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 25 min. Las muestras se retiraron, se enfriaron en un baño de hielo durante 1 min y se colocaron inmediatamente en un baño de agua a temperatura ambiente durante 1 min. Los tubos se retiraron, se colocaron horizontalmente y se cubrieron con papel de aluminio. Después de 10 min, se leyó la absorbancia de las muestras a longitudes de ondas de 552 nm y 510 nm usando un espectrofotómetro Genesys 10S UVeVis (Thermo Scientific, Milford, MA). La lectura de absorbancia a 510 nm se le restó a la lectura a 552 nm para eliminar la influencia de las hexosas. Con respecto a las muestras experimentales, se pesaron 4.5-5.0 mg del extracto de cada muestra (masilla seca, masilla molida, masilla extrudida y los diferentes tratamientos de la cinética de fermentación con *F. oxysporum*) y se realizó el procedimiento descrito anteriormente. Los valores de contenido de AX en las muestras se determinaron interpolando la ecuación derivada de la curva estándar de xilosa. El contenido total de pentosano en las muestras se determinó por duplicado y los valores se expresaron como porcentajes.

5.5 Contenido de Compuestos Fenólicos Totales, Ácidos Fenólicos y Capacidad Antioxidante

Para evaluar el contenido de compuestos fenólicos, ácidos fenólicos y la capacidad antioxidante primero se realizó la extracción de los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos totales son la suma de los compuestos fenólicos ligados y libres, mientras que, los ácidos fenólicos totales son la suma de los ácidos fenólicos ligados y libres

5.5.1 Extracción de Compuestos Fenólicos Libres

Los compuestos fenólicos libres se extrajeron de acuerdo con el método descrito por Chen *et al.* (2016), con algunas modificaciones. Se pesaron 2 g (base seca) de las muestras y se desgrasó dos veces con 20 mL de hexano para eliminar los lípidos. Se agitó por 15 min en un agitador de acción de muñeca (Shaker bath, Lab-Line Instrument, Inc., USA) en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente, después se centrifugó a 10,000 rpm. (Thermo Fisher Scientific, USA) a 4°C por 10 min. El residuo libre de lípidos fue lavado tres veces con 20 mL de metanol al 80%, en cada extracción la mezcla se agitó en un agitador durante 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Después, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 10 min. Una vez finalizado los 3 lavados, los sobrenadantes se recolectaron en un matraz de rotavapor para eliminar el solvente hasta la sequedad, mediante el uso del rotavapor (LABORATA 4010-digital, Heidolph, Alemania) a una temperatura de 38°C y con vacío. Después de obtener los extractos secos, se disolvieron en metanol al 50% (5 mL) y se usaron para determinar la cantidad de extractos fenólicos libres. Los extractos se almacenaron a -20°C en un congelador (Bosch, Gsn36Ai31, Alemania). La extracción se realizó por duplicado.

5.5.2 Extracción de Compuestos Fenólicos Ligados

Los compuestos fenólicos ligados se extrajeron de acuerdo con el método descrito por Chen *et al.*

(2016), con algunas modificaciones. El residuo recogido después de la extracción con metanol del punto 5.5.1 se hidrolizó con 40 mL de NaOH 4 M a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se agitó usando un agitador Shaker bath, (Lab-Line Instrument, Inc., USA) en oscuridad y a temperatura ambiente. La mezcla hidrolizada se ajustó a un pH entre 1.5-2.0 con HCl 6 M utilizando un potenciómetro marca Hanna HI 221 (Hanna Instruments, Padua, Italia). Después se añadió en tubos de 50 mL y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C (Thermo Fisher Scientific, USA), y al término de la separación se realizó una lixiviación líquido-líquido al sobrenadante con 50 mL de acetato de etilo tres veces (150 mL en total). Una vez finalizados los 3 lavados los sobrenadantes se combinaron en un matraz de rotavapor de 500 mL para eliminar el solvente llevando el contenido a sequedad, esto mediante el uso del rotavapor LABORATA 4010-digital (Heidolph, Alemania) a una temperatura de 35°C y con vacío. Después de obtener los extractos secos, se disolvieron en metanol al 50% (5 mL) y se usaron para determinar la cantidad de extractos fenólicos ligados. Los extractos se almacenaron a -20°C en un congelador (Bosch, Gsn36Ai31, Alemania). La extracción se realizó por duplicado.

5.5.3 Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales

Se evaluarán los compuestos fenólicos, libres y ligados de las muestras, utilizando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Chen *et al.* (2016) con algunas modificaciones. En resumen, se agregaron 100 µL de metanol al 50% y 100 µL de extractos crudos o soluciones estándar adecuadamente diluidos a 1.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu recién diluido 10 veces. La solución se agitó con vórtex (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA) por 5 min. Después, se añadió 1.5 mL de una solución de carbonato de sodio (75 g/L) y se mezcló minuciosamente. Después de reposar durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad, se midió la absorbancia a 765 nm utilizando un espectrofotómetro (CARY 50 Bio, Varian, Inc., USA). Se utilizó ácido gálico como estándar, el contenido fenólico total se expresó como miligramos de ácido gálico equivalentes por g de muestra (mg EAG/g de muestra, peso seco).

5.5.4 Ácidos Fenólicos por HPLC

El ensayo cromatográfico de los ácidos fenólicos se realizó según la técnica descrita por Chen *et al.* (2016) con algunas modificaciones. La separación cromatográfica se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos en fase reversa (RP-HPLC) (Agilent Technologies, California, USA), equipado con un detector con arreglo de diodos. La columna analítica fue una C₁₈ODS (Beckman Coulter, USA) con una longitud de 300 mm, 4.6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil constaba de Acetonitrilo 100% (fase A) y ácido fórmico al 0.1% v/v en agua (fase B). Las condiciones se establecieron de la siguiente manera: temperatura de la columna 24°C, caudal de 1 mL/min, volumen de inyección de 10 µL, se programó un gradiente de 35 min de la siguiente manera: 0-15 min 92% B, 15-35 min 92% B. Los ácidos fenólicos se detectaron a una longitud de onda de 325 nm. Los ácidos fenólicos se identificaron comparando los tiempos de retención con los estándares comerciales de ácido caféico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico. Los contenidos de ácidos fenólicos se cuantificaron mediante curvas de calibración externas.

5.5.5 Capacidad Antioxidante por Eliminación de Radicales Libres DPPH

El ensayo de actividad de eliminación de radicales DPPH se llevó a cabo de acuerdo con Chen *et al.* (2016). Brevemente, se agregaron 200 µL de extractos crudos o estándares adecuadamente diluidos a 3.8 mL de solución de radicales DPPH 60 µmol/L, que se preparó previamente en metanol. Después de 60 min de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, se midió la absorbancia a 515 nm usando un espectrofotómetro (CARY 50 Bio, Varian, Inc., USA). La actividad de eliminación de radicales DPPH (%) de ambas muestras y estándar (Trolox) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición del radical DPPH} = \left[\frac{1 - A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Control}}} \right] \times 100$$

Donde: A Muestra es la absorbancia de 200 μ L de muestra + 3.8 mL de solución de DPPH.
 A Control es la absorbancia de 200 μ L de metanol al 50% + 3.8 mL de solución de DPPH.
 Se utilizó como curva estándar un gráfico de la concentración de Trolox con actividad de eliminación de radicales de DPPH. Los valores de DPPH se expresaron como micromoles de equivalentes de Trolox por kilogramo de muestra (μ mol ET/kg de muestra).

5.6 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

En el cuadro 6 se muestra el diseño experimental utilizado en el presente trabajo, el cual se utilizó un diseño completamente al azar con arreglos factoriales 2^2 con 3 repeticiones por tratamiento. Los factores fueron: A) Proceso de extrusión (masilla sin extrusión y masilla extruida) y B) Proceso de fermentación en estado sólido con una cepa de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* (masilla no fermentada y masilla fermentada), sobre el porcentaje de liberación de arabinosilanos de la masilla de cervecería. Por otra parte, en el cuadro 7 se muestra la lista de tratamientos y códigos de muestras. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer cuando se tuvieron diferencias significativas. Los análisis fueron realizados con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ ($p \leq 0.05$). Los datos se analizaron utilizando en el paquete estadístico NCSS (Statistical analysis software, Kaysville, Utah, USA) versión 07.

Cuadro 6. Diseño experimental.

Factor A Proceso de extrusión	Factor B Proceso de fermentación en estado sólido	
	Masilla no fermentada	Masilla fermentada
Masilla no extruida	MC	MCF
Masilla extruida	MCE	MCEF

Donde MC es masilla de cervecería sin tratamiento, MCE es masilla de cervecería extruida, MCF es masilla de cervecería fermentada y MCEF masilla de cervecería extruida fermentada.

Cuadro 7. Lista de tratamientos y códigos de muestras.

Código	Descripción
MC	Masilla de cervecería sin tratamiento
MCF 24 h	Masilla de cervecería sin tratamiento + Fermentación en sólido por 24 h
MCF 48 h	Masilla de cervecería sin tratamiento + Fermentación en sólido por 48 h
MCF 72 h	Masilla de cervecería sin tratamiento + Fermentación en sólido por 72 h
MCF 96 h	Masilla de cervecería sin tratamiento + Fermentación en sólido por 96 h
MCF 120 h	Masilla de cervecería sin tratamiento + Fermentación en sólido por 120 h
MCF 144 h	Masilla de cervecería sin tratamiento + Fermentación en sólido por 144 h
MCF 168 h	Masilla de cervecería sin tratamiento + Fermentación en sólido por 168 h
MCM	Masilla de cervecería molida
MCMF 24 h	Masilla de cervecería molida + Fermentación en sólido por 24 h
MCMF 48 h	Masilla de cervecería molida + Fermentación en sólido por 48 h
MCMF 72 h	Masilla de cervecería molida + Fermentación en sólido por 72 h
MCMF 96 h	Masilla de cervecería molida + Fermentación en sólido por 96 h
MCMF 120 h	Masilla de cervecería molida + Fermentación en sólido por 120 h
MCMF144 h	Masilla de cervecería molida + Fermentación en sólido por 144 h
MCMF168 h	Masilla de cervecería molida + Fermentación en sólido por 168 h
MCE	Masilla de cervecería extruido
MCEF 24 h	Masilla de cervecería extruido + Fermentación en sólido por 24 h
MCEF 48 h	Masilla de cervecería extruido + Fermentación en sólido por 48 h
MCEF 72 h	Masilla de cervecería extruido + Fermentación en sólido por 72 h
MCEF 96 h	Masilla de cervecería extruido + Fermentación en sólido por 96 h
MCEF 120 h	Masilla de cervecería extruido + Fermentación en sólido por 120 h
MCEF144 h	Masilla de cervecería extruido + Fermentación en sólido por 144 h
MCEF168 h	Masilla de cervecería extruido + Fermentación en sólido por 168 h

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Masilla de Cervecería Tratada por Procesos de Molienda y Extrusión

6.1.1 Proceso de Secado en la Masilla de Cervecería

La masilla de cerveza contenía una humedad inicial del 76% la cual es un porcentaje alto y la hace susceptible a descomposición por crecimiento microbiano. Por ello se realizó el proceso de secado en horno (45-50°C) por 48 h llegando a una humedad final del 2.2%. Este proceso se considera el método más adecuado para la conservación de la masilla de cerveza; sin embargo, debe realizarse a temperaturas <60°C (Lynch *et al.*, 2016). Debido a los tiempos prolongados dentro del horno sería de gran importancia disminuirlo y para ello se podrían utilizar equipos tales como prensas o centrífugas para eliminar el agua sin agregar calor, aunque podría ser contraproducente debido a que puede incrementar los costos de producción.

6.1.2 Proceso de Molienda en la Masilla de Cervecería

Es necesario reducir el tamaño de partículas de la masilla de cerveza, por ello se utilizó el proceso de molienda, el cual nos permitió reducir el tamaño de las mismas. Esta reducción de partículas conduce a un aumento en el área superficial y una reducción del grado de polimerización. Sin embargo, la molienda tiene un alto requerimiento energético, por lo que en términos económicos no se considera viable para las empresas, ya que el precio de energía sigue en aumento (Quintero *et al.*, 2011). Además, el proceso de molienda se utilizó para compararlo con el proceso de extrusión.

