
This is the **published version** of the master thesis:

Contreras Rafanell, Carles; Sarrà, Montserrat (tut.). *Producció de biomassa fúngica mitjançant fermentació submergida dels fongs Ganoderma lucidum i Pleurotus ostreatus, utilitzant extracte de llevat de la indústria cervesera.* (Universitat Autònoma de Barcelona), 2026 (Enginyeria Biològica i Ambiental)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/336537>

under the terms of the  license.



**Producció de biomassa fúngica
mitjançant fermentació
submergida dels fongs
Ganoderma lucidum i *Pleurotus
ostreatus*, utilitzant extracte de
llevat de la indústria cervesera**

CARLES CONTRERAS RAFANELL

MÀSTER EN ENGINYERIA BIOLÒGICA I AMBIENTAL

TUTORA DEL TFM: MONTSERRAT SARRÀ ADROGUER

7 DE FEBRER DE 2025

Resum

La carn és de les fonts de proteïna més emprades a escala mundial. La producció d'aquesta genera un gran impacte mediambiental, per tant, la humanitat ha de fer una transició cap a alternatives més sostenibles. La micoproteïna produïda a partir de fongs pot ser una de les solucions, reduint les emissions. L'objectiu d'aquest treball ha estat optimitzar i escalar la producció de micoproteïna mitjançant *Ganoderma lucidum* i *Pleurotus ostreatus* utilitzant fermentació submergida. Per tal de fomentar l'economia circular s'ha valorat l'efecte d'emprar extracte de llevat com a substrat, un subproducte de la indústria cervesera. S'ha estudiat la composició de medi i condicions sobre el creixement dels fongs. Amb l'extracte de llevat, el medi i les condicions optimitzades s'ha obtingut una biomassa màxima de $20,3 \pm 1,3$ g/L per al fong *G.lucidum* en un bioreactor de tanc agitat d'1,5 L. En les mateixes condicions s'ha obtingut una biomassa màxima de $19,9 \pm 0,8$ g/L per al fong *P.ostreatus* en un bioreactor de tanc agitat de 2 L. L'extracte de llevat provinent de la producció de cervesa ha mostrat ser un bon substrat, sent un exemple de viabilitat de l'economia circular. La glucosa ha resultat ser una millor font de carboni que la sacarosa, pel fet que aquesta última no ha mostrat indicis de ser consumida en les condicions utilitzades.

Introducció

La producció d'aliments arreu del món té un gran impacte mediambiental, s'estima que aquesta genera el 20%-40% de les emissions totals.¹ D'aquestes emissions s'estima que el 57% prové de la producció d'aliments d'origen animal, el 29% d'aliments d'origen vegetal i el 14% restant correspon a altres usos.² A més, es preveu que les condicions climàtiques empitjorin en els pròxims anys, fent que sorgeixin oportunitats per a crear nous sistemes de producció d'aliments que redueixin l'ús de sòl i el consum d'aigua i energia.³ Un dels principals canvis a realitzar, és la substitució de la carn com a font de proteïna. La carn, a part de contribuir en gran manera en les emissions totals, té una eficiència de proteïna respecte a les emissions molt baixa. Per exemple, l'eficiència de la carn de pollastre i de vedella és de 39 i 7,1 g proteïna/kg CO₂ eq respectivament, mentre que altres aliments com la civada o la soja tenen una eficiència de 359 i 505 g proteïna/kg CO₂ eq respectivament.⁴

Els aliments substitutius de la carn poden ser una alternativa, ja que solucionen diferents problemes associats a la producció de carn convencional com l'impacte ambiental, els

riscos per a la salut o els problemes ètics.⁵ Aquests aliments poden estar basats en *single-cell protein* (SCP), referint-se a la proteïna produïda per microorganismes com bacteris, algues o fongs.⁶ Entre els diferents tipus de SCP es troba la micoproteïna, provinent de fongs. Aquesta destaca pel seu perfil d'aminoàcids i textura enfront d'altres substitutius de la carn basats en soja o pèsol.⁷ Un exemple de substitutiu de la carn basat en micoproteïna és Quorn™ de Marlow Foods (UK), produït a partir del fong filamentós *Fusarium venenatum*.⁷

La micoproteïna pot ser produïda a partir del miceli dels basidiomicets *Pleurotus ostreatus* i *Ganoderma lucidum*, ambdós tenen propietats interessants per a la producció d'aliments. El bolet *Pleurotus ostreatus* és cultivat arreu del món en grans quantitats i és un bon candidat pel seu gust i aroma, i pel seu alt contingut de proteïnes i baix contingut en calories.⁸ A més la seva proteïna és d'alta qualitat i aporta aminoàcids essencials i nitrogen útil per a les funcions del cos.⁹ D'una llista de 17 bolets comestibles, *Pleurotus ostreatus* presenta la concentració més gran d'umami equivalent i el millor gust d'umami, aquest gust és característic dels aminoàcids de la carn.^{8,10} En el cas de *Ganoderma lucidum* a part de tindre un alt contingut en proteïnes,¹¹ també té propietats antitumorals, citotòxiques, antimicrobianes i antioxidants.¹² El miceli d'aquests fongs pot ser produït mitjançant fermentació submergida, aquesta presenta múltiples avantatges respecte al cultiu tradicional de bolets, ja que s'obté un creixement més ràpid, més segur, millor control i és més reproduïble.⁸

A més d'utilitzar els fongs com a base per a produir proteïna, el procés pot arribar a ser més sostenible, tant mediambientalment com econòmicament, gràcies a la utilització de subproductes d'altres processos.¹³ Un subproducte interessant per a la producció de micoproteïna és l'extracte de llevat. A la indústria cervesera l'extracte de llevat és un subproducte del procés de fermentació, i està compost per fongs del gènere *Saccharomyces*.¹³ L'extracte de llevat és un bon substrat per a fermentacions, tant a nivell laboratori com a escala industrial, ja que té un gran contingut en aminoàcids, vitamines, nucleòsids, polipèptids i minerals.¹⁴ A més d'aportar nutrients a la fermentació, l'extracte de llevat és un excel·lent substrat per a produir aliments pel fet que és considerat GRAS (*Generally Recognized as Safe*) per la majoria d'organismes de certificació en seguretat alimentària.¹⁵

En el present treball, s'ha investigat com optimitzar la producció de miceli dels fongs *Pleurotus ostreatus* i *Ganoderma lucidum*, mitjançant la utilització de diferents concentracions d'extracte de llevat procedent de la indústria cervesera, utilitzant sacarosa

o glucosa com a cosubstrat, i optimitzant les concentracions d'alguns components del medi. La producció de miceli s'ha realitzat mitjançant fermentació submergida en matrassos d'Erlenmeyers. Per a avaluar la producció de miceli s'ha tingut en compte la biomassa produïda, a més de la morfologia, textura i olor del miceli. El medi optimitzat s'ha utilitzat per a fer un escalat a un reactor agitat a escala laboratori, amb la intenció d'avaluar si amb el medi òptim s'obtenen resultats similars o millors als experiments amb matrassos d'Erlenmeyers. L'altra intenció de la investigació ha estat comparar els dos tipus de fongs per avaluar quin té més potencial per a produir micoproteïna.

Materials i mètodes

Reactius

La sacarosa i el $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ s'han obtingut de Sigma-Aldrich (EUA). El KH_2PO_4 i l'àcid cítric s'han obtingut de Merck (Alemanya). El KNO_3 i el $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ s'han obtingut de AppliChem (Alemanya). El $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, el $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, el $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i l' H_3BO_3 s'han obtingut de Panreac (Espanya). El $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ s'ha obtingut de Thermo Fisher Scientific (EUA). El $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ s'ha obtingut de T3Q (Espanya). El $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ s'ha obtingut de Alfa Aesar (EUA). L'extracte de malta s'ha obtingut de Scharlab (Espanya). L'antiespumant SB 2121 s'ha obtingut de Schill+Seilacher (Alemanya). L'extracte de llevat s'ha obtingut d'Estrella Damm (Espanya), aquest ha estat esterilitzat a l'origen i per als experiments s'ha tornat a esterilitzar.