6.1.3 Proceso de Extrusión en la Masilla de Cervecería

El proceso de extrusión consistió en hacer que el material fuera transportado entre los tornillos del extrusor y la compresión que ejercen los tornillos provoque una fragmentación de la masilla de cerveza, ya que la compresión provoca una reducción de tamaño y una desfibrilación del material (Marone *et al.*, 2019) y de esta manera cumplir con el objetivo principal de investigación. Por otra parte, se ha estimado un requerimiento total de energía de 0.22-0.69 kWh/t del proceso de extrusión, el cual es más bajo en comparación con la energía requerida durante el proceso de molienda de cuchillas (20 kWh/t) (Vidal *et al.*, 2011). La energía mecánica específica (SME), por sus siglas en inglés, obtenida durante el proceso consistió de 0.27 kWh/t la cual se encontró dentro de lo reportado por la literatura.

6.2. Composición Química de la Masilla de Cervecería

6.2.1 Cuantificación de Carbohidratos Estructurales

En el cuadro 8 se muestran los resultados de la cuantificación de carbohidratos estructurales de la masilla de cerveza. La cantidad de extractos solubles en agua y en etanol fue de 10.9% y 13.2% respectivamente, esto quiere decir que la masilla de cerveza presentó 24% de material no estructural, en donde se encontraban componentes que no están químicamente unidos a la materia prima y entre los que se incluye, sacarosa, nitritos, nitratos, cenizas, clorofila y ceras. Estos extractos comprenden los componentes no estructurales que posiblemente puedan interferir en los análisis de caracterización de la materia prima (Sluiter *et al.*, 2008). Por otra parte, se obtuvieron valores de lignina de 18.9%, hemicelulosa 26.4% y 13.8% de celulosa. Estos valores se encuentran dentro de lo reportado en la literatura (Mussatto *et al.*, 2006, Xiros *et al.*, 2009). El contenido de hemicelulosa resultó de gran interés, ya que en ella se encuentran o derivan los arabinoxilanos, a pesar de ello la masilla de cerveza es conocida por tener un alto contenido de lignina incluso

mayor que el bagazo de caña, la paja de arroz o la cebada (entre un 15-18%), la cual puede afectar la liberación de arabinosilanos debido al impedimento estérico.

Cuadro 8. Cuantificación de los carbohidratos estructurales de la masilla de cervecería sin tratamiento (MC).

Componente	MC (%)
Celulosa	13.8±0.1
Hemicelulosa	26.4±0.5
Lignina	18.9±0.2
Extractos solubles en agua	10.9±0.9
Extractos solubles en etanol	13.2±0.3

*Cada valor representa el promedio del triplicado de la muestra ±desviación estándar, los valores son reportados en base seca.

6.2.2 Contenido de Humedad

Se determinó el contenido de humedad en la masilla de cervecería sin tratamiento, masilla molida y masilla extruida, obteniendo valores de 2.2%, 4.2% y 8.4% respectivamente, siendo estos resultados adecuados para su uso de acuerdo a Lynch *et al.* (2016), debido a que recomiendan un valor < 10% de humedad.

6.2.3 Contenido de Ceniza

El contenido de ceniza no presentó diferencia significativa entre cada una de las muestras (Cuadro 9), los valores fueron de 4.6% en la masilla de cervecería sin tratamiento y en la masilla extruida, mientras que en la masilla molida fue de 4.7%. La fracción de ceniza es el material inorgánico o mineral obtenido tras la incineración, la mayoría de los minerales están asociados con las glumas, pericarpio y la capa de aleurona, siendo estos componentes los mismos que conforman la masilla de cervecería. Los resultados de ceniza coinciden con lo reportado en la literatura (Aliyu y Bala,

2011; Bianco *et al.*, 2020). Por otra parte, podemos apreciar que al realizar el proceso de extrusión o molienda no se encuentra una modificación en el contenido mineral, lo que sí podría modificar este valor es el tipo de granos utilizados durante el proceso de elaboración de la cerveza.

6.2.4 Contenido de Lípidos

El contenido de lípidos en cada muestra no presentó diferencia significativa (Cuadro 9), el contenido de lípidos de la masilla de cervecería sin tratamiento fue de 11.9% mientras que en la masilla extruida y masilla molida fue de 12.0% y 11.7% respectivamente. Estos valores fueron similares a lo reportado por otros autores (2.5-13%) (Lynch *et al.*, 2016; Aliyu y Bala, 2011; Bianco *et al.*, 2020). Al ser el grano de cebada el ingrediente principal para la elaboración de la cerveza se ha reportado que el contenido de lípidos es de 1.8-4% (Serna-Saldívar, 2016) lo cual lo hace mucho menor en comparación con la masilla de cervecería. El aumento en el contenido de lípidos en la masilla de cervecería está relacionado por la composición química del grano de cebada y el cambio que surge al momento de pasar por el proceso de malteado al haber pérdida en el contenido de almidón en el grano de cebada y el remanente es el concentrado del resto de los compuestos (Cozzolino y Degner, 2016). Por otra parte, podemos apreciar que al realizar el proceso de extrusión o molienda no existe modificación en el contenido lipídico, lo que sí podría modificar este valor es el tipo de granos y/o adjuntos utilizados durante el proceso de elaboración de la cerveza.

6.2.5 Contenido de Proteínas

El contenido de proteína no presentó diferencia significativa entre cada una de las muestras (Cuadro 9), los valores fueron de 21.6% en la masilla de cervecería sin tratamiento, mientras que en la masilla extruida y masilla molida fue de 21.8% y 22.2% respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de lo reportado en la literatura, ya que diversos autores han encontrado entre un 14.2% y 31.0% de proteína (Qin *et al.*, 2018; Lynch *et al.*, 2016). La masilla puede ser considerada

como un residuo de cereales alto en proteína, en comparación con subproductos de cereales como salvado de trigo (13-18%), salvado de arroz (14%) y rastrojo de maíz (5.7-7.4%) (Roth et al., 2019; Martínez-Trejo *et al.*, 2012). Este aumento en el porcentaje de proteína fue debido a que éstas se encuentran unidas principalmente al pericarpio, la capa aleurona y la cáscara del grano de cebada, además de contener cantidades residuales de proteína de levadura ya que no se llevan pasos de fraccionamiento o purificación, siendo estos los componentes estructurales de la masilla de cervecería (Niemi *et al.*, 2012). Sin embargo, durante el proceso de maceración la proteína de la masilla de cervecería se degrada parcialmente provocando su desnaturalización (Mussatto *et al.*, 2006) y promoviendo una posible pérdida de las propiedades biológicas de la misma. Por otra parte, podemos apreciar que, al realizar el tratamiento por extrusión o molienda, estos no modifican el contenido proteico, lo que sí podría modificar este valor es el tipo de granos utilizados durante el proceso de elaboración de la cerveza

6.2.6 Contenido de Fibra Dietaria Insoluble, Soluble y Total

La fibra dietaria es el componente mayoritario de la masilla de cervecería, ya que está conformado principalmente por material lignocelulósico. En el cuadro 9 se muestra el contenido de fibra dietaria total, soluble e insoluble. En la masilla sin tratamiento, molida y extruida, se encontró un contenido de fibra dietaria total del 61.8%, 62.8% y 62.9%, por lo que no se presentó diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre cada una de las muestras. Por lo que podemos apreciar que al realizar el proceso de extrusión o molienda no existe modificación en el contenido de fibra dietaria total, lo que sí podría modificar este valor es el tipo de granos y/o adjuntos utilizados durante el proceso de elaboración de la cerveza.

Por otra parte, en la fibra dietaria insoluble los valores fueron de 61.6% en la masilla sin tratamiento, 60.8% masilla molida y 60.7% masilla extruida, mientras que la fibra soluble fue de 0.2%, 2.0% y 2.2%, respectivamente, por lo que existió una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) de la fracción soluble e insoluble entre la masilla sin tratamiento y las muestras tratadas mediante procesos físicos (molienda o extrusión). El aumento en el contenido de fibra dietaria soluble se debió a que la pared celular de la masilla de cervecería se encuentra conformada por grandes cadenas de polímeros ramificados, constituidos por diferentes enlaces cruzados los cuales

dificultan que el material sea soluble en un ambiente acuoso (Zhang *et al.*, 2016), por lo que al realizar los tratamientos físicos estos lograron romper algunos de los enlaces cruzados.

Se puede apreciar que, al llevar a cabo el proceso por extrusión o molienda, estos modifican la fracción solubles de la fibra, además, al comparar el rendimiento de la fibra soluble se encontró que existió un incremento de 10 veces más en la masilla molida y 11 veces más en la masilla extruida con respecto a la masilla que no se le realizó ningún proceso. Por lo que, estos resultados son de gran interés debido a los beneficios nutricionales y funcionales que aporta la fibra soluble dentro de la salud humana (Lattimer y Haub, 2010).

Vasanthan *et al.* (2002), trabajaron con harina de cebada y evaluaron el efecto de las condiciones de extrusión sobre la fibra dietaria total, soluble e insoluble concluyendo que el contenido de fibra soluble aumentó debido a la cocción por extrusión. Por otra parte, Espinosa-Ramírez *et al.* (2020), compararon diferentes cereales integrales, pseudocereales y leguminosas para producir harinas tecno-funcionales mediante extrusión de alto cizallamiento y reportaron que en 4 de sus 9 muestras la fibra dietaria soluble incrementó en comparación con las muestras que no fueron tratadas por extrusión.

El proceso de extrusión lo han categorizado por ser contraproducente ya que puede disminuir la fibra dietaria en lugar de incrementarla. Sin embargo, la reducción se ha asociado con la liberación de oligosacáridos de fracciones tanto insolubles como solubles, haciéndolas digeribles durante el ensayo y evitando así su cuantificación (García-Amezquita *et al.*, 2019).

Cuadro 9. Composición química de la masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM) y masilla de cervecera extruida (MCE).

Componente	MC (%)	MCM (%)	MCE (%)
Humedad	2.2±0.2 ^c	4.2±0.1 ^b	8.4±0.1 ^a
Proteína	21.6±0.5 ^a	22.2±0.1 ^a	21.8±0.3 ^a
Grasa	11.9±0.2 ^a	11.7±0.3 ^a	12.0±0.1 ^a
Ceniza	4.6±0.1 ^a	4.7±0.1 ^a	4.6±0.0 ^a
Fibra Dietaria Total	61.8±0.6 ^a	62.8±0.7 ^a	62.9±1.8 ^a
Fibra Dietaria Insoluble	61.6±0.5 ^a	60.8±0.5 ^b	60.7±1.1 ^b
Fibra Dietaria Soluble	0.2±0.1 ^b	2.0±0.2 ^a	2.2±0.7 ^a

*Cada valor representa el promedio del triplicado de la muestra ±desviación estándar. Los valores con letras distintas en cada renglón son significativamente diferentes (p≤0.05).

6.3 Caracterización Física de la Masilla de Cervecería

6.3.1 Distribución de Tamaño de Partículas

En la figura 5 se muestran los resultados de la distribución de tamaño de partículas. Los datos muestran que la masilla sin tratamiento tuvo una alta cantidad de partículas retenidas en el tamiz No. 20 (0.8 mm), mientras la masilla molida y extruida tienen una mayor cantidad de partículas retenidas entre los tamices del No. 40 al 80 (0.40 mm y 0.16 mm), demostrando que la masilla tratada mediante los procesos físicos (molienda o extrusión) reducen el tamaño de las partículas. Con la finalidad de liberar arabinosidos presentes en la masilla de cerveza fue necesario realizar los tratamientos de molienda y extrusión, ya que un tamaño de partícula por arriba de la malla No 40 (0.40 mm) tiene bajo efecto sobre la hidrólisis de la biomasa (Hendriks y Zeeman, 2009), lo cual limita la liberación, por ello, se evaluó el perfil granulométrico resultante de la masilla sin tratamiento, masilla molida y masilla extruida.