Microorganismes

S'han utilitzat els fongs *Pleurotus ostreatus* M2125 i *Ganoderma lucidum* FP-58537-Sp. Aquests fongs s'han emmagatzemat en plaques de Petri amb agar de dextrosa de patata (PDA en anglès), a 25 °C.

Inòcul

A partir d'una placa amb PDA, s'han tallat 3 porcions d'1x1cm de la zona de creixement i s'han afegit en un matràs d'Erlenmeyer d'1 L amb 200 mL de medi amb 20 g/L d'extracte de malta. El matràs es manté en una agitació orbital de 125 rpm i temperatura controlada a 25 °C de 5 a 6 dies. Els grans agregats de miceli s'han separat del medi en condicions estèrils utilitzant un colador convencional i s'han rentat amb una solució de 8 g/L de NaCl. Els agregats s'han transferit a una ampolla Schott de 250 mL (Schott, Alemanya) juntament

amb una solució de 8 g/L de NaCl en proporció 1:1 v/v. El contingut de l'ampolla s'ha homogeneïtzat mitjançant un homogeneïtzador X10/20 (Ystral GmbH, Alemanya). La suspensió de miceli resultant és la que s'ha utilitzat per a inocular els diferents cultius. La suspensió es pot guardar emmagatzemada a 4°C fins a 3 mesos.

Medi

S'han preparat 2 solucions. La solució de macronutrients conté per litre: 14,82 g $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8 g KH_2PO_4 , 12,6 g KNO_3 , 14,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 0,57 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La solució de micronutrients conté per litre: 45,7 g àcid cítric, 50 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12,3 g $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,38 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g H_3BO_3 i 0,5 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Aquestes dues solucions s'han esterilitzat en autoclau (30 min a 120°C) per separat. En condicions estèrils s'ha afegit la solució de micronutrients a la solució de macronutrients en una proporció d'1:2000 v/v.

Com a font de carboni s'han preparat dues solucions, una amb 150 g/L de sacarosa i una altra amb 150 g/L de glucosa, ambdues utilitzant aigua ultrapura. Aquestes solucions s'han esterilitzat en autoclau.

Per a la preparació del medi final s'han mesclat les diferents solucions en condicions estèrils: solució de nutrients amb sals traça en una proporció 1:5 v/v o 1:3,3 v/v en funció de l'experiment, solució de font de carboni en proporció 1:5 v/v en el cas de la sacarosa o 1:10 v/v en el cas de la glucosa, extracte de llevat prèviament esterilitzat en autoclau en proporció 1:5 en el cas de 100% de concentració (per als experiments amb altres concentracions s'ha afegit la part proporcional) i s'ha acabat enrasant amb aigua ultrapura.

Cultiu en matrassos d'Erlenmeyer

S'han emprat matrassos d'Erlenmeyer de 250 mL sense bafles, amb un volum de medi de 50 mL preparat afegint els diferents components en condicions estèrils. Els experiments s'ha inoculat amb 1 mL de suspensió de miceli. Un cop inoculats, els matrassos s'han mantingut en agitació orbital a 200 rpm i temperatura controlada a 25 °C en la majoria d'experiments i a 30 °C a un experiment puntual. El pH no s'ha ajustat en cap dels casos. Tots els experiments s'han fet per triplicat.

Cultiu en reactor

S'han emprat dos tipus de fermentadors, un fermentador Biostat B® de 5 L (Sartorius Stedim, Alemanya) per a *Pleurotus ostreatus* i un fermentador ez-Control de 2 L (Geringe,

Suècia) per a *Ganoderma lucidum*. El medi utilitzat ha estat compost per: solució de nutrients amb sals traça en proporció 1:3,3 v/v, 15 g/L de glucosa, extracte de llevat en proporció 1:5 v/v i 2,5 mL de solució 1:10 v/v d'antiespumant SB 2121. El volum de treball ha estat de 2 L per al Biostat B® i 1,5 L per al ez-Control. S'ha inoculat amb 40 mL i 30 mL de suspensió de miceli respectivament. La temperatura s'ha controlat a 30 °C, l'agitació a 800 rpm, l'aeració a 0,75 vvm i el pH a 5 utilitzant HCl 3M i NaOH 2M.

Biomassa

La biomassa s'ha mesurat mitjançant la mesura del pes cel·lular sec (DCW en anglès). Per als primers experiments s'han usat els filtres Whatman GF/C (GE HealthCare, EUA) pre-assecats i pre-tarats. La mostra, s'ha assecat en una estufa a 100 °C fins a obtenir un pes constant. A causa de la seva petita mida de porus, en els següents experiments s'han emprat els filtres BNHF-070-100 (Branchia, Espanya). En els casos amb gran quantitat de biomassa, aquesta s'ha centrifugat a 13000 RCF (xg) durant 20 minuts. El sobrenedant s'ha eliminat i s'ha rentat la biomassa amb aigua ultrapura, la mescla resultant s'ha tornat a centrifugar. La biomassa resultant s'ha incorporat a cresols de ceràmica pre-tarats i s'han assecat a una estufa a 100 °C fins a obtenir un pes constant. En la mesura del DCW aquest correspon a la combinació entre la biomassa procedent del fong i la biomassa procedent de la fracció no soluble de l'extracte de llevat. No obstant no s'ha determinat la proporció de cadascuna de les dues biomasses pel fet que ambdues acabaran sent micoproteïna comestible.

Quant als experiments amb bioreactor, la biomassa final s'ha separat del medi mitjançant un colador convencional. Després de ser rentada s'ha procedit amb la neteja i pesat de la biomassa humida. Aquesta biomassa humida s'ha introduït en una estufa a 100°C per a determinar la fracció seca. Amb aquesta fracció s'ha quantificat la biomassa seca total del reactor.

Demanda química d'oxigen

Per a la mesura de la quantitat de substrat soluble s'ha emprat la demanda química d'oxigen (DQO). Per a la mesura d'aquesta s'han utilitzat els kits LCK014 (Hach Lange, EUA). Mitjançant un mètode colorimètric, utilitzant un DR3900 VIS Benchtop Spectrophotometer (Hach Lange, EUA).

Glucosa

Per a la mesura de la concentració de glucosa s'ha utilitzat un mesurador enzimàtic YSI 2900 (Yellow Springs Instruments and Co, EUA).

Resultats i discussió

Efectes de l'extracte de llevat junt amb sacarosa

S'han estudiat diferents concentracions d'extracte de llevat juntament amb sacarosa com a font de carboni, a una temperatura de 25°C. L'extracte de llevat representa un 20% del volum total de medi, i per a l'estudi de la millor concentració d'aquest s'han fet diferents experiments des del 100% d'aquesta fracció sent extracte de llevat, fins al 0%. Com a font de carboni s'ha emprat una concentració de sacarosa de 30 g/L. Els cultius s'han mantingut durant 96 h. Els resultats obtinguts per als cultius de *Ganoderma lucidum* i *Pleurotus ostreatus* es presenten a la Figura 1a i 1b, respectivament.