Reis *et al.* (2015), evaluaron la influencia del tamaño de partículas de la masilla de cerveza sobre la extracción de AX y reportaron que con un tamaño de partículas de 0.25 mm a 0.16 mm se obtienen mayores rendimientos. Sin embargo, un tamaño de partículas inferior a 0.16 mm aumentó la pérdida de los AX durante su extracción. Por otra parte, la metodología del NREL (2008) recomienda no tener un tamaño de partícula muy pequeño ya que conlleva a una excesiva degradación de los polímeros.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con lo recomendado por Reis *et al.* (2015), se obtuvo una retención de partículas desde la malla No 60 (0.25 mm) hasta la No 80 (0.16 mm) del 6.5% en la masilla sin tratamiento, 52.6% en la masilla molida y 64.8% en la masilla extruida, el cual es el tamaño de partícula adecuado para incrementar el rendimiento de extracción de arabinosidos. Por lo que, el proceso de extrusión es una buena opción para ser utilizado como tratamiento para la reducción de tamaño de partículas y con ello incrementar los rendimientos de extracción de arabinosidos.

Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con lo recomendado por Reis *et al.* (2015), se obtuvo una retención de partículas superior a la malla No 80 (0.16 mm) de

1.3% en la masilla extruida, 1.5% en la masilla sin tratamiento y 13.7% en la masilla molida, el cual es el tamaño que aumentó la pérdida de extracción de los arabinosilanos. Por lo que, el proceso de molienda si es una buena opción para ser utilizada como tratamiento para la reducción de tamaño de partícula, sin embargo, no lo es para incrementar los rendimientos de extracción de arabinosilanos debido a que conlleva a una excesiva degradación de los mismos.

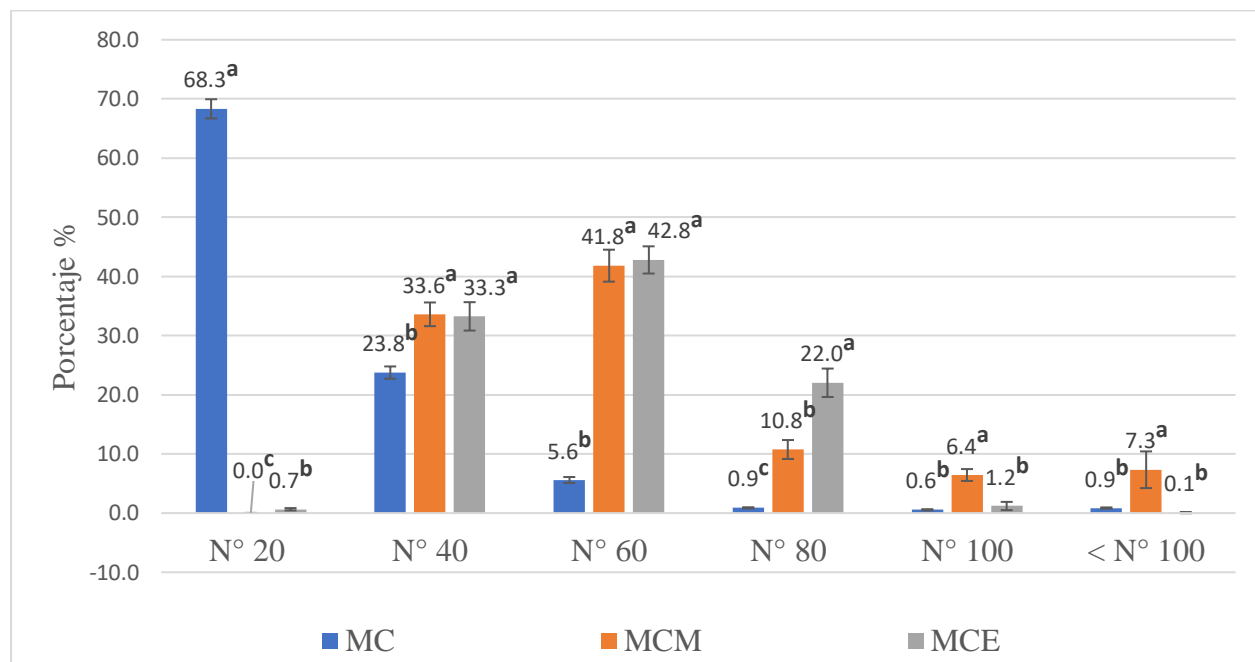


Figura 5. Distribución de tamaño de partículas de la masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM) y masilla de cervecera extruida (MCE).

*Cada valor representa el promedio del triplicado de la muestra. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

6.3.2 Índices de Absorción de Agua y Solubilidad en Agua

Los resultados del índice de absorción de agua (WAI) y el índice de solubilidad en agua (WSI) en la masilla de cervecera sin tratamiento, molida y extruida se resumen en el cuadro 10. Dicha caracterización es un parámetro de gran importancia para nuestro objetivo de incrementar la liberación de AX solubles en medio acuoso, debido a que el WAI nos indica la cantidad de agua retenida en la muestra, mientras que el WSI nos indica la cantidad de polímeros que son solubles

en agua. Los resultados muestran que la masilla sin tratamiento presentó un mayor porcentaje de WAI que fue de 6.7%, además existió diferencia significativa $p \leq 0.05$ en comparación con las muestras tratadas por molienda y extrusión, que presentaron valores de 5.1% y 4.9%, respectivamente. Este resultado nos indicó que la aplicación de tratamientos físicos (molienda o extrusión) disminuyó la cantidad de agua retenida en la masilla de cervecera, en comparación con la masilla de cervecera que no se le realizó ningún proceso en el cual existe una mayor cantidad de agua retenida. Por otra parte, los resultados muestran que la masilla extruida fue el que presentó un mayor porcentaje de WSI el cual fue de 3.1%, por lo que existió una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en comparación con la masilla sin tratamiento y la masilla molida, los cuales presentaron valores de 1.5% y 2.7%, respectivamente. Este resultado nos indicó que al realizar el proceso de extrusión se incrementó la cantidad de polímeros solubles que estaban retenidos en la masilla de cervecera.

La razón de presentar un WAI bajo en la masilla molida y extruida en comparación con la masilla sin tratamiento se debió a que el tratamiento físico fragmentó la estructura lignocelulosa. Esto es debido a que surge una reducción del volumen ocupado por el polímero de la fibra después de hincharse en exceso de agua (Myat y Ryu, 2014). Mientras que la razón del cambio de WSI entre cada una de las muestras surge por la reducción de tamaño de partículas, lo cual provocó que el material lignoceluloso se fragmente y del mismo modo disminuyan los enlaces cruzados los cuales están involucrados en la retención de agua (Jeong y Toledo, 2004).

Cuadro 10. Índices de absorción de agua y solubilidad en agua en la masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM) y masilla de cervecera extruida (MCE).

Parámetro	MC (%)	MCM (%)	MCE (%)
WAI	6.7±0.1 ^a	5.1±0.2 ^b	4.9±0.1 ^b
WSI	1.5±0.1 ^c	2.7±0.2 ^b	3.1±0.1 ^a

*Cada valor representa el promedio del triplicado de la muestra ±desviación estándar. Los valores con letras distintas en cada renglón son significativamente con una $p \leq 0.05$. WAI = índice de absorción de agua; WSI = índice de solubilidad en agua.

6.4. Proceso de Fermentación en Estado Sólido

6.4.1 Fermentación en Estado Sólido con una Cepa de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*

El proceso de fermentación en estado sólido se realizó para evaluar la liberación de arabinosilanos solubles con el hongo *Fusarium oxysporum* en la masilla sin tratamiento, molida o extruida, en matraces Erlenmeyer, como se describe en la sección 5.3.2. Se analizaron las muestras cada 24 h durante 7 días para determinar el pico máximo de liberación de arabinosilanos, se tomaron fotografías en ciertos momentos durante la fermentación como evidencia del crecimiento del hongo en la masilla de cervecera sin tratamiento, molida o extruida (Figura 6). Desde las 24 h hasta las 168 h de incubación se pudo apreciar el crecimiento micelial (datos no presentados) que cubría el sustrato, el crecimiento del hongo es de gran importancia debido a que secreta enzimas, mismas que descomponen la materia para asimilar los nutrientes (Sánchez, 2009).

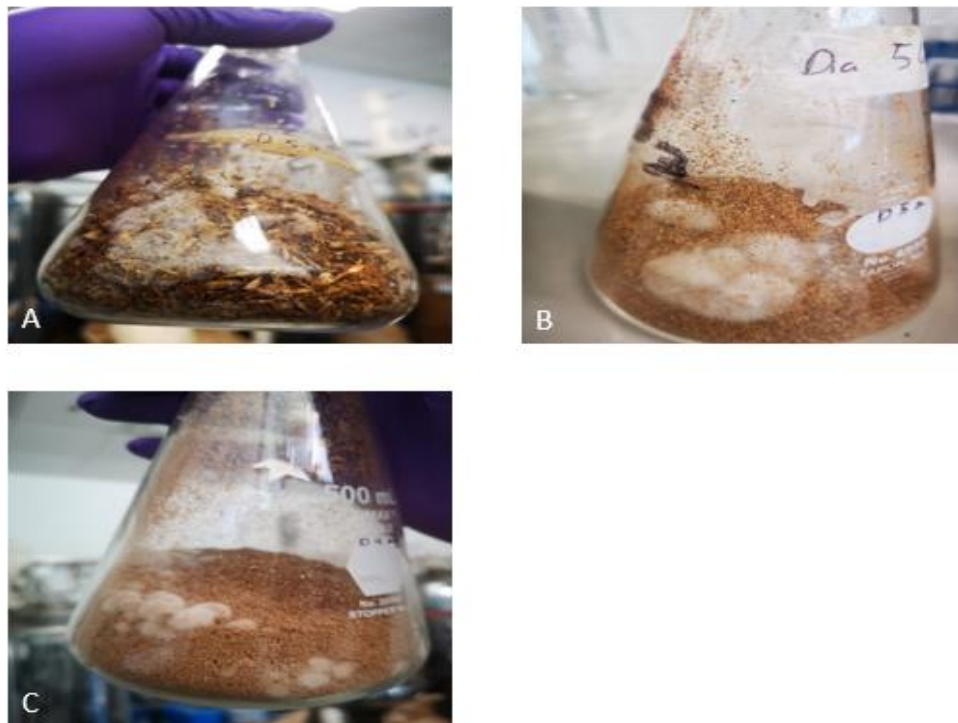


Figura 6: Fermentación en estado sólido de masilla de cervecera con una cepa de *Fusarium oxysporum f. sp. meloni*. (A) Masilla de cervecera sin tratamiento (MC), (B) Masilla de cervecera molida (MCM) y (C) Masilla de cervecera extruida (MCE).

Existen variables que condicionan el crecimiento del microorganismo, sin embargo, el factor más decisivo sobre la fermentación en estado sólido es la actividad de agua (A_w) ya que influye tanto en el crecimiento como en el metabolismo de los mismos (Rudakiya, 2019). En la figura 7 se observa la actividad de agua a lo largo de la cinética de fermentación de la masilla de cervecería fermentada sin tratamiento, molida o extruida.

Se observó que la A_w se mantuvo en 0.9 e incluso existió un aumento, la razón de este cambio puede asociarse a que el hongo este liberando agua durante su proceso de respiración debido a que durante la respiración aeróbica se crea dióxido de carbono y agua como subproductos. Además, se ha reportado que el *Fusarium oxysporum* crece en condiciones aerobias (Xiros *et al.*, 2008), por lo que esta liberación de agua influye en la medición de A_w . El principio de la medición se basa en el equilibrio de presión de vapor y una vez que la muestra llega al punto de equilibrio, el equipo (AqueaLab) calcula la humedad relativa con el método de punto de saturación, y de igual manera ha sido reportado el aumento de la A_w durante el proceso de fermentación (Olagunju *et al.*, 2018).