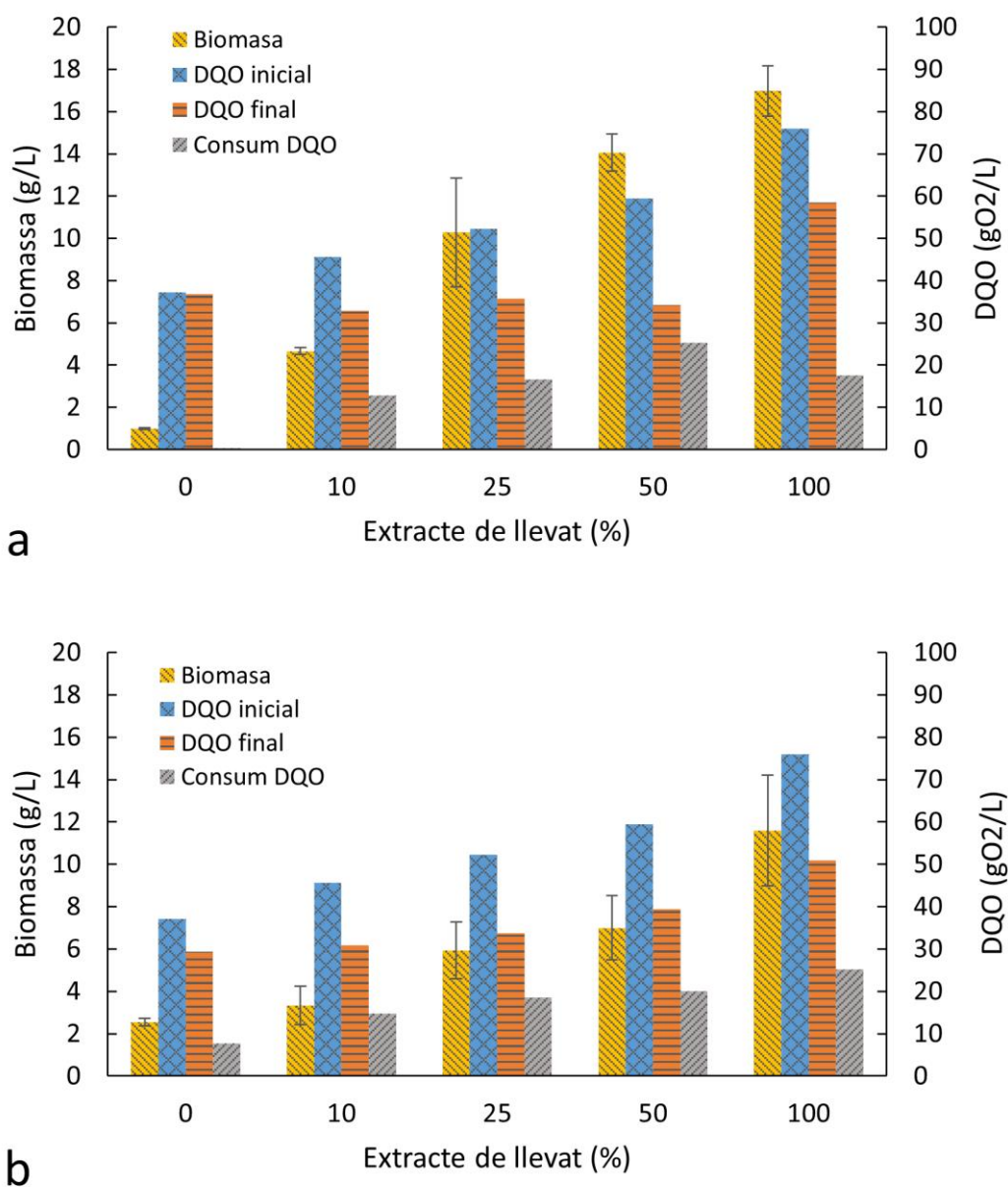


Fig. 1 Efecte de les diferents concentracions d'extracte de llevat en el cultiu a 96 h per a *G.lucidum* (a) i per a *Postreatus* (b) amb una concentració de sacarosa de 30 g/L.

La biomassa pel cas de *G.lucidum* ha estat màxima ($17,0 \pm 1,2$ g/L) quan s'ha utilitzat una concentració d'extracte de llevat del 100% (Fig. 1a). Respecte al consum de substrat, s'observa una tendència clara a la majoria d'experiments, on la DQO final assoleix el mateix valor que la DQO inicial del cas amb 0% extracte de llevat. Aquest valor de DQO s'associa a la sacarosa, per tant, aquesta no està sent consumida pel fong, com s'observa en el cas amb 0% d'extracte de llevat on el consum és quasi nul ($0,35$ gO₂/L). El cas amb 100% extracte de llevat és l'únic que no assoleix aquest valor de DQO final corresponent a la sacarosa, sinó que és superior ($58,5$ gO₂/L). Això indica que amb la duració del cultiu o per

altres limitacions no s'han pogut consumir totalment els components solubles de l'extracte de llevat, per tant, seria possible assolir concentració de biomassa més elevada.

Per l'altre fong estudiat *P.ostreatus* la biomassa ha estat màxima ($11,6 \pm 2,6$ g/L) també amb una concentració de 100% d'extracte de llevat (Fig. 1b). Pel que fa al consum de substrat, s'observa una tendència semblant al cas amb *G.lucidum* encara que si s'observa un lleuger consum de substrat ($7,8$ gO₂/L) en el cas amb 0% extracte de llevat. Això indica que la sacarosa s'ha consumit en molt poca quantitat. Com també passa amb *G.lucidum*, per al cas amb 100% d'extracte de llevat encara no s'ha consumit totalment la fracció soluble del substrat, ja que no s'assoleix el valor corresponent a la sacarosa. En un principi pot semblar que la producció de biomassa ha estat major per al cas amb *G.lucidum*, no obstant, les biomasses d'ambdós experiments no poden ser comparades, pel fet que s'han emprat diferents tipus de filtre.

En aquests experiments s'ha demostrat que l'extracte de llevat és un bon substrat per a la producció de miceli tant per a *G.lucidum* com per a *P.ostreatus*, ja que s'ha observat un consum d'aquest i s'ha produït biomassa de forma proporcional a la concentració d'aquest substrat. En canvi, la sacarosa no ha resultat ser un bon substrat, perquè en els experiments on era l'únic substrat present no hi ha hagut pràcticament creixement.

Composició de l'extracte de llevat

L'extracte de llevat utilitzat en aquest treball és un subproducte de la indústria cervesera. Per a equiparar-ho a altres treballs on s'utilitza extracte de llevat comercial, s'ha caracteritzat la biomassa continguda en cadascuna de les fraccions. A més s'han comparat diferents lots d'extracte de llevat per a estudiar si existeix cap desviació en el contingut d'aquest.

Taula 1 Biomasses de cadascuna de les fraccions de l'extracte de llevat

Fracció	Biomassa (g/L) extracte de llevat 1	Biomassa (g/L) extracte de llevat 2
Total	30,7	31,0
Retingut filtre (1,2 µm)	$19,4 \pm 0,6$	$22,7 \pm 0,0$
Retingut filtre (22 µm)	$18,3 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,1$

A la Taula 1 s'observa que segons la mida de les partícules que componen l'extracte de llevat es pot separar en diferents fraccions. Quant a la fracció retinguda en filtres de 22 µm de diàmetre de porus, aquesta està composta principalment per restes dels ingredients de

la producció de cervesa, podent ser restes de cereals. En aquest filtre no s'estima que quedin retinguts els llevats, ja que aquests tenen una mida més petita.¹⁶ Una altra fracció és la retinguda en filtres d'1,2 µm de diàmetre de porus, en aquesta s'estima que a part de les restes dels ingredients, també quedin retinguts els llevats sencers, a causa de la seva mida. En observacions en microscopi s'han observat llevats sencers. Les biomasses d'aquesta fracció per als dos lots ($19,4 \pm 0,6$ g/L i $22,7 \pm 0,0$ g/L) són prou similars amb les obtingudes amb el filtre de 22 µm ($18,3 \pm 0,1$ g/L i $22,4 \pm 0,1$ g/L), això indica que respecte a les restes d'ingredients la massa de llevats sencers no és tan elevada. Pel que fa al total, si s'observa un augment considerable de biomassa ($30,7$ g/L i $31,0$ g/L), aquesta biomassa és superior a les anteriors, ja que conté restes d'ingredients, llevats sencers i a més lisats cel·lulars d'aquests llevats.

Efecte de l'extracte de llevat com a únic substrat per a *Ganoderma lucidum*.

Degut a no haver-se observat un consum considerable de sacarosa, s'ha estudiat la producció de miceli prescindint d'aquesta font de carboni i mantenint els altres components per al fong *G. lucidum*.

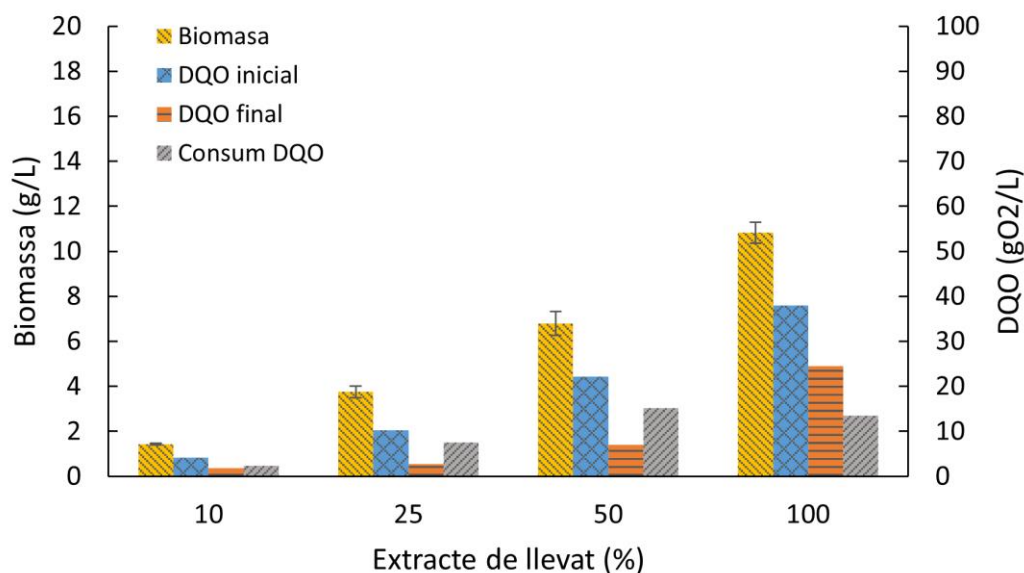


Fig. 2 Efecte de les diferents concentracions d'extracte de llevat en el cultiu a 96 h per a *Ganoderma lucidum* sense sacarosa.

En els resultats d'aquest experiment (Fig. 2), s'observa que igual que en els anteriors casos (Fig. 1a), un augment de la concentració d'extracte de llevat resulta en una major producció de biomassa, sent el cas amb major biomassa ($10,8 \pm 0,5$ g/L) quan s'utilitza una

concentració del 100% d'extracte de llevat. Si s'observa la mesura de la DQO, es constata que el consum d'aquest paràmetre és similar ($15,2 \text{ gO}_2/\text{L}$ i $13,5 \text{ gO}_2/\text{L}$) en els casos de 50% i 100% d'extracte de llevat respectivament. Això indica que encara és possible assolir una concentració més alta de biomassa per al cas amb 100% d'extracte de llevat, però per la durada de la fermentació, falta de nutrients o limitació de transferència d'oxigen no es pot consumir totalment tot el substrat.

Efecte de la temperatura a 30°C sobre la producció de biomassa.

Els anteriors experiments s'han realitzat a 25°C , degut a la disponibilitat tècnica de treballar a 30°C s'ha estudiat com afecta al cultiu treballar a aquestes condicions. En aquest estudi s'han fet cultius amb les dues concentracions d'extracte de llevat que han proporcionat millors resultats, 50% i 100%, i amb els dos fongs. La font de carboni ha estat 30 g/L de sacarosa i el temps de cultiu de 96 h, igual que en anteriors experiments.

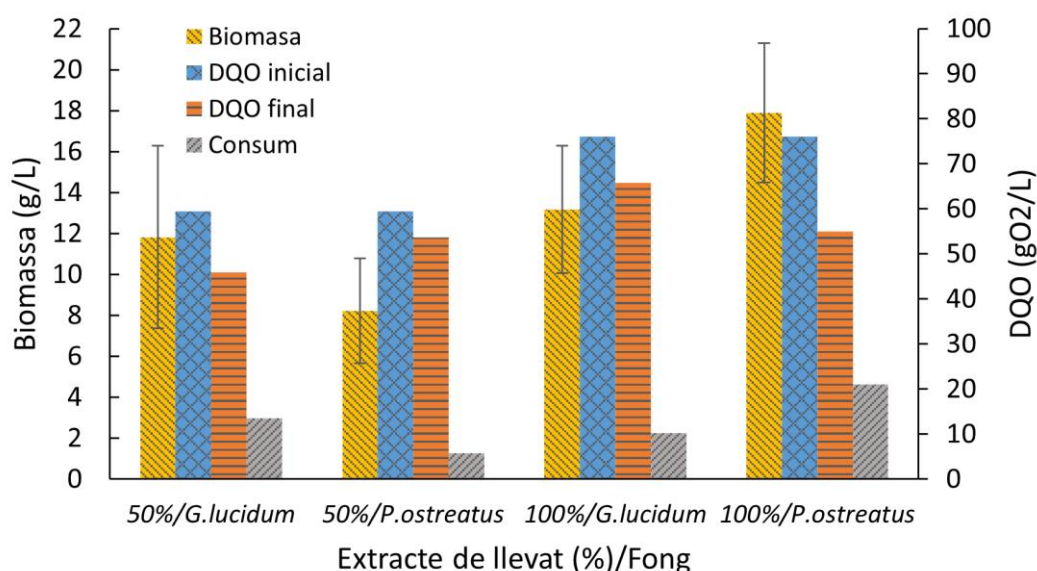


Fig. 3 Biomassa obtinguda amb diferents concentracions d'extracte de llevat en el cultiu a 96 h per a *G.lucidum* i *P.ostreatus* utilitzant una concentració de sacarosa de 30 g/L i temperatura de 30°C .

En els resultats d'aquest experiment (Fig. 3), es poden apreciar diferències significatives en els dos fongs. Quant als cultius amb una concentració del 50% d'extracte de llevat, amb *G.lucidum* s'ha obtingut més biomassa ($11,8 \pm 4,5 \text{ g/L}$) en comparació amb *P.ostreatus* ($8,2 \pm 2,5 \text{ g/L}$), això concorda amb els consums, ja que per a *G.lucidum* el consum de DQO ($13,6 \text{ gO}_2/\text{L}$) és més del doble que per a *P.ostreatus* ($5,75 \text{ gO}_2/\text{L}$).

No obstant, quan s'utilitza una concentració del 100% d'extracte de llevat els resultats són prou diferents. Per a *P.ostreatus* la biomassa produïda ($17,9 \pm 3,4 \text{ g/L}$) ha estat superior a

l'obtinguda amb *G.lucidum* ($13,2 \pm 3,1$ g/L). Igual que en l'anterior aquesta diferència en la producció de biomassa està associada a un major consum del substrat. Una altra observació interessant és que tot i haver-hi més substrat en el cas amb 100% d'extracte de llevat, per al cas de *P.ostreatus* la DQO final assoleix un valor molt similar en ambdós casos ($53,7$ gO₂/L i $54,9$ gO₂/L), això indica que la sacarosa tampoc s'està consumint a 30°C i que a aquesta temperatura sí que es consumeix l'extracte de llevat pràcticament en la seva totalitat, a diferència d'altres experiments (Fig. 1b) on per a una concentració del 100% d'extracte de llevat la DQO és molt superior a la de les altres concentracions. En el cas de *G.lucidum* la DQO final per a les concentracions de 50% i 100% d'extracte de llevat sí que són lleugerament diferents ($45,9$ gO₂/L i $65,8$ gO₂/L), això pot indicar que encara que s'augmenti la temperatura a 30°C el consum d'aquest substrat segueix essent prou lent per a no poder-se consumir totalment en 96 h.

Si per a *G.lucidum* es comparen els resultats obtinguts a 30°C (Fig. 3) amb els obtinguts a 25°C sense sacarosa (Fig. 2), s'observa que tant les biomasses obtingudes amb 50% d'extracte de llevat ($11,8 \pm 4,5$ g/L i $6,8 \pm 0,4$ g/L respectivament), com les obtingudes amb 100% ($13,2$ g/L i $10,8$ g/L respectivament) són superiors per al cultiu a 30°C amb sacarosa. Com el consum de sacarosa s'ha observat que és pràcticament nul en els experiments anteriors, aquesta diferència està associada a la diferent velocitat de creixement deguda a la diferència de temperatura.