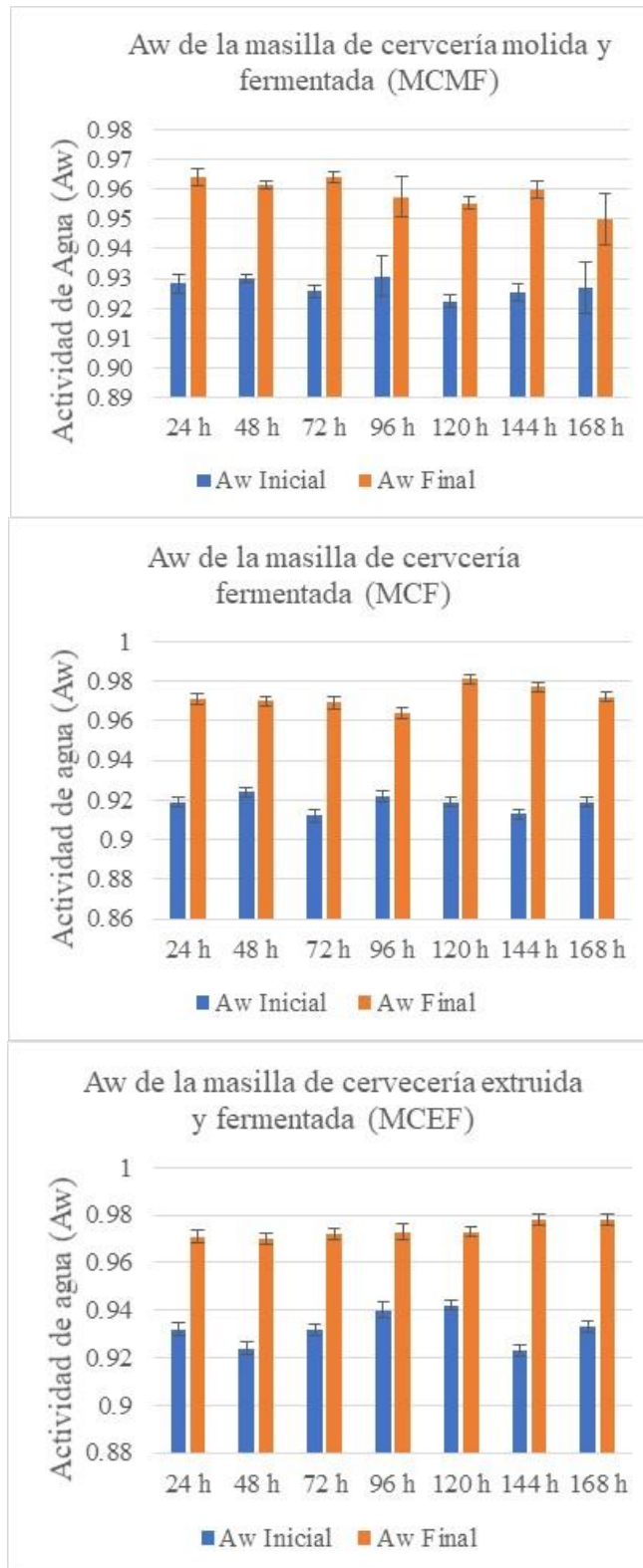


Figura 7. Actividad de agua a lo largo de la cinética de fermentación de la masilla de cervcería sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervcería molida fermentada (MCMF) y masilla de cervcería extruida fermentada (MCEF), por *Fusarium oxysporum* durante 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h.

6.5 Cuantificación de Arabinosilanos Solubles

6.5.1 Contenido de Arabinosilanos Solubles en los Extractos de la Masilla de Cervecería

Los resultados obtenidos de la cuantificación de arabinosilanos solubles en los extractos de masilla sin tratamiento, molida y extruida se muestran en la figura 8. Los valores muestran que la masilla a la cual no se le realizó el proceso de fermentación presentó el valor más bajo de AX solubles. Sin embargo, cabe destacar que la masilla extruida presentó el valor más alto 9.69% teniendo un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en comparación con la masilla sin tratamiento y la masilla molida, las cuales presentaron valores de 1.47% y 2.98%, respectivamente. Por otra parte, el mayor resultado de AX solubles fue durante el proceso de fermentación, siendo la masilla extruida la que presentó el valor más alto ($p \leq 0.05$), el cual fue de 63.28% en comparación con la masilla sin tratamiento y la masilla molida, las cuales presentaron valores de 28.47% y 52.45%, respectivamente.

Por otra parte, mediante la cinética de fermentación se pudo apreciar como el contenido de AX solubles en los extractos fue incrementado en cada una de las muestras (masilla sin tratamiento, molida o extruida). Este cambio se puede asociar a las enzimas que esté segregando el hongo, en este caso las xilanasas, debido a que estas enzimas son responsables de hidrolizar el xilano y convertirlo a xilosa y xilo-oligosacáridos, ya que rompen los enlaces glucosídicos mediante un mecanismo de inversión o retención en el que el carbono anomérico está invertido o conserva su configuración estereoquímica (Srivastava *et al.*, 2020). Así mismo, al finalizar el proceso de fermentación se pudo observar durante la cinética una disminución del contenido de AX solubles en los extractos, y esto se puede asociar a que durante la fermentación el microorganismo esté utilizando estos polisacáridos durante su proceso metabólico y sea utilizado para su crecimiento. Sánchez (2009) clasificó al *Fusarium oxysporum* como un tipo de hongo de pudrición marrón, los cuales tienen una mayor afinidad a la degradación de la celulosa y hemicelulosa, por lo que producen una mayor proporción de estas enzimas (celulasas, xilanasas) para convertir los polímeros en oligómeros o monómeros y ser absorbidos por el mismo.

Es de gran importancia resaltar que el tipo de enzima es un factor determinante para incrementar los valores de arabinosilanos. En este caso las xilanasas se clasifican de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, sin embargo, las xilanasas más significativas son la GH10 y GH11. Se ha investigado que las xilanasas GH10 son más activas en sustratos solubles, mientras que las GH11 prefieren xilanos poliméricos insolubles, por lo cual libera más arabinosilanos solubles en medio acuoso. A pesar del gran interés en las xilanasas GH11 diversos autores han reportado una mayor presencia de xilanasas del tipo GH10 (Alconada y Martínez, 1994; Christakopoulos *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1997) en comparación con las GH11 (Christakopoulos *et al.*, 1996; Gómez-Gómez *et al.*, 2001), producidas por *Fusarium oxysporum*, por lo cual podría ser de gran interés investigar el tipo de xilanasas que se esté generando durante el proceso metabólico del hongo.

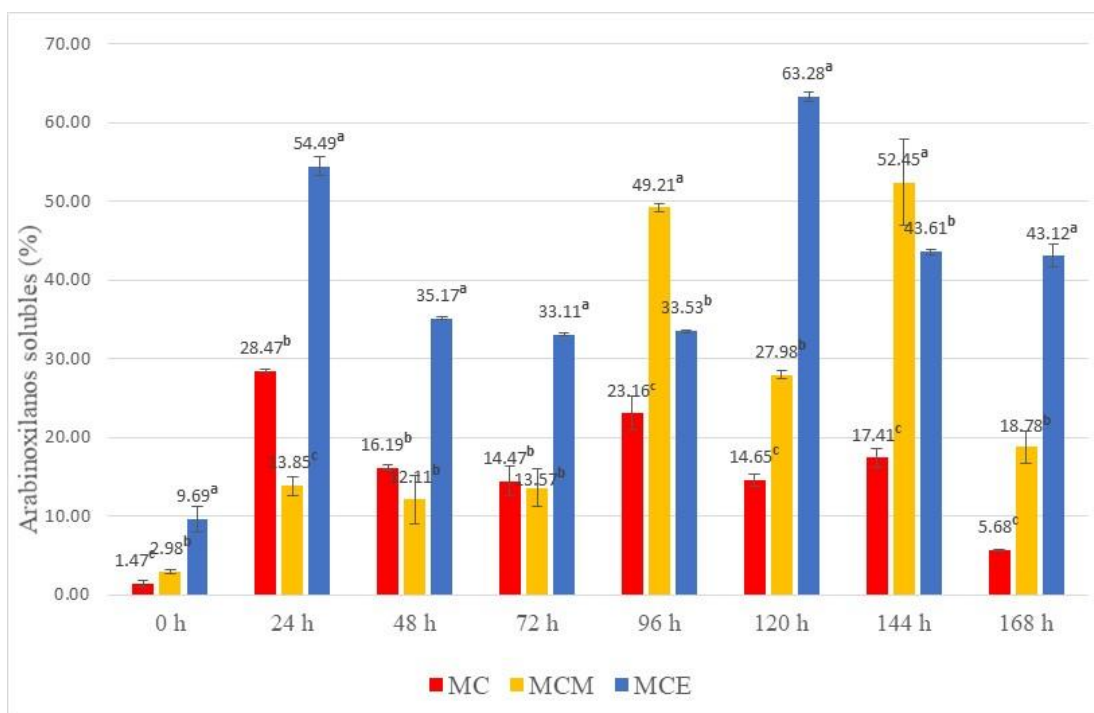


Figura 8. Contenido de arabinosilanos solubles en los extractos de la masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM) y masilla de cervecera extruida (MCE), fermentada con *Fusarium oxysporum* durante 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h.

*Cada valor representa el promedio del triplicado de la muestra \pm desviación estándar. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

6.5.2 Rendimiento de Arabinoxilanos Solubles de la Masilla de Cervecería

El rendimiento de arabinoxilanos solubles de la masilla de cerveza sin tratamiento, molida y extruida se muestran en la figura 9. Los resultados muestran que la masilla sin proceso de fermentación en estado sólido presentó los valores menores (0.03%), en comparación con aquellas sometidas a fermentación (9.58%).

Por otra parte, se puede observar que el rendimiento de arabinoxilanos solubles con el proceso de molienda fue de 0.53%, mientras que el proceso de extrusión arrojó un rendimiento del 0.70%. Entre cada uno de los procesos antes mencionados no se encontró una diferencia significativa ($p \geq 0.05$). Aunque el proceso de extrusión no haya presentado diferencia significativa respecto al proceso de molienda, una de sus mayores ventajas sobre la molienda es su bajo consumo de energía, el cual ha sido explicado en la sección 6.1.3. En donde existió diferencia significativa ($p \leq 0.05$) fue en la masilla sin tratamiento, la cual presentó un rendimiento de arabinoxilanos solubles de 0.03%, en lo que se traduce a un incremento de 17 veces más al utilizar el proceso de molienda y 23 veces más al utilizar el proceso por extrusión. El incremento del contenido de arabinoxilanos solubles se debe al proceso físico (molienda/extrusión) debido a que estos procesos fragmentan enlaces cruzados, mismos que dificultan que el material sea soluble en medios acuosos (Zhang *et al.*, 2016). Además, se puede apreciar que los resultados obtenidos en esta prueba son proporcionales a lo establecido en la sección 6.2.6.

Por el contrario, durante el proceso de fermentación se obtuvieron mayores rendimientos siendo la masilla extruida la que presentó el valor más alto, el cual fue de 9.58% y presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en comparación con la masilla sin tratamiento y la masilla molida, las cuales presentaron valores de 2.95% y 6.24%, respectivamente. Esto quiere decir que al utilizar la masilla extruida fermentada se obtiene 3 veces más que la masilla sin tratamiento fermentada y 1.5 veces más que la masilla molida fermentada. Por otra parte, al comparar el rendimiento obtenido de la masilla extruida fermentada con las muestras a las que no se les realizó el proceso de fermentación se obtiene un rendimiento de 319 veces más que la masilla sin tratamiento, 18 veces más que la masilla molida y 15 veces más que la masilla extruida. Por lo que existe un efecto significativo ($p \leq 0.05$) entre el tipo de tratamiento físico (extrusión o molienda) y biológico (fermentación en estado sólido) sobre el rendimiento de arabinoxilanos solubles presentes en la masilla de cerveza.

Diversos investigadores han reportado los rendimientos de arabinosilanos extraídos de la masilla de cervecera. Coelho *et al.* (2016) utilizaron masilla de cervecera molida proporcionado por una empresa (Unicer-Bebidas SA) y la técnica de extracción fue a partir de agua (20°C) y agua caliente (80°C) obteniendo rendimientos del 0.5%. En comparación con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, los valores son muy similares en aquellas muestras a las que no se le realizó el proceso de fermentación (masilla molida y masilla extruida). Por otra parte, Reis *et al.* (2015), utilizaron masilla de cervecera molida proporcionada por una planta de microdestilería de la Universidad de College Cork Irlanda, teniendo como objetivo incrementar la extracción de arabinosilanos solubles mediante la extracción asistida por ultrasonido y autoclave, obteniendo rendimiento del 3.1%. En comparación con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, los valores son similares en las muestras de masilla sin tratamiento fermentada y masilla molida fermentada, sin embargo, para la masilla extruida y fermentada se obtuvieron valores mayores.