En el cas de *P.ostreatus*, les biomasses obtingudes a 30°C (Fig. 3) també són superiors a les obtingudes a 25°C (Fig. 1b) tant per a 50% d'extracte de llevat ($8,2 \pm 2,6$ g/L i $7,0 \pm 1,5$ g/L respectivament), com per a 100% d'extracte de llevat ($17,9 \pm 3,4$ g/L i $11,6 \pm 2,6$ g/L respectivament). Com ja s'ha observat anteriorment, aquest augment és atès al fet que a 30°C si es consumeix l'extracte de llevat el màxim possible, destacant el cas amb 100% d'extracte de llevat on la diferència de biomassa entre els dos experiments és molt considerable ($6,3$ g/L), respecte a 50% d'extracte de llevat ($1,2$ g/L).

Efecte de la glucosa com a font de carboni i augment de la concentració de nutrients.

En els anteriors experiments s'ha observat que una concentració del 100% d'extracte de llevat assoleix una major concentració de biomassa. A més, es pot esperar que aquesta concentració sigui més alta, ja que el substrat no es consumeix en la seva totalitat. Una de les hipòtesis és que una falta de nutrients deté el creixement, per tant, s'ha augmentat en

un 50% la concentració tant de micronutrients com macronutrients. També s'ha augmentat el temps de cultiu i s'han fet experiments a diferents temps per a tindre més informació de l'evolució dels diferents paràmetres. Quant a la font de carboni s'ha optat per substituir els 30 g/L de sacarosa per 15 g/L de glucosa, ja que aquesta última ha resultat ser una bona font de carboni en fermentacions similars.^{8,17} Quant a la temperatura, aquesta ha estat controlada a 25°C.

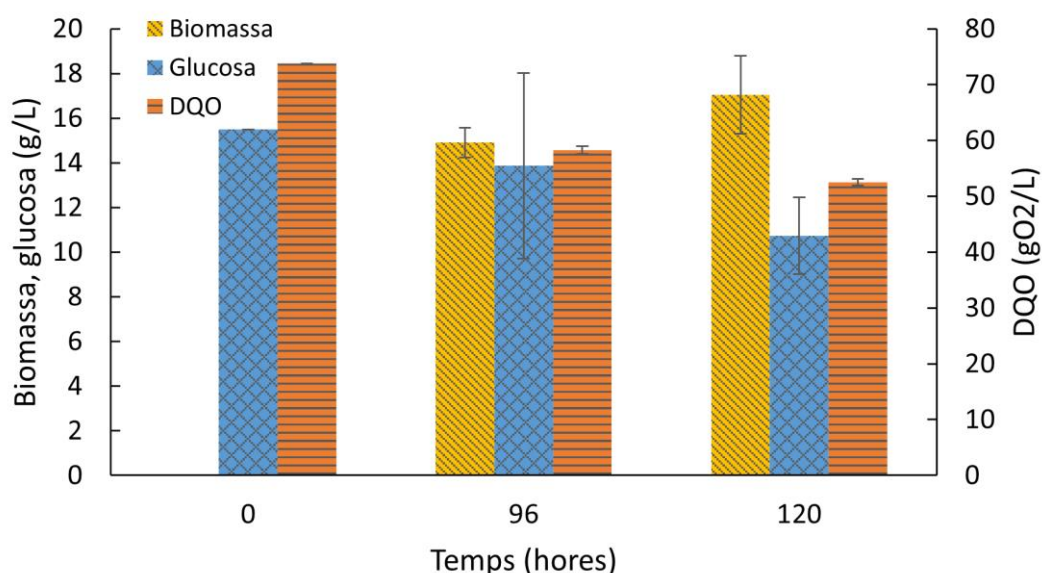


Fig. 4 Evolució del cultiu de *Ganoderma lucidum* emprant un medi amb 100% d'extracte de llevat i 15 g/L de glucosa.

Per al fong *G.lucidum* s'ha aconseguit augmentar la concentració de biomassa produïda al cap de 96 h ($14,9 \pm 0,7$ g/L) i s'ha obtingut encara més biomassa allargant el cultiu al cap de 120 h ($17,0 \pm 1,7$ g/L) (Fig. 4). Si es comparen els resultats amb els obtinguts a 30°C, per a un temps de 96 h, s'observa que augmentar els nutrients i utilitzar glucosa augmenta la biomassa en un 13% aproximadament. No obstant, en aquest punt el consum de glucosa no ha estat significatiu, ja que la concentració d'aquesta ($13,9 \pm 4,1$ g/L) és molt similar als 15 g/L inicials. En canvi, al cap de 120 h si s'observa una disminució de la concentració de glucosa ($10,7 \pm 1,7$ g/L), això pot indicar que el fong té predisposició de consumir l'extracte de llevat i en un cert moment del cultiu canvia el metabolisme i comença a consumir la glucosa.

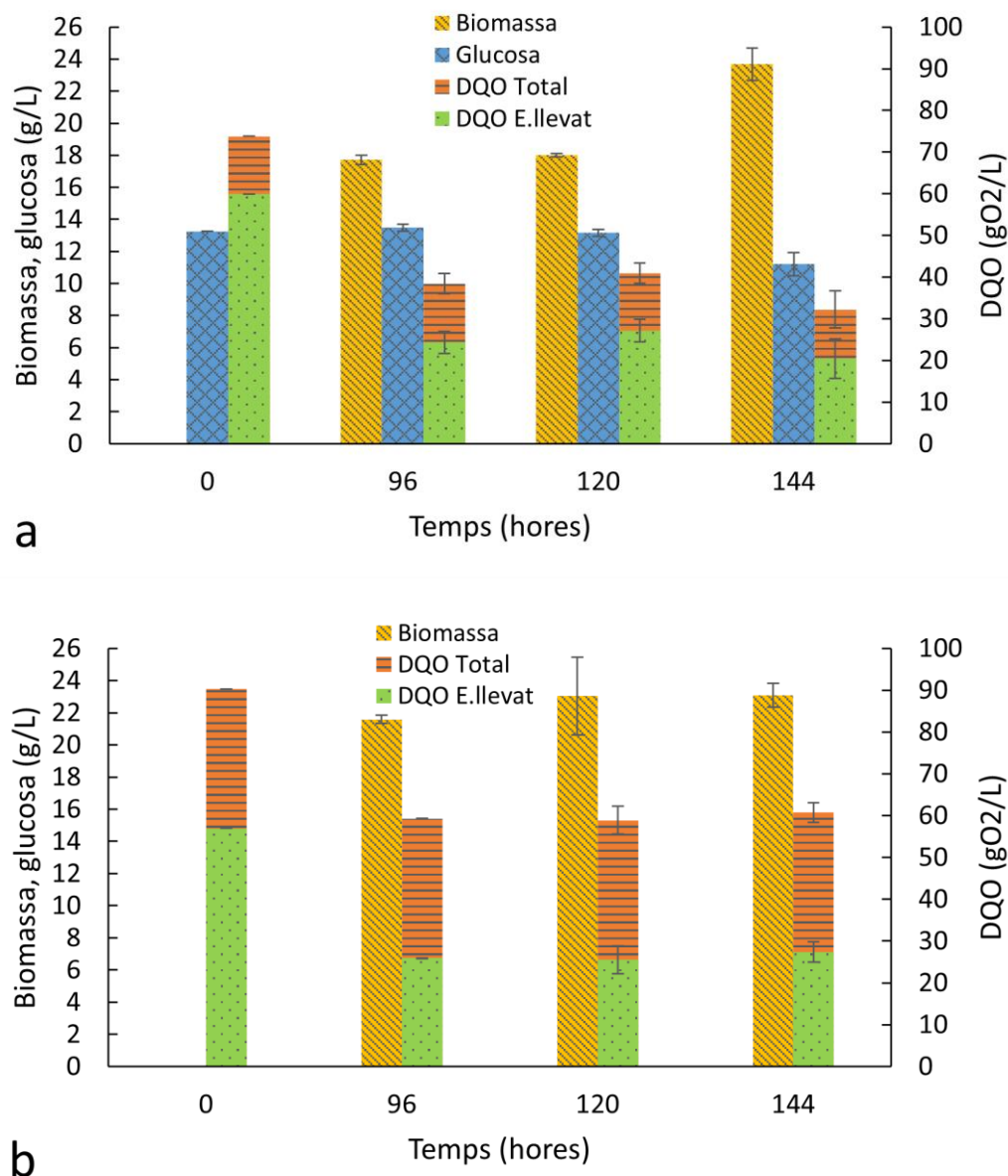


Fig. 5 Evolució del cultiu de *Pleurotus ostreatus* emprant un medi amb 100% d'extracte de llevat , per als casos amb 15 g/L de glucosa (a) i 30g g/L de sacarosa (b).