Por otra parte, Severini *et al.* (2015), reportaron un rendimiento de arabinosilanos solubles en masilla de cervecera mediante tratamiento enzimático de 10.3%, siendo este valor muy cercano a lo obtenido en nuestro trabajo (9.58%). Por otra parte, Coelho *et al.* (2016) y Reis *et al.* (2015) obtuvieron rendimientos del 20.8 y 20.7% respectivamente, sin embargo, estos últimos investigadores utilizaron tratamientos químicos para la extracción de los arabinosilanos, además de realizar hasta 3 veces el proceso de extracción. Las diferencias encontradas en comparación con estos últimos autores se deben al uso de agentes químicos los cuales solubilizan la hemicelulosa y, de este modo, hacen que la celulosa sea más accesible (Tomás-Pejo *et al.*, 2011).

Mediante la cinética se pudo determinar el pico máximo de liberación de arabinosilanos solubles en agua, el cual se presentó durante las 48 h en la masilla extruida, mientras que en la masilla molida y sin tratamiento se presentó durante las 96 h. Estos resultados son de gran importancia debido a que se puede optimizar el tiempo de fermentación y con ello disminuir los costos de producción ya que la masilla extruida presenta los valores más altos y en menor tiempo, al compararlo con la masilla molida y la masilla sin tratamiento. De igual manera, estas horas de fermentación fueron las que se tomaron para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales, ácidos fenólicos y capacidad antioxidante, los cuales se describen a continuación.

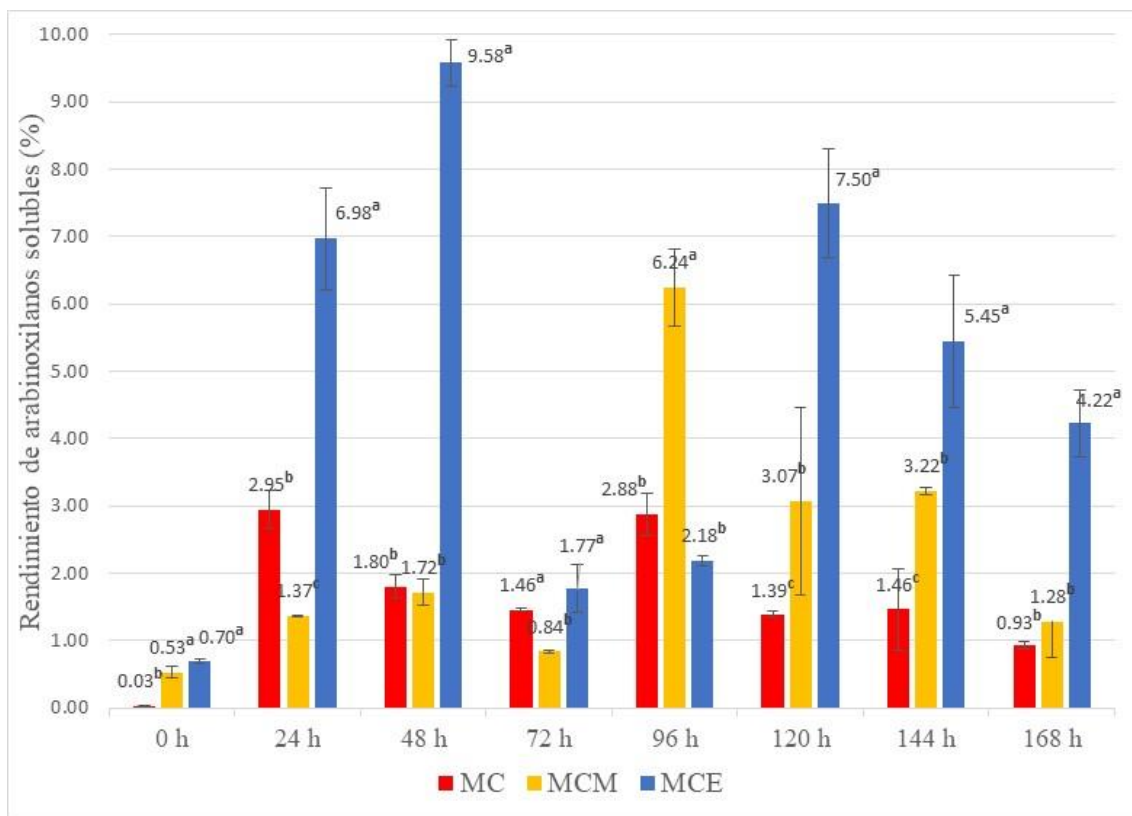


Figura 9. Rendimiento de arabinosilanos solubles de la masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM) y masilla de cervecera extruida (MCE), fermentada con *Fusarium oxysporum* durante 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h.

*Cada valor representa el promedio del triplicado de la muestra \pm Desviación Estándar. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

6.6 Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales, Ácidos Fenólicos y Capacidad Antioxidante

6.6.1 Compuestos Fenólicos Totales

El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de la masilla de cervecera sin tratamiento, molida, extruida y masilla de cervecera fermentada sin tratamiento, molida y extruida por *Fusarium oxysporum* durante 48 h y 96 h se muestran en el cuadro 11, los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (EAG/g) de muestra base seca.

Los CFT en la masilla extruida fueron de 2.28 mgEAG/g en base seca, presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a la masilla sin tratamiento y a la masilla molida las cuales presentaron valores de 1.70 mgEAG/g y 1.26 mgEAG/g, respectivamente. Este incremento pudo deberse al funcionamiento mecánico debido a que el extrusor utiliza presión, temperatura y cizallamiento elevado lo cual resulta en la degradación del material lignoceluloso, esto podría causar el incremento de los fenoles ligados y este incremento se asocia a que los compuestos fenólicos libres también incrementen (Zhang *et al.*, 2018). Por otra parte, Ti *et al.* (2015), evaluaron el efecto de la extrusión sobre los perfiles fitoquímicos en fracciones molidas de arroz y concluyeron que el uso del extrusor incrementó los CFT en salvado de arroz. Por lo que, el uso de extrusión incrementa los CFT en la masilla de cervecería.

Respecto al contenido de compuestos fenólicos libres se obtuvieron valores de 0.67 mgEAG/g en la masilla sin tratamiento lo cual presentó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a la masilla molida y extruida, las cuales presentaron valores de 0.58 (mgEAG/g) y 0.59 (mgEAG/g), respectivamente. Sin embargo, la proporción de compuestos fenólicos libres es mayor en la masilla molida debido a que cuenta con un 45.74% en comparación con la masilla sin tratamiento y la masilla extruida, las cuales mostraron una proporción de 39.40% y 25.71%, respectivamente y al existir una mayor proporción de compuestos libres es de gran importancia debido a que estos se encuentran de manera disponible. Por otra parte, se ha reportado que los compuestos fenólicos libres en masilla de cervecería con el uso de metanol como solvente para la extracción son de 0.5 mgEAG/g a 6.46 mgEAG/g (Ktenioudaki *et al.*, 2015; Meneses *et al.*, 2013), por lo que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los valores reportados.

Por el contrario, durante el proceso de fermentación se obtuvieron valores mayores de CFT y compuestos fenólicos libres en comparación con las muestras a las que no se sometieron a dicho proceso, esto se puede apreciar durante las primeras 48 h de fermentación, ya que en cada una de las muestras incrementaron en comparación con aquellas a las que no fueron sometidas. La razón de este suceso es debido a las enzimas (p. Ej., xilanasas, feruloil esterases) que producen los hongos durante el proceso de fermentación, estas enzimas rompen las paredes de las células (Sánchez 2009), debido a este rompimiento estérico entre la celulosa o hemicelulosa con el grupo carboxilo de ácido fenólico, se liberan fenólicos ligados. Además, se ha reportado que la fermentación en estado sólido ha incrementado la liberación de compuestos fenólicos y se ha reportado en subproductos de cereales (p. Ej., salvado de trigo, nejayote de maíz y masilla de cervecería) (Moore

et al., 2007; Acosta-Estrada *et al.*, 2019; da Costa-Maia *et al.*, 2020).

No obstante, las muestras fermentadas por 96 h presentaron valores bajos con respecto a las horas de fermentación anteriores en los CFT y compuestos fenólicos ligados. Este suceso se debe a que los hongos producen enzimas extracelulares, las cuales se encuentran involucradas en la degradación y conversión de los compuestos fenólicos presentes en el material lignoceluloso. Estas enzimas (p. Ej., lacasa, heme-tiolato peroxidasa, feruloil esterasa, tanasa) hidrolizan los compuestos fenólicos grandes a subunidades más pequeñas que luego pueden ser metabolizadas por las células fúngicas (Mäkelä *et al.*, 2015). Sin embargo, no se ha encontrado información sobre el transporte de los compuestos fenólicos desde el medio de crecimiento a la célula fúngica (Shary *et al.*, 2008).

Cuadro 11. Contenido de compuestos fenólicos totales de la masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM), masilla de cervecera extruida (MCE) y masilla de cervecera sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecera molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecera extruida fermentada (MCEF) por *Fusarium oxysporum* durante 48 h y 96 h.

Muestras	Contenido Fenólico (mgEAG/g)			
	Libres	Ligados	Totales	Proporción libres (%)
MC	0.67±0.04 ^a	1.03±0.05 ^c	1.70±0.09 ^b	39.40
MCM	0.58±0.03 ^b	0.68±0.02 ^b	1.26±0.05 ^c	45.74
MCE	0.59±0.02 ^b	1.70±0.13 ^a	2.28±0.15 ^a	25.71
MCF 48 h	1.19±0.03 ^b	1.69±0.11 ^a	2.88±0.14 ^a	41.21
MCMF 48 h	1.25±0.06 ^b	1.56±0.11 ^b	2.81±0.17 ^a	44.54
MCEF 48 h	1.64±0.07 ^a	0.73±0.05 ^c	2.37±0.12 ^b	69.21
MCF 96 h	1.32±0.04 ^b	1.16±0.03 ^a	2.48±0.07 ^a	53.33
MCMF 96 h	1.12±0.04 ^c	1.01±0.03 ^b	2.13±0.07 ^b	52.78
MCEF 96 h	1.41±0.06 ^a	0.56±0.03 ^c	1.97±0.09 ^c	71.47

*Cada valor representa el promedio del duplicado de la muestra ±Desviación Estándar. Los valores con letras distintas dentro de las columnas son significativamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

6.6.2 Ácidos Fenólicos

El perfil de los ácidos fenólicos determinados por HPLC se muestra en los cuadros 12, 13 y 14.

Los resultados obtenidos muestran que el ácido ferúlico fue el de mayor presencia en las muestras que no fueron fermentadas, obteniendo valores de 12.28 mg/g en la masilla sin tratamiento, 9.21 mg/g en la masilla molida y 28.19 mg/g en la masilla extruida, de los cuales se encontraron una proporción de ácido ferúlico libre del 0.89%, 1.19% y 0.53%, respectivamente. Se ha reportado que el ácido ferúlico es el ácido hidroxicinámico con mayor presencia en la masilla de cervecería (Ikram *et al.*, 2017), por lo que coincide con los resultados obtenidos.

En segundo lugar, se encontró el ácido p-cumárico obteniendo valores de 2.27 mg/g en la masilla sin tratamiento, 1.17 mg/g en la masilla molida y 10.45 mg/g en la masilla extruida, de los cuales se encontraron una proporción de ácido p-cumárico libre del 1.32%, 1.70% y 0.57%, respectivamente. Diversos autores han reportado al ácido p-cumárico como el segundo compuesto con mayor presencia en la masilla de cervecería, sin embargo, nuestros valores obtenidos se encuentran por arriba de lo reportado (de 0.6 mg/g a 1.1 mg/g) (Szwajgier *et al.*, 2010; Niemi *et al.*, 2012). Por otra parte, se encontró un contenido de ácido cafeico de 0.21 mg/g en la masilla sin tratamiento, 0.19 mg/g en la masilla molida y 0.35 mg/g en la masilla extruida, de los cuales no se encontraron de manera libre. Estos valores se encontraron en una alta concentración con respecto a lo reportado por Ikram *et al.* (2017), (0.1 mg/g). Las diferencias encontradas en comparación con otros autores pudieron deberse al tipo de malta utilizada para la elaboración de la cerveza, el tipo de adjunto utilizado y la técnica de extracción. La técnica de extracción merece atención ya que tiene un gran efecto en el contenido de compuestos fenólicos, ya que los solventes varían dependiendo de la técnica utilizada y pueden mejorar la extracción de compuestos, influido por, los tiempos de reacción (durante la hidrólisis alcalina) o extracción, las temperaturas y/o los tratamientos físicos utilizados (Meneses *et al.*, 2013).