Amb *G.lucidum* s'ha observat que encara hi havia creixement passades les 120 h, per tant, per a *P.ostreatus* s'ha allargat el cultiu a 144 h. A més de fer cultius amb glucosa i afegint més nutrients, s'han fet també cultius amb sacarosa com a font de carboni per a poder comparar aquests dos substrats en les mateixes condicions. La biomassa obtinguda a 96 h ha estat superior amb l'augment de nutrients ($17,7 \pm 0,3$ g/L i $21,6 \pm 0,3$ g/L) per a la glucosa (Fig. 5a) i la sacarosa (Fig. 5b), respectivament. Per a aquest punt de la fermentació la sacarosa obté uns millors resultats, però en el cas de 144 h la biomassa produïda amb glucosa ($23,7 \pm 1,0$ g/L) és pràcticament igual a la produïda amb sacarosa ($23,1 \pm 0,7$ g/L). Aquesta diferència pot semblar poc significativa, però si s'observa la tendència de les

biomasses en ambdós casos, s'observa que en el cas de la sacarosa el creixement s'estanca al cap de 120 h, en canvi, per a la glucosa entre les 120 h i les 144 h encara s'observa un creixement significatiu. Aquest canvi de tendència pot ser degut al consum de glucosa, ja que només s'observa una disminució d'aquesta ($11,2 \pm 0,7$ g/L) a les 144 h respecte a la concentració inicial de glucosa (13,25 g/L).

En conèixer la concentració de glucosa i en suposar que la sacarosa no s'ha consumit, es pot calcular la DQO corresponent a aquests substrats coneixent les DQO teòriques.¹⁸ Amb aquests valors es pot calcular la DQO corresponent a la resta del medi, que quasi en la seva totalitat és extracte de llevat. Al cap de 144 h, aquesta DQO corresponent a l'extracte de llevat pel cas de la glucosa ($20,5 \pm 4,7$ gO₂/L) és inferior a la del cas amb sacarosa ($27,4 \pm 2,4$ gO₂/L). Com ja s'ha comentat anteriorment, l'extracte de llevat té una fracció insoluble que acaba formant part de la biomassa mesurada, per tant, la biomassa obtinguda amb la sacarosa (Fig. 5b) té major proporció d'extracte de llevat. Això indica que amb la glucosa s'obté una biomassa de miceli major a l'obtinguda amb la sacarosa. Aquesta diferència en valors de DQO d'extracte de llevat porta a indicar que aquest extracte de llevat es consumeix més fàcilment en presència de la glucosa o és inhibït per la presència de sacarosa. Això concorda amb estudis similars que utilitzen altres espècies del gènere *Pleurotus*, on s'ha observat que la glucosa és millor substrat que la sacarosa.¹⁹

Si es comparen aquestes dues fonts de carboni des d'un aspecte econòmic, no hi ha una diferència significativa en els costos de matèria primera, ja que la sacarosa té un preu d'aproximadament 450€/t²⁰ i la glucosa té un preu aproximat de 1.000€/t²¹, s'ha de tindre en compte que s'utilitza el doble de quantitat quan s'utilitza sacarosa.

L'augment de nutrients ha donat com a resultat en una gran millora, causant un augment de producció de biomassa considerable. A més s'ha observat que els cultius a 96 h encara tenen potencial de créixer fins com a mínim les 144 h. La glucosa ha resultat ser un bon substrat enfront de la sacarosa per a fermentacions més llargues, ja que hi ha un canvi de metabolisme que acaba consumint la glucosa un cop s'ha acabat l'extracte de llevat, el qual es consumeix amb preferència.

Producció de biomassa en bioreactors a escala laboratori

Per tal d'estudiar si seria factible produir proteïna fúngica a escala industrial, s'han fet cultius en fermentadors a escala laboratori amb un volum útil d'1,5 L i 2 L. Per a aquests experiments s'ha optat per utilitzar el medi optimitzat que conté glucosa i major proporció

de macronutrients i micronutrients, ja que és el que ha donat millors resultats quant a la producció de biomassa. Quant a la temperatura, s'ha optat per treballar a 30°C, pel fet que és amb la qual s'han obtingut millors resultats (Fig. 3). El fermentador a part de permetre treballar a una temperatura de 30°C, solucionarà els problemes de transferència d'oxigen que es poden ocasionar en les fermentacions en matrassos d'Erlenmeyer.

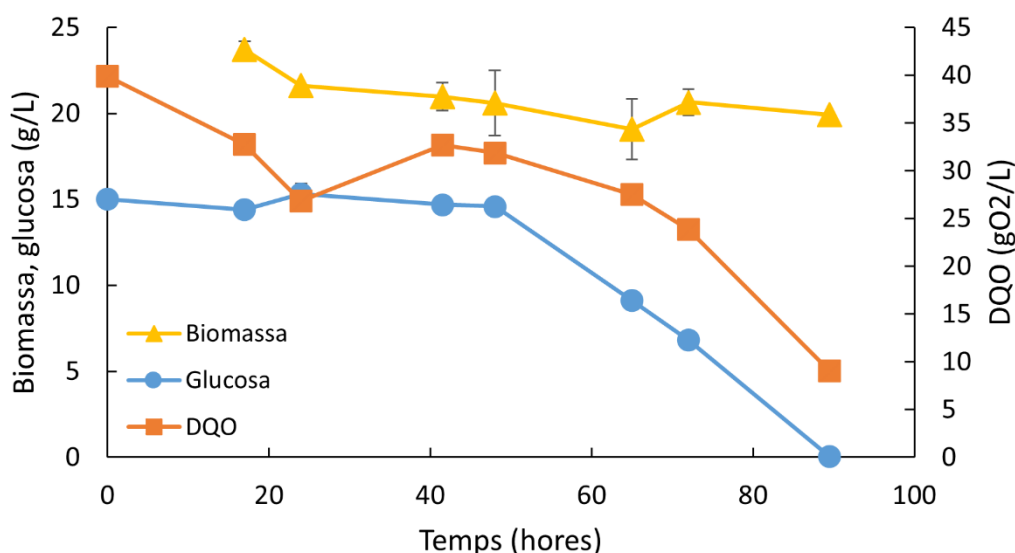


Fig. 6 Evolució del cultiu de *P.ostreatus* amb 100% d'extracte de llevat i 15 g/L de glucosa (volum útil 2 L).

En el cultiu amb *P.ostreatus* (Fig. 6), s'obté una biomassa ($19,9 \pm 0,8$ g/L) lleugerament inferior a l'obtinguda en altres experiments ($23,7 \pm 1,0$ g/L) (Fig. 5a). Aquesta diferència en un principi no concorda amb la concentració de substrat, ja que en aquest experiment la concentració de substrat total al final de l'experiment ($9,1 \pm 0,9$ gO₂/L) és molt inferior a l'obtinguda en experiments similars ($32,2 \pm 4,5$ gO₂/L) (Fig. 5a). La principal hipòtesi és que aquesta diferència es deu a dos factors. El primer és que com ja s'ha comentat anteriorment, l'extracte de llevat en els experiments amb matrassos d'Erlenmeyer no s'ha pogut separar del miceli, per tant, aquest suma a la concentració de biomassa. Per tant, en experiments anteriors la biomassa és superior perquè té més contingut d'extracte de llevat, resultant en més concentració de substrat. En canvi, en l'experiment amb fermentador la proporció de miceli és major, evidenciat per una menor quantitat de substrat. El segon factor és que aquest cultiu va patir una lleugera contaminació per part d'un fong del gènere *Penicillium*, el creixement d'aquest podria haver alterat els valors dels resultats. No obstant aquest fong és fàcilment diferenciable de *P.ostreatus*, ja que el *Penicillium* té un color verdós i *P.ostreatus* en el cultiu adopta un color blanc o marró (en funció de si ha estat en contacte amb l'extracte de llevat).

Quant a l'evolució de la biomassa al llarg del cultiu, aquesta té una tendència decreixent pels motius anteriorment descrits. Això mostra la dificultat d'estudiar l'evolució del creixement utilitzant aquest subproducte d'extracte de llevat, per aquest motiu és molt important poder mesurar l'evolució dels substrats, ja que aquests són els que donen una millor evolució de com s'està comportant el cultiu.

Si s'observen les evolucions dels substrats (Fig. 6), es pot apreciar que la mescla de substrats, DQO total, baixa lleugerament fins a les 48 h. No obstant aquesta baixada inicial no és conseqüència del consum de glucosa, ja que aquesta fins a aquest punt encara es troba pràcticament a la concentració inicial ($14,6 \pm 0,4$ g/L). A partir de les 48 h ocorre un canvi en el metabolisme i la glucosa comença a ser consumida fins a esgotar-se. Un cop esgotada la sacarosa s'ha considerat finalitzat el cultiu.

Taula 2 Concentracions i continguts de les diferents biomasses obtingudes en el cultiu en fermentador per a *Pleurotus ostreatus*

Procedència de la biomassa	Concentració biomassa (g/L)	Contingut
Retinguda al colador	$16,3 \pm 0,6$ g/L	Principalment pèllets de miceli
Filtrat al colador	$3,4 \pm 0,2$ g/L	Principalment llevats
Creixement aeri (superfícies)	$3,1$ g/L	<i>Penicillium</i> crescut sobre miceli de <i>P.ostreatus</i>

Per a poder diferenciar millor quina part de la biomassa correspon al miceli i a l'extracte de llevat, un cop finalitzat el cultiu s'ha utilitzat un colador convencional per tal de separar els pèllets de miceli de la resta del brou, i s'han calculat els valors de biomassa corresponent a cada fracció mostrats a la Taula 2. S'observa com la biomassa final real de miceli ($16,3 \pm 0,6$ g/L) és inferior a l'obtinguda anteriorment, ja que aquesta no conté els llevats no consumits. També s'observa que una quantitat important de miceli creix de forma aèria ($3,1$ g/L) tot i no disposar de substrat constant, aquesta forma de creixement és emprada en la producció de certs productes.²²

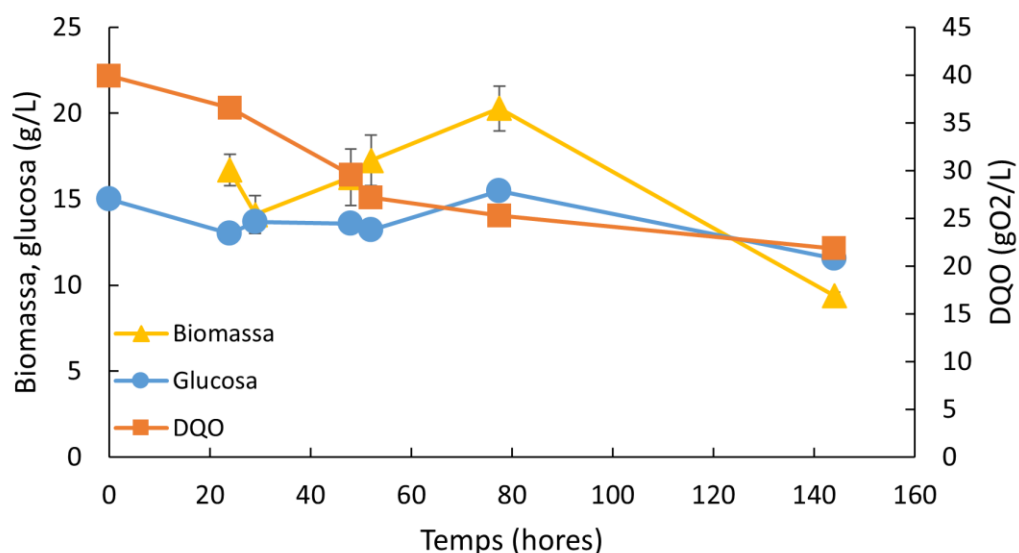


Fig. 7 Evolució del cultiu de *P.ostreatus* amb 100% d'extracte de llevat i 15 g/L de glucosa (volum útil 1,5 L).

Per al cultiu amb *G.lucidum* (Fig. 7) la màxima biomassa obtinguda ($20,3 \pm 1,3$ g/L), ha estat superior a l'obtinguda en experiments amb matrassos d'Erlenmeyer ($17,0 \pm 1,7$ g/L) (Fig. 4). En aquest experiment la biomassa màxima s'ha obtingut al cap de 77,5 h, a partir d'aquest punt el cultiu entra en una fase de decreixement fins a arribar a una concentració final de $9,4 \pm 0,2$ g/L, moment en que s'atura la fermentació. Aquesta mort cel·lular pot haver estat causada per problemes de transferència d'oxigen en combinació amb una alta agitació, augmentada per la cascada de control. A diferència del cas amb *P.ostreatus*, en aquest cultiu no s'ha consumit totalment la glucosa, quedant una concentració residual d' $11,5 \pm 0,2$ g/L. Tot i això, la tendència ha estat semblant, ja que aquest poc consum s'ha produït en la part final de la fermentació, començant a les 80 h aproximadament. El no esgotament de la font de carboni i una posterior lisi cel·lular pot indicar que hi ha una falta de nutrients, per tant, es podria estudiar la possibilitat d'augmentar la concentració d'algun compost del medi. Quant a la DQO, aquesta ha anat decreixent des del començament del cultiu igual que amb *P.ostreatus*, la DQO final ($21,8$ gO₂/L) en canvi, és superior però per l'efecte de la glucosa no consumida.

Taula 3 Concentracions i continguts de les diferents biomasses obtingudes en el cultiu en fermentador per a *Ganoderma lucidum*

Procedència de la biomassa	Concentració biomassa (g/L)	Contingut
Retinguda al colador	1,3 g/L	Pèllets de miceli
Filtrat del colador	8,7±0,4 g/L	Pèllets de miceli petits i llevats
Creixement aeri (superfícies)	1,8 g/L	Miceli

Per tal d'avaluar les diferents fraccions de la biomassa final s'han separat en 3 fraccions mostrades a la Taula 3. Degut a la lisi cel·lular, els pèllets obtinguts al final del cultiu han resultat ser prou petits per a no quedar retinguts en el colador, ocasionant una concentració molt baixa d'1,3 g/L. En canvi, el filtrat del colador ha presentat la majoria de la biomassa produïda (8,7±0,4 g/L). Quant a la fracció aèria, aquesta ha resultat ser 1,8 g/L. El creixement d'aquesta fracció està relacionada amb la forma del reactor, ja que si hi ha més superfície de reactor no submergida i l'agitació permet que el medi esquitxi les parets, es fomentarà aquest tipus de creixement.

Caracterització organolèptica i morfològica de la biomassa produïda en reactors a escala laboratori

La finalitat de la biomassa produïda és ser l'ingredient principal d'aliments substitutius de la carn per a humans. Per aquest motiu és molt important avaluar les diferents característiques organolèptiques, ja que la viabilitat comercial del producte resultant dependrà de les sensacions del consumidor al menjar l'aliment. També és important avaluar altres característiques relacionades amb la morfologia i les propietats físiques de la biomassa, de cara a millorar el procés.

Taula 4 Característiques organolèptiques i morfològiques de la biomassa produïda en reactors a escala laboratori per a *Ganoderma lucidum* i *Pleurotus ostreatus*

Característica	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Color	Marró clar	Marró clar
Olor	Bolet, humit i cereals	Semblant a Olivada, “Chetos” o menjar sense especificar
Textura	Espessa, rugosa i cremosa	Flonja, cremosa i granular
Diàmetre mitjà del pèllet	0,1-1 mm	2-3 mm
Forma dels pèllets	Esfèrica	Esfèrica
Sedimentació	Fàcilment sedimentable	Fàcilment sedimentable
Pes humit/pes sec	12,2±0,7	11,8±0,4
Presència metabòlits	Metabòlits viscosos	No

A la Taula 4 s’indiquen les diferents característiques per als dos fongs. Quant al color, ambdós fongs han presentat un color marró clar molt similar, aquest és degut a l’extracte de llevat que tenyeix el miceli blanc dels fongs. Quant a l’olor si es presenten algunes diferències. Per a *G.lucidum* l’olor ha estat molt semblant a la de l’extracte de llevat i de bolet, sent molt més fàcil relacionar-la amb menjar corrent. En canvi, per a *P.ostreatus* ha estat molt més difícil caracteritzar l’olor, ja que no s’assimila a cap olor coneguda sinó a una mescla d’olors, això pot ser causat principalment per la contaminació amb *Penicillium*. No obstant, per ambdós casos, l’olor d’alcohol procedent de l’extracte de llevat no s’ha detectat, pel fet que les restes d’etanol s’han consumit o s’han vaporitzat per l’aeració continua dels cultius.