Por otra parte, se puede apreciar que, en cada una de las muestras, que fueron sometidas al proceso de fermentación, se incrementó la proporción libre en cada uno de los ácidos fenólicos al compararlo con las muestras que no se fermentaron. Sin embargo, la masilla extruida presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el ácido ferúlico con respecto a la masilla sin tratamiento y masilla molida. De igual manera podemos apreciar que la proporción de ácido ferúlico libre fue de 11.12% a las 48 h de fermentación y que posteriormente a las 96 h disminuyó a 9.01%. Este cambio puede explicarse a que el hongo utilizó los ácidos hidroxicinámicos como parte de su proceso metabólico (Mäkelä *et al.*, 2015). Además, estos resultados de comportamiento son comparados con los CFT y los rendimientos de AX. Los resultados obtenidos de la cuantificación fueron de

gran importancia para nuestro objetivo de incrementar la liberación de AX solubles en medio acuoso, debido a que en la estructura de los AX se encuentra presente el ácido ferúlico (sección 2.2.2) y al obtener una mayor proporción de ácido ferúlico de forma libre afirma la hipótesis propuesta en esta tesis.

Cuadro 12. Contenido de ácido cafeico en masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM), masilla de cervecera extruida (MCE) y masilla de cervecera sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecera molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecera extruida fermentada (MCEF) por *Fusarium oxysporum* durante 48 h y 96 h.

Ácidos Fenólicos	Muestra	Contenido de ácidos fenólicos (mg/g de muestra base seca)			
		Libres	Ligados	Totales	Proporción libres (%)
Ácido cafeico	MC	ND	0.21±0.01 ^b	0.21±0.01 ^b	0
	MCM	ND	0.19±0.02 ^b	0.19±0.02 ^b	0
	MCE	ND	0.35±0.02 ^a	0.35±0.02 ^a	0
	MCF 48 h	0.01±0.00 ^a	0.36±0.01 ^a	0.37±0.01 ^a	2.7
	MCMF 48 h	0.02±0.00 ^a	0.29±0.02 ^a	0.31±0.02 ^a	6.45
	MCEF 48 h	0.01±0.00 ^a	0.15±0.01 ^b	0.16±0.01 ^b	6.25
	MCF 96 h	0.01±0.00 ^a	0.26±0.05 ^a	0.27±0.05 ^a	3.70
	MCMF 96 h	0.01±0.00 ^a	0.21±0.00 ^a	0.22±0.00 ^b	4.54
	MCEF 96 h	0.01±0.00 ^a	0.11±0.01 ^b	0.12±0.01 ^c	8.33

*Cada valor representa el promedio del duplicado de la muestra ±desviación estándar. Los valores con letras distintas dentro de las columnas son significativamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

Cuadro 13. Contenido de ácido p-cumárico en masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM), masilla de cervecera extruida (MCE) y masilla de cervecera sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecera molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecera extruida fermentada (MCEF) por *Fusarium oxysporum* durante 48 h y 96 h.

Ácido Fenólico	Muestra	Contenido de ácidos fenólicos (mg/g de muestra base seca)			
		Libres	Ligados	Totales	Proporción libres (%)
Ácido p-cumárico	MC	0.03±0.00 ^b	2.24±0.44 ^b	2.27±0.44 ^b	1.32
	MCM	0.02±0.00 ^b	1.15±0.16 ^b	1.17±0.16 ^b	1.70
	MCE	0.06±0.01 ^a	10.39±0.44 ^a	10.45±0.45 ^a	0.57
	MCF 48 h	0.27±0.04 ^a	6.95±0.25 ^a	7.22±0.29 ^a	3.73
	MCMF 48 h	0.35±0.02 ^a	7.59±0.72 ^b	7.94±0.74 ^a	4.41
	MCEF 48 h	0.29±0.05 ^a	3.88±1.19 ^a	4.17±1.24 ^b	6.95
	MCF 96 h	0.29±0.03 ^a	6.08±0.53 ^a	6.37±0.56 ^a	4.55
	MCMF 96 h	0.25±0.03 ^a	5.04±0.13 ^a	5.29±0.16 ^a	4.72
	MCEF 96 h	0.28±0.01 ^a	2.27±0.19 ^b	2.55±0.20 ^b	10.98

*Cada valor representa el promedio del duplicado de la muestra ±desviación estándar. Los valores con letras distintas dentro de las columnas son significativamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

Cuadro 14. Contenido de ácido ferúlico en masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM), masilla de cervecera extruida (MCE) y masilla de cervecera sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecera molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecera extruida fermentada (MCEF) por *Fusarium oxysporum* durante 48 h y 96 h.

Ácido Fenólico	Muestra	Contenido de ácidos fenólicos (mg/g de muestra base seca)			
		Libres	Ligados	Totales	Proporción libres (%)
Ácido ferúlico	MC	0.11±0.00 ^b	12.18±0.00 ^b	12.28±0.00 ^b	0.89
	MCM	0.11±0.01 ^b	9.10±1.21 ^b	9.21±1.22 ^b	1.19
	MCE	0.15±0.00 ^a	28.04±2.68 ^a	28.19±2.68 ^a	0.53
	MCF 48 h	0.70±0.02 ^b	25.08±3.73 ^a	25.78±3.75 ^a	2.48
	MCMF 48 h	0.71±0.00 ^b	24.41±1.90 ^a	25.12±1.90 ^a	2.83
	MCEF 48 h	1.44±0.16 ^a	11.52±1.31 ^b	12.96±1.47 ^b	11.11
	MCF 96 h	0.86±0.04 ^a	21.04±2.72 ^a	21.89±2.76 ^a	3.93
	MCMF 96 h	0.68±0.00 ^b	16.94±0.23 ^a	17.62±0.23 ^a	3.86
	MCEF 96 h	0.87±0.02 ^a	8.82±0.75 ^b	9.69±0.77 ^b	8.98

*Cada valor representa el promedio del duplicado de la muestra ±desviación estándar. Los valores con letras distintas dentro de las columnas son significativamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

6.6.3 Capacidad Antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante presente en el extracto de los compuestos fenólicos libres y ligados de la masilla de cervecera sin tratamiento, molida, extruida y masilla de cervecera fermentada sin tratamiento, molida o extruida fermentada por *Fusarium oxysporum* durante 48 h y 96 h se muestra en el cuadro 15. El ensayo de DPPH se basa en la capacidad del radical DPPH para reaccionar con el donante de hidrógeno, es decir los fenoles presentes en cada una de las muestras. Verni *et al.* (2020), evaluaron los extractos libres de la masilla de cervecera y obtuvieron resultados del 42.5% de inhibición de DPPH y por otra parte Reis y Abu-Ghannam (2014), evaluaron los extractos ligados de la masilla de cervecera y obtuvieron resultados del 80%±17% de inhibición de DPPH, lo cual coincide con los resultados obtenidos (cuadro 15).

Por otra parte, las muestras a las que se sometieron al proceso de fermentación presentan el porcentaje de inhibición de DPPH mayor al compararlo con las muestras a las que no se les realizó dicho proceso. Sin embargo, este cambio se encuentra asociado con los resultados obtenidos en la sección 6.6.2, ya que durante el proceso de fermentación se incrementó la concentración de compuestos fenólicos libres por lo que se obtuvieron % de inhibición de DPPH elevados. Dulf *et al.* (2017), evaluaron el potencial antioxidante, mediante el ensayo DPPH, de los extractos del subproducto del albaricoque al cual se le sometió al proceso de fermentación en estado sólido, el resultado obtenido fue un incremento del 18% en aquellas muestras a las que no se sometieron a dicho proceso.

Cuadro 15. Actividad antioxidante de extractos fenólicos determinada por el ensayo de DPPH de la masilla de cervecera sin tratamiento (MC), masilla de cervecera molida (MCM), masilla de cervecera extruida (MCE) y masilla de cervecera sin tratamiento fermentada (MCF), masilla de cervecera molida fermentada (MCMF) y masilla de cervecera extruida fermentada (MCEF) por *Fusarium oxysporum* durante 48 h y 96 h.

Muestra	Actividad antioxidante de extractos fenólicos determinada por el ensayo de DPPH				
	% de inhibición		Valores de DPPH ($\mu\text{mol TE/kg}$)		
	Libres	Ligados	Libres	Ligados	Totales
MC	57.14 ^c	89.25 ^b	1761.58 \pm 55.67 ^c	3111.55 \pm 67.67 ^b	4873.13 \pm 123.3 ^c
MCM	67.74 ^a	88.08 ^b	2207.00 \pm 57.53 ^a	3062.03 \pm 60.55 ^b	5269.03 \pm 118.0 ^a
MCE	60.26 ^b	93.00 ^a	1892.63 \pm 51.63 ^b	3269.14 \pm 55.15 ^a	5161.76 \pm 106.7 ^b
MCF 48 h	93.17 ^a	89.48 ^b	3276.05 \pm 35.97 ^a	3280.28 \pm 59.91 ^b	6545.55 \pm 95.88 ^b
MCMF 48 h	92.91 ^a	93.27 ^a	3265.28 \pm 1.96 ^a	3280.28 \pm 8.48 ^a	6545.55 \pm 0.44 ^a
MCEF 48 h	91.76 ^b	78.81 ^c	3216.95 \pm 31.53 ^b	2672.47 \pm 126.25 ^c	5889.43 \pm 157.7 ^c
MCF 96 h	92.56 ^a	91.77 ^a	3250.76 \pm 21.54 ^a	3217.36 \pm 45.41 ^a	6468.13 \pm 66.96 ^a
MCMF 96 h	92.96 ^a	88.19 ^b	3267.26 \pm 22.34 ^a	3066.99 \pm 86.88 ^b	6334.25 \pm 109.2 ^a
MCEF 96 h	90.76 ^b	82.26 ^c	3174.85 \pm 23.94 ^b	2817.40 \pm 150.07 ^c	5992.26 \pm 174.0 ^b

*Cada valor representa el promedio del triplicado de la muestra \pm desviación estándar. Los valores con letras distintas dentro de las columnas son significativamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

7. CONCLUSIONES

El proceso de extrusión en combinación con el proceso de fermentación en estado sólido, por 48 h con la cepa de *Fusarium oxysporum*, sobre la masilla de cervecería incrementó la liberación de arabinosilanos solubles en agua, obteniendo rendimientos de 319 veces más que a la masilla que no está sometida a ningún tratamiento. Con respecto al rendimiento de arabinosilanos que se puede obtener al utilizar la combinación de dichos procesos es de 95.8 g por cada kg de masilla de cervecería, mientras que la masilla a la que solamente se le realizó el proceso de extrusión es de 7 g por cada kg de masilla y la masilla a la que no fue sometida a ningún proceso es de 0.3 g por cada kg de masilla. Por lo que es de gran interés la combinación de los procesos para implementarlo en la industria.

De igual manera, al llevar a cabo la combinación de ambos procesos (extrusión y fermentación en estado sólido) se incrementó el contenido de compuestos fenólicos totales y compuestos fenólicos libres, al igual que la proporción libre en cada uno de los ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico) y al haber un incremento en la proporción libre de los ácidos fenólicos se obtuvieron % de inhibición de DPPH elevados, todo esto al compararlo con la masilla que no fue sometida a ningún tratamiento.

Por otra parte, los resultados del presente trabajo muestran el potencial del uso de ambos tratamientos (extrusión y fermentación en estado sólido con *Fusarium oxysporum*) para la obtención de metabolitos secundarios (antioxidantes) y enzimas hidrolíticas, los cuales tienen un alto valor comercial ya que cuentan con un potencial uso en la industria alimentaria y farmacéutica. Adicionalmente, la combinación de estos dos procesos puede ser de gran interés para las industrias que quieran dejar de utilizar agentes químicos y disminuir los costos de procesamiento.

8. RECOMENDACIONES

La masilla de cervecería es un buen material para ser reutilizado, sin embargo, el utilizar otros subproductos de cereales como rastrojo de maíz o los granos secos de destilería (DDGS en sus siglas en inglés) podrían ser una mejor opción para incrementar los rendimientos de arabinosilanos solubles. También se podría utilizar otro tipo de hongo filamentoso (p. Ej. *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger*) para poder incrementar la liberación de arabinosilanos, debido a que estos hongos producen una mayor cantidad de xilanasas y además pueden metabolizar la lignina presente en el material.

De igual manera el investigar el tipo y la actividad enzimática de xilanasas que se esté generando durante el proceso metabólico del *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* y verificar que el hongo no produjo micotoxinas, para que en un futuro los arabinosilanos sean utilizados como ingrediente o aditivo para la elaboración de productos alimenticios.

9. REFERENCIAS

- Achari S. R., Kaur J., Dinh Q., Mann R., Sawbridge T., Summerell B. A. and Edwards J. 2020. Phylogenetic relationship between Australian *Fusarium oxysporum* isolates and resolution of the species complex using the multi-species coalescent model. *BMC Genomics*. 21(1):1-20.
- Acosta-Estrada B. A., Vilella-Castrejón J., Pérez-Carrillo E., Gómez-Sánchez C. E. and Gutiérrez-Urbe J. A. 2019. Effects of solid-state fungi fermentation on phenolic content, antioxidant properties and fiber composition of lime cooked maize by-product (nejayote). *Journal of Cereal Science*. 90,102837.
- Alconada T. M. and Martínez M. J. 1994. Purification and characterization of an extracellular endo-1, 4- β -xylanase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *FEMS Microbiology Letters*. 118(3):305-310.
- Aliyu S. and Bala M. 2011. Brewer's spent grain: a review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*. 10(3):324-331.
- American Association of Cereal Chemist (AACC). 2001. Report of the dietary fiber definition committee to the board of directors of the American Association of Cereal Chemists. *Cereal Foods World*. 46(3):112-126.
- Anderson R. A., Conway H. and Peplinski A. J. 1970. Gelatinization of corn grits by roll cooking, extrusion cooking and steaming. *Starch Stärke*. 22(4):130-135.
- Bartolomé B., Santos M., Jiménez J., del Nozal M. and Gómez-Cordovés C. 2002. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*. 36:51-58.
- Beaugrand J., Cronier D., Thiebeau P., Schreiber L., Debeire P. and Chabbert, B. 2004. Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(23):7108–7117.
- Beg Q., Kapoor M., Mahajan L. and Hoondal G. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56(3):326–338.
- Bengtsson S. and Aman P. 1990. Isolation and chemical characterization of water-soluble arabinoxylans in rye grain. *Carbohydrate Polymers*. 12:267.
- Bianco A., Budroni M., Zara S., Mannazzu I., Fancello F. and Zara G. 2020. The role of microorganisms on biotransformation of brewers spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1-18.
- Bindels L. B., Delzenne N. M., Cani P. D. and Walter J. 2015. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 12(5):303.
- Bonifácio-Lopes T., Teixeira J. A. and Pintado M. 2019. Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1-12.
- Bribiesca B. L. C. 2013. Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales.

Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud. 16(1):19-22.

- Celus I., Brijs K. and Delcour J. A. 2006. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of Cereal Science*. 44(2):203-211.
- Cencic A. and Chingwaru W. 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*. 2(6):611-625.
- Chávez-Sifontes M. y Domine M. E. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 4(4):15-46.
- Chen H., Fu Y., Jiang X., Li D., Qin W., Zhang Q. and Liu Y. 2018. Arabinoxylan activates lipid catabolism and alleviates liver damage in rats induced by high-fat diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98(1):253-260.
- Chen Z., Yu L., Wang X., Gu Z. and Beta T. 2016. Changes of phenolic profiles and antioxidant activity in canaryseed (*Phalaris canariensis L.*) during germination. *Food Chemistry*. 194:608-618.
- Christakopoulos P., Nerinckx W., Kekos D., Macris B. and Claeysens M. 1996. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. *Journal of Biotechnology*. 51(2):181-189.
- Christakopoulos P., Nerinckx W., Kekos D., Macris B. and Claeysens, M. 1997. The alkaline xylanase III from *Fusarium oxysporum* F3 belongs to family F/10. *Carbohydrate Research*. 302(3-4):191-195.
- Coelho E., Rocha M. A. M., Moreira A. S., Domingues M. R. M. and Coimbra, M. A. 2016. Revisiting the structural features of arabinoxylans from brewers' spent grain. *Carbohydrate Polymers*. 139:167-176.
- Courtin C. M. and Delcour J. A. 2001. Relative activity of endoxylanases towards waterextractable and water-unextractable arabinoxylan. *Journal of Cereal Science*. 33:301–312.
- Cozzolino D. and Degner S. 2016. An overview on the role of lipids and fatty acids in barley grain and their products during beer brewing. *Food Research International*. 81:114-121.
- Cyran M., Courtin C. M. and Delcour J. A. 2003. Structural features of arabinoxylans extracted with water at different temperatures from two rye flours of diverse breadmaking quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:4404–4416.
- da Costa-Maia I., dos Santos-D'Almeida, C. T., Freire, D. M. G., Cavalcanti, E. D. A. C., Cameron, L. C., Dias, J. F. and Ferreira, M. S. L. 2020. Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MSE. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 133:110136.
- Dai F. J. and Chau C. F. 2017. Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25(1):37-42.
- Damodaran S. and Parkin K. L. 2017. Fennema's food chemistry. CRC press.
- de Figueiredo F. C., Carvalho A. F. A., Brienzo M., Campioni T. S. and de Oliva-Neto P. 2017. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. *Bioresource Technology*. 228:164-170.

- Dervilly-Pinel G., Rimsten L., Saulnier L., Andersson R. and Åman P. 2001. Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. *Journal of Cereal Science*. 34(2):207-214.
- Dornez E., Gebruers K., Delcour J. A. and Courtin C. M. 2009. Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing. *Trends in Food Science & Technology*. 20(11-12):495-510.
- Douglas S. G. 1981. A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour. *Journal of Food Chemistry*. 7:139-145.
- Dulf F. V., Vodnar D. C., Dulf E. H. and Pinteá A. 2017. Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (*Prunus armeniaca L.*) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. *Chemistry Central Journal*. 11(1):1-10.
- Espinosa-Ramírez J., Rodríguez A., De la Rosa-Millán J., Heredia-Olea E., Pérez-Carrillo E. and Serna-Saldívar S. O. 2021. Shear-induced enhancement of technofunctional properties of whole grain flours through extrusion. *Food Hydrocolloids*. 111:106400.
- Fadel A., Plunkett A., Ashworth J., Mahmou A. M., Ranneh Y., El Mohtadi M. and Li W. 2018. The effect of extrusion screw-speed on the water extractability and molecular weight distribution of arabinoxylans from defatted rice bran. *Journal of Food Science and Technology*. 55(3):1201-1206.
- Falck P., Aronsson A., Grey C., Stålbbrand H., Karlsson E. N. and Adlercreutz P. 2014. Production of arabinoxylan-oligosaccharide mixtures of varying composition from rye bran by a combination of process conditions and type of xylanase. *Bioresource Technology*. 174:118-125.
- Figueroa-Espinoza M. C., Poulsen C., Borch Soe J., Zargahi M. R. and Rouau X. 2004. Enzymatic solubilization of arabinoxylans from native, extruded, and high-sheartreated rye bran by different endo-xylanases and other hydrolyzing enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(13):4240–4249.
- Fleury M.D., Edney M. J., Campbell L. D. and Crow G. H. 1997. Total, water-soluble and acid-soluble arabinoxylans in western Canadian barleys. *Canadian Journal of Plant Science*. 77(2):191–196.
- Forssell P., Kontkanen H., Schols H.A., Hinz S., Eijnsink V.G., Treimo J., Robertson J. A., Waldron K. W., Faulds C. B. and Buchert, J. 2008. Hydrolysis of brewers' spent grain by carbohydrate degrading enzymes. *Journal of The Institute of Brewing*. 114:306–314.
- García-Amezquita L. E., Tejada-Ortigoza V., Pérez-Carrillo E., Serna-Saldívar S. O., Campanella O. H. and Welti-Chanes J. 2019. Functional and compositional changes of orange peel fiber thermally-treated in a twin extruder. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. 111:673-681.
- Gómez-Gómez E., Roncero I. M., Di Pietro A. and Hera, C. 2001. Molecular characterization of a novel endo- β -1, 4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics*. 40(4):268-275.
- Gordon T. R. and Martyn R. D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual*

Review of Phytopathology. 35(1):111-128.

- Hansen H. B., Rasmussen C. V., Knudsen K. E. B. and Hansen Å. 2003. Effects of genotype and harvest year on content and composition of dietary fibre in rye (*Secale cereale L*) grain. Journal of the Science of Food and Agriculture. 83:76.
- Hashimoto S., Shogren M.D. and Pomeranz Y. 1987. Cereal pentosans: Their estimation and significance. I. Pentosans in wheat and milled wheat products. Cereal Chemistry. 64:30.
- Hendriks A. T. W. M. and Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. 100(1):10-18.
- Heredia-Olea E., Pérez-Carrillo E. and Serna-Saldívar S. O. 2015. Effect of extrusion conditions and hydrolysis with fiber-degrading enzymes on the production of C5 and C6 sugars from brewers spent grain for bioethanol production. Biofuel Research Journal. 2(1), 203-208.
- Hughes S. A., Shewry P. R., Li L., Gibson G. R., Sanz M. L. and Rastall, R. A. 2007. In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55(11):4589-4595.
- Ikram S., Huang L., Zhang H., Wang J. and Yin, M. 2017. Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain. Journal of Food Science. 82(10):2232-2242.
- INEGI. 2017. Estadísticas a propósito de la actividad de elaboración de cerveza. Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas. 9:3-20.
- Izydorczyk M. S. and MacGregor A. W. 2000. Evidence of intermolecular interactions of β -glucans and arabinoxylans. Carbohydrate Polymers. 41(4):417-420.
- Izydorczyk M., Biliaderis C. G. and Bushuk W. 1991. Comparison of the structure and composition of water-soluble pentosans from different wheat varieties. Cereal Chemistry 68(2):139-144.
- Izydorczyk, M. and Biliaderis C. G. 2006. Arabinoxylans. In: Functional Food Carbohydrates. CRC Press.
- Jacquemin L., Zeitoun R., Sablayrolles C., Pontalier P. Y. and Rigal, L. 2012. Evaluation of the technical and environmental performances of extraction and purification processes of arabinoxylans from wheat straw and bran. Process Biochemistry. 47(3):373-380.
- Jeong H. S. and Toledo R. T. 2004. Twin-screw extrusion at low temperature with carbon dioxide injection to assist expansion: extrudate characteristics. Journal of Food Engineering. 63(4):425-432.
- Kirin Holdings Company Ltd. (2020). Global Beer Consumption by Country in 2018. Retrieved February 22, 2020, from https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2019/1224_01.html.
- Kistler H. C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathology. 87(4):474-479.
- Ktenioudaki A., Alvarez-Jubete L., Smyth T. J., Kilcawley K., Rai D. K. and Gallagher E. 2015. Application of bioprocessing techniques (sourdough fermentation and technological aids) for brewer's spent grain breads. Food Research International. 73:107-116.
- Lattimer J. M. and Haub M. D. 2010. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. Nutrients. 2(12):1266-1289.