Quant a la textura aquesta ha estat molt relacionada amb la mida dels pèllets obtinguts. Per a *G.lucidum*, en haver-se lisat la biomassa els pèllets han resultat en ser molt petits (0,1-1 mm de diàmetre) donant a la biomassa resultant una textura molt rugosa semblant a les farinetes. En canvi, per a *P.ostreatus* la major mida de pèllet (2-3 mm de diàmetre) ha donat com a resultat una textura molt més granular i flonja. La morfologia dels pèllets formats, a part de tindre un efecte important sobre l’aspecte final del producte, també té una gran relació amb la productivitat del procés. Aquesta última relació entre morfologia i productivitat ha estat àmpliament estudiada en diferents treballs. En aquests s’ha determinat que treballar amb pèllets més petits ocasiona un augment de la productivitat degut a una millor disponibilitat d’oxigen i substrat per part del fong.²³ La mida dels pèllets està condicionada directament amb les condicions del cultiu, per a *Pleurotus ostreatus*

estudis han determinat que una major agitació i aeració causa una menor mida de pèllet i major concentració de biomassa.^{24,25}

Pensant en una separació posterior de la biomassa, ambdós fongs presenten una sedimentació molt similar fent que siguin fàcilment separats del brou amb una sedimentació o centrifugació. Quant al contingut en aigua, ambdós fongs tenen una relació pes humit pes sec similar ($12,2 \pm 0,7$ i $11,8 \pm 0,4$), demostrant que son capaços de retenir molta quantitat d'aigua. Per últim, en *G.lucidum* si s'han observat metabòlits viscosos en les mostres del reactor, aquests corresponen a polisacàrids extracel·lulars produïts normalment per aquest fong.²⁶

Conclusions

Tant *G.lucidum* com *P.ostreatus* han mostrat tenir un gran potencial quant a la producció de micoproteïna. Ambdós han estat cultivats de forma submergida obtenint-se uns bons resultats tant en matrassos d'Erlenmeyer com en fermentadors a escala laboratori. L'extracte de llevat provinent de la indústria cervesera ha mostrat ser un molt bon substrat per a aquest tipus de cultiu, ja que es consumeix i s'han obtingut resultats favorables a major concentració d'aquest. Això demostra que l'economia circular és viable, ja que un subproducte pot ser matèria primera per a altres processos, a part d'abaratir el cost i reduir l'impacte mediambiental. La sacarosa ha mostrat no ser una bona font de carboni per a aquests fongs en aquestes condicions. En canvi, amb glucosa s'han obtingut millors resultats quant a producció de biomassa, sent consumida per *P.ostreatus* en gran mesura i lleugerament consumida per al cas de *G.lucidum*. Una de les principals dificultats ha estat diferenciar entre la biomassa de llevat i la de fong, per tant, seria convenient estudiar una tècnica analítica que permetés obtenir uns millors resultats. Per a implementar un producte comercial a base d'aquesta micoproteïna, s'hauria de fer un estudi del sabor, dels nutrients que aporta i de seguretat alimentària.

Referències

1. Tubiello, F. N. *et al.* Greenhouse gas emissions from food systems: building the evidence base. *Environmental Research Letters* **16**, 065007 (2021).
2. Xu, X. *et al.* Global greenhouse gas emissions from animal-based foods are twice those of plant-based foods. *Nat Food* **2**, 724–732 (2021).

3. Boyd, C. E., McNevin, A. A. & Davis, R. P. The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. *Food Secur* **14**, 805–827 (2022).
4. González, A. D., Frostell, B. & Carlsson-Kanyama, A. Protein efficiency per unit energy and per unit greenhouse gas emissions: Potential contribution of diet choices to climate change mitigation. *Food Policy* **36**, 562–570 (2011).
5. Nezlek, J. B. & Forestell, C. A. Meat substitutes: current status, potential benefits, and remaining challenges. *Curr Opin Food Sci* **47**, 100890 (2022).
6. Upcraft, T. *et al.* Protein from renewable resources: mycoprotein production from agricultural residues. *Green Chemistry* **23**, 5150–5165 (2021).
7. Zeng, B., Nilsson, K., Teixeira, P. G. & Bergenståhl, B. Study of mycoprotein extraction methods and its functional properties. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **659**, 130800 (2023).
8. Bakratsas, G. *et al.* Single-cell protein production by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Sustainable Food Technology* **1**, 377–389 (2023).
9. González, A. *et al.* Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. *Food Funct* **11**, 7400–7414 (2020).
10. Phat, C., Moon, B. & Lee, C. Evaluation of umami taste in mushroom extracts by chemical analysis, sensory evaluation, and an electronic tongue system. *Food Chem* **192**, 1068–1077 (2016).
11. El-Ramady, H. *et al.* Edible Mushrooms for Sustainable and Healthy Human Food: Nutritional and Medicinal Attributes. *Sustainability* **14**, 4941 (2022).
12. Cör, D., Knez, Ž. & Knez Hrnčič, M. Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma Lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review. *Molecules* **23**, 649 (2018).
13. Garcia-Garcia, G., Stone, J. & Rahimifard, S. Opportunities for waste valorisation in the food industry – A case study with four UK food manufacturers. *J Clean Prod* **211**, 1339–1356 (2019).
14. Huynh, D., Kaschabek, S. R. & Schlömann, M. Effect of inoculum history, growth substrates and yeast extract addition on inhibition of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* by NaCl. *Res Microbiol* **171**, 252–259 (2020).
15. Tao, Z. *et al.* Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. *J Microbiol Biotechnol* **33**, 151–166 (2023).
16. Zakhartsev, M. & Reuss, M. Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. *FEMS Yeast Res* **18**, (2018).
17. Yang, B., Kai, J., Dai, D., Chen, G. & Hu, W. Systematic Optimization of *Ganoderma lucidum* Polysaccharide Fermentation: A Guidance for Industrialization. *Am J Biochem Biotechnol* **19**, 358–372 (2023).

18. Baker, J. R., Milke, M. W. & Mihelcic, J. R. Relationship between chemical and theoretical oxygen demand for specific classes of organic chemicals. *Water Res* **33**, 327–334 (1999).
19. Confortin, F. G. *et al.* Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**, 1149–1155 (2008).
20. Maitah, M. *et al.* Future Development of Sugar Market in the European Union in the Period 2023–2032. *Sugar Tech* **26**, 295–304 (2024).
21. Dickson, R. *et al.* Sustainable bio-succinic acid production: superstructure optimization, techno-economic, and lifecycle assessment. *Energy Environ Sci* **14**, 3542–3558 (2021).
22. Vandelook, S., Elsacker, E., Van Wylick, A., De Laet, L. & Peeters, E. Current state and future prospects of pure mycelium materials. *Fungal Biol Biotechnol* **8**, 20 (2021).
23. Veiter, L., Rajamanickam, V. & Herwig, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 2997–3006 (2018).
24. Kim, Y.-M. & Song, H.-G. Effect of fungal pellet morphology on enzyme activities involved in phthalate degradation. *The Journal of Microbiology* **47**, 420–424 (2009).
25. Tinoco-Valencia, R., Gómez-Cruz, C., Galindo, E. & Serrano-Carreón, L. Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. *J Biotechnol* **177**, 67–73 (2014).
26. Kachrimanidou, V. *et al.* *Ganoderma lucidum* Mycelia Mass and Bioactive Compounds Production through Grape Pomace and Cheese Whey Valorization. *Molecules* **28**, 6331 (2023).