- Leslie J. F. and Summerell B. A. 2008. The *Fusarium* laboratory manual. John Wiley and Sons. Primera Edición. Ames Iowa, USA. 308 pp.
- Liu C., Zhang Y., Liu W., Wan J., Wang W., Wu L., and Yin, Z. 2011. Preparation, physicochemical and texture properties of texturized rice produce by improved extrusion cooking technology. *Journal of Cereal science*. 54(3), 473-480.
- Long D., Ye F. and Zhao G. 2014. Optimization and characterization of wheat bran modified by in situ enhanced CO₂ blasting extrusion. *LWT-Food Science and Technology*. 59(2):605-611.
- Lynch K. M., Steffen E.J. and Arendt, E.K. 2016. Brewers' spent grain: a review with emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*. 122(4):553-568.
- Mäkelä M. R., Marinović M., Nousiainen P., Liwanag A. J., Benoit I., Sipilä, J. and Hilden K. S. 2015. Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass. *Advances in Applied Microbiology*. 91:63-137.
- Malunga L. N., Izydorczyk M. and Beta T. 2017. Effect of water-extractable arabinoxylans from wheat aleurone and bran on lipid peroxidation and factors influencing their antioxidant capacity. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 10:20-26.
- Mamman A. S., Lee J.M., Kim Y.C., Hwang I. T., Park, N. J., Hwang Y. K. and Hwang J. S. 2008. Furfural: Hemicellulose/xyloxyderived biochemical. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2(5):438-454.
- Marone A., Trably E., Carrère H., Prompsy P., Guillon F., Joseph-Aimé M. and Escudie R. 2019. Enhancement of corn stover conversion to carboxylates by extrusion and biotic triggers in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103(1):489-503.
- Márquez-Araque, A. T. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por "*Trametes*" sp. EUM1, "*Pleurotus ostreatus*" IE8 y "*Aspergillus niger*" AD96. 4 en fermentación sólida. *Interciencia*. 32(11):0.
- Martínez-Trejo, G., Ortega-Cerrilla, M., Landois Palencia, L. L., Pineda Osnaya, A. and Pérez Pérez J. 2012. Rendimiento productivo y las variables ruminales de corderos alimentados con rastrojo de maíz tratado con urea. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(6):1157-1170.
- Mendez-Encinas M. A., Carvajal-Millan E., Rascon-Chu A., Astiazaran-Garcia H. F. and Valencia-Rivera D. E. 2018. Ferulated arabinoxylans and their gels: Functional properties and potential application as antioxidant and anticancer agent. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018.
- Mendis M. and Simsek S. 2014 Arabinoxylans and human health. *Food Hydrocoll*. 42:239-243.
- Meneses N. G., Martins S., Teixeira J. A. and Mussatto S. I. 2013. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*. 108:152-158.
- Mikan V. J. F. and Castellanos S. D. E. 2004. Screening for isolation and characterisation of microorganisms and enzymes with useful potential for degradation of cellulose and hemicellulose. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6:58.
- Moore J., Cheng Z., Hao J., Guo G., Liu J. G., Lin C. and Yu L. 2007. Effects of solid-state yeast treatment on the antioxidant properties and protein and fiber compositions of common hard

- wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(25):10173-10182.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y. Y., Holtzapple M., and Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 96(6), 673-686.
- Mussatto S. I. 2014. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94(7):1264-1275.
- Mussatto S. I., Dragone G. and Roberto I. C. 2006. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*. 43(1):1-14.
- Myat L. and Ryu G. H. 2014. Characteristics of destarched corn fiber extrudates for ethanol production. *Journal of Cereal Science*. 60(2):289-296.
- Niemi P., Tamminen T., Smeds A., Viljanen K., Ohra-aho T., Holopainen-Mantila U. and Buchert J. 2012. Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(39):9910-9917.
- Niño-Medina G., Carvajal-Millán E., Rascon-Chu A., Marquez-Escalante J. A., Guerrero V. and Salas-Munoz E. 2010. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: structure, sources and applications. *Phytochemistry Reviews*. 9(1):111-120.
- NREL, 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure (LAP). NREL/TP-510-42618
- Olagunju O., Mchunu N., Durand N., Alter P., Montet D., and Ijabadeniyi, O. (2018). Effect of milling, fermentation or roasting on water activity, fungal growth, and aflatoxin contamination of Bambara groundnut. *LWT*. 98, 533-539.
- Oscarsson M., Andersson R., Salomonsson A.C. and Åman P. 1996. Chemical composition of barley samples focusing on dietary fiber components. *Journal of Cereal Science*. 24:161.
- Parekh I., Khanvilkar A., and Naik, A. 2017. Barley-wheat brewers' spent grain: A potential source of antioxidant rich lipids. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41(6), 13244.
- Park Y., Kang S., Lee J., Hong S. L. and Kim S. 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58(6):761-766.
- Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., and Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67(5), 577-591.
- Popolo A., Autore G., Pinto A. and Marzocco S. 2013. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. *Free Radical Research*. 47(5):346-356.
- Qin F., Johansen A. Z. and Mussatto S. I. 2018. Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products*. 125:443-453.
- Quintero J. A., Rincón L.E. and Cardona C. A. 2011. Production of Bioethanol from Agroindustrial Residues as Feedstocks. En: Pandey, A. (Ed.). *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes*. Academic Press, Oxford, 149-176.
- Reis S. F. and Abu-Ghannam N. 2014. Antioxidant capacity, arabinoxylans content and in vitro glycaemic index of cereal-based snacks incorporated with brewer's spent grain. *LWT-Food*

Science and Technology. 55(1):269-277.

- Reis S. F., Coelho E., Coimbra M. A. and Abu-Ghannam N. 2015. Improved efficiency of brewer's spent grain arabinoxylans by ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 24:155-164.
- Robertson J. A., I'Anson K. J., Treimo J., Faulds C. B., Brocklehurst T. F., Eijsink V. G. and Waldron K. W. 2010. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT-Food Science and Technology*. 43(6):890-896.
- Rose D. J., and Inglett G. E. 2010. Production of feruloylated arabinoxyloligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave-assisted autohydrolysis. *Food Chemistry*. 119(4), 1613-1618.
- Roth M., Jekle, M. and Becker T. 2019. Opportunities for upcycling cereal byproducts with special focus on Distiller's grains. *Trends in Food Science and Technology*. 91:282-293.
- Rudakiya D. M. 2019. Strategies to improve solid-state fermentation technology. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 155-180).
- Ruiz M. C., Di Pietro A. and Roncero M. I. G. 1997. Purification and characterization of an acidic endo- β -1, 4-xylanase from the tomato vascular pathogen *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*. 148(1):75-82.
- Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27(2):185-194.
- Sasaki T., Yasui T. and Matsuki J. 2000. Influence of non-starch polysaccharides isolated from wheat flour on the gelatinization and gelation of wheat starches. *Food Hydrocolloids*. 14(4):295-303.
- Serna-Saldívar S.R.O. 2013. *Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales*. AGT Editor, S. A. Segunda edición. 703 pp.
- Serna-Saldívar, S. R. O. 2003. *Manufactura y control de calidad de productos basados en cereales*. AGT Editor, S. A. Primera edición. 340 pp.
- Serna-Saldívar, SO 2016. *Granos de cereales: propiedades, procesamiento y atributos nutricionales*. Prensa CRC.
- Severini C., Azzollini D., Jouppila K., Jussi L., Derossi A. y De Pilli, T. 2015. Effect of enzymatic and technological treatments on solubilisation of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*. 65:162-166.
- Shahidi F. and Chandrasekara A. 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochemistry Reviews*. 9(1):147-170.
- Shary S., Kapich A. N., Panisko E. A., Magnuson J. K., Cullen D. and Hammel K. E. 2008. Differential expression in *Phanerochaete chrysosporium* of membrane-associated proteins relevant to lignin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(23):7252-7257.
- Singh A. K., Rehal J., Kaur A. and Jyot G. 2015. Enhancement of Attributes of Cereals by Germination and Fermentation: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11):1575–1589.
- Singkhornart S., Lee S. G. and Ryu G. H. 2013. Influence of twin-screw extrusion on soluble

- arabinoxylans and corn fiber gum from corn fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(12):3046-3054.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. and Crocker D. 2008b. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory Analytical Procedure*. 1617(1):1-16.
- Sluiter A., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J. and Templeton D. 2008a. Determination of extractives in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. National Renewable Energy Laboratory. Golden, Colorado.
- Srivastava N., Mishra P.K. y Upadhyay. S.N. 2020. Industrial enzymes for biofuels production. Xylanases: For digestion of hemicellulose. *Recent Updates and Future Trends*. 101-132.
- Steiner J., Procopio S., and Becker, T. 2015. Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology*. 241(3), 303-315.
- Subramaniam R. and Vimala R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature*. 3(3):480-486.
- Szwajgier D., Waśko A., Targoński Z., Niedźwiadek M. and Bancarzewska M. 2010. The use of a novel ferulic acid esterase from *Lactobacillus acidophilus* K1 for the release of phenolic acids from brewer's spent grain. *Journal of the Institute of Brewing*. 116(3):293-303.
- Taherzadeh M. J. and Karimi K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 9(9): 1621-1651.
- te Biesebeke R., Ruijter G., Rahardjo Y. S., Hoogschagen M. J., Heerikhuisen M., Levin A. and Weber F. J. 2002. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations: Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Research*. 2(2):245-248.
- Ti H., Zhang R., Zhang M., Wei Z., Chi J., Deng Y. and Zhang Y. 2015. Effect of extrusion on phytochemical profiles in milled fractions of black rice. *Food chemistry*. 178:186-194.
- Tomás-Pejo E., Alvira P., Ballesteros M. and Negro M.J. 2011. Pretreatment Technologies for Lignocellulose to Bioethanol Conversion. En: Pandey, A. (Ed.). *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes*. Academic Press, Oxford, 149-176.
- Vasanthan T., Gaosong J., Yeung J. y Li J. 2002. Dietary fiber profile of barley flour as affected by extrusion cooking. *Food Chemistry*. 77(1):35-40.
- Verni M., Pontonio E., Krona A., Jacob S., Pinto D., Rinaldi F. and Rizzello C. G. 2020. Bioprocessing of brewers' spent grain enhances its antioxidant activity: Characterization of phenolic compounds and bioactive peptides. *Frontiers in Microbiology*. 11:1831.
- Vidal B. C., Dien B. S., Ting K. C. and Singh V. 2011. Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion—a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 164(8):1405-1421.
- Wang J., Bai J., Fan M., Li T., Li Y., Qian H. and Rao Z. 2019. Cereal-derived arabinoxylans: Structural features and structure–activity correlations. *Trends in Food Science and Technology*.

- Waters D. M., Jacob F., Titze J., Arendt E. K. and Zannini E. 2012. Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment European Food Research and Technology. 235(5):767-778.
- Xiros C. and Christakopoulos P. 2009. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. Biotechnology for Biofuels. 2(1),4.
- Xiros C. and Christakopoulos P. 2012. Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. Waste Biomass Valorization. 3:213–232
- Xiros C., Topakas E., Katapodis P. and Christakopoulos P. 2008. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. Industrial Crops and Products. 28(2):213-224.
- Yadav M. P., Johnston D. B., Hotchkiss A. T. J. and Hicks K. B. 2007. Corn fiber gum: A potential gum Arabic replacer for beverage flavor emulsification. Food Hydrocolloids. 21: 1022–1030.
- Yang S. T. (Ed.). 2011. Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications. Elsevier.
- Zeitoun R., Pontalier P. Y., Marechal P. and Rigal L. 2010. Twin-screw extrusion for hemicellulose recovery: Influence on extract purity and purification performance. Bioresource Technology. 101(23):9348-9354.
- Zeng M., Mosier N. S., Huang C. P., Sherman D. M. and Ladisch, M. R. 2007. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering. 97(2):265-278.
- Zhang B., Ramesh G., Uematsu S., Akira S. and Reeves W. B. 2008. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. Journal of the American Society of Nephrology. 19(5):923-932.
- Zhang R., Khan S. A., Chi J., Wei Z., Zhang Y., Deng Y. and Zhang M. 2018. Different effects of extrusion on the phenolic profiles and antioxidant activity in milled fractions of brown rice. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie. 88:64-70.
- Zhang Z., Smith C. and Li W. 2014. Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: A critical review. Food Research International. 65:423-436.
- Zhang Z., Smith C., Li W. and Ashworth J. 2016. Characterization of nitric oxide modulatory activities of alkaline-extracted and enzymatic-modified arabinoxylans from corn bran in cultured human monocytes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 64(43):8128-8137.
- Zheng X., Li L. and Wang X. 2011. Molecular characterization of arabinoxylans from hull-less barley milling fractions. Molecules. 16(4):2743-2753.
- Zhou S., Liu X., Guo Y., Wang Q., Peng D. and Cao L. 2010. Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. Carbohydrate Polymers. 81(4):784-789.