



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

***“EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD DE GLUCOSA Y
ÁCIDO LÁCTICO GENERADO A PARTIR DE UN
RESIDUO DE CEREAL EMPLEADO EN LA
INDUSTRIA CERVECERA”***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

AURORA MAGDALENO HERNÁNDEZ



CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	M. en C. Lucía Cornejo Barrera
Vocal	M. en A. I. Landy Irene Ramírez Burgos
Secretario	M en C. Rolando Salvador García Gómez
1er. Suplente	Dra. Marisela Bernal González
2do. Suplente	Dra. María del Carmen Durán Domínguez

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, (LIQAyQA) del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. María del Carmen Durán Domínguez

SUSTENTANTE

Aurora Magdaleno Hernández

Declaración

“Declaro conocer el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, plasmado en la Legislación Universitaria. Con base en las definiciones de integridad y honestidad ahí especificadas, aseguro mediante mi firma al alcance que el presente trabajo es original y enteramente de mi autoría. Todas las cita de, o referencia a, las obras de otros autores aparecen debida y adecuadamente señaladas, así como acreditadas mediante recursos editoriales convencionales”

Aurora Magdaleno Hernández

RECONOCIMIENTOS

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química de la UNAM y a la Sección 024 de AAPAUNAM, por el apoyo financiero proporcionado por medio de la Cátedra: Zoila Nieto Villalobos.

Al Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza, PAPIIME, Proyecto Clave: PE 100514. “Desarrollo de material didáctico para las asignaturas ingeniería ambiental y estancia académica de la carrera de ingeniería química con base en estudios de caso” de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA de la UNAM.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado, PAIP, de la Facultad de Química de la UNAM Clave: 5000-9067 por el financiamiento para la realización del análisis de HPLC en la Unidad de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química.

Al cepario de la Facultad de Química por la donación de la bacteria *Lactobacillus casei* sp.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM, por los servicios brindados a esta investigación.

Al programa de equipamiento para universidades en el extranjero por parte de autoridades públicas alemanas (German Academic Exchange Service) (DAAD) Proyecto 212.104401.354 por la donación del equipo para realizar las determinaciones de 250 muestras de nitrógeno total Kjeldahl en alimentos.

ÍNDICE

	Página
I. ÍNDICE DE TABLAS	IV
II. ÍNDICE DE GRÁFICAS	V
III. ÍNDICE DE FIGURAS	V
IV. GLOSARIO DE TÉRMINOS	VII
V. ABREVIATURAS, SIGLAS Y UNIDADES	VIII
VI. RESUMEN	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Problemática	1
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivos	3
CAPÍTULO 2. RESIDUO CERVECERO UN MEDIO PARA PRODUCIR ÁCIDO LÁCTICO	
2.1 Grano de cebada	5
2.1.1 Producción de cebada en México	9
2.2 Cerveza	10
2.2.1 Elaboración de cerveza	11
2.3 Residuo de malta o grano tratado (cervecero)	17
2.3.1 Características del residuo cervecero	17
2.3.2 Posibles aplicaciones del residuo de cerveza	18
2.4 El ácido láctico	21
2.4.1 Descripción del ácido láctico	22
2.4.2 Síntesis química del ácido láctico	23
2.4.3 Producción biotecnológica del ácido láctico	24
2.4.3.1 Obtención del ácido láctico por medio de <i>Lactobacillus</i>	27
2.4.4 Obtención de ácido láctico usando un material residual	31
2.4.4.1 Hidrólisis químicas (ácida –alcalina)	32
2.4.4.2 Hidrólisis enzimática (celulasas)	34
CAPÍTULO 3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y METODOLOGÍA	
3.1 Metodología	37
3.2 Hipótesis	37
3.3 Diseño de experimentos	37

	Página	
3.3.1	Factores del análisis de varianza	38
3.4	Metodología del desarrollo experimental	39
3.5	Preparación de las muestras	41
3.5.1	Materia prima utilizada	41
3.5.2	Proceso de hidrólisis químicas (ácida-alkalina)	41
3.5.2.1	Hidrólisis ácida con H ₂ SO ₄ al 1.0% o 2.0% v/v	42
3.5.2.2	Hidrólisis alcalina con NaOH al 2% o 4% m/v	42
3.6	Proceso de hidrólisis enzimática	43
3.6.1	Determinación de glúcidos reductores (glucosa)	44
3.6.2	Ajuste de pH del sobrenadante	45
3.7	Proceso de biodegradación y transformación bioquímica ¹ empleando <i>Lactobacillus casei sp</i>	46
3.7.1	Reactivación de la cepa de <i>Lactobacillus casei sp</i>	46
3.7.2	Preparación del medio y proceso biotecnológico seguido	46
3.8	Cuantificación de microorganismos viables	47
3.9	Determinación de ácido láctico	48
3.9.1	Cuantificación del ácido láctico mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	48
3.9.2	Limpieza de muestra para la determinación de ácido láctico	48
 CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
4.1	Proceso de hidrólisis químicas (ácida-alkalina)	49
4.2	Hidrólisis enzimática	55
4.2.1	Proceso de hidrólisis enzimática y obtención de glúcidos reductores (glucosa)	55

¹ Para este trabajo de investigación se emplea los términos **biodegradación** y/o **transformación bioquímica** para referirse a la **fermentación** como proceso de producción de ácido láctico, aunque se utiliza las denominación homofermentativo y heterofermentativo para clasificar a las bacterias lácticas del genero *Lactobacillus* dependiendo del tipo de sustrato que metabolizan ya que las referencias teóricas metodológicas consultada hacen esta clasificación. Es importante recalcar que no es objetivo de este trabajo delimitar y unificar dicho concepto considerando las diferentes posiciones así como las sugerencias realizadas por los asesores de este trabajo

El término **fermentación** fue creado por Louis Pasteur para definir la biodegradación de glucosa por *Saccharomyces cerevisiae* en un ambiente anaerobio. Desafortunadamente, por ignorancia o incuria los sucesores de Pasteur empezaron a usar este término para cualquier biodegradación sin importar si involucraba o no a la glucosa como sustrato carbonoso o si *S. cerevisiae* era o no el organismo. En esta tesis debido a que esta ignorancia e incuria persisten se usará aunque se aclara que debiera decirse **biodegradación láctica**. (Nota de la supervisora técnica quien cursó Microbiología en la Universidad de California con el Prof. Doudoroff)

		Página
4.3	Biodegradación y transformación bioquímica (fermentación)	62
4.4	Cuantificación de ácido láctico	62
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		
5.1	Conclusiones	67
5.2	Recomendaciones	69
	BIBLIOGRAFÍA	72
	ANEXOS	77
ANEXO 1	A1. DETERMINACIÓN DE GLÚCIDOS REDUCTORES (Miller-Lorenz, 1957)	77
ANEXO 2	A2. CURVA PATRÓN DE GLUCOSA	78
ANEXO 3	A3. CARACTERÍSTICAS DEL MEDIO DE CULTIVO CALDO MRS	79
ANEXO 4	A4. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS VIABLES (Miles y Misra, 1938)	81
ANEXO 5	A5. INFORMACIÓN DE LOS AJUSTES DE (MASA-VOLUMEN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA) PARA LA REALIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	83
ANEXO 6	A6. PROMEDIO DE LA CUANTIFICACIÓN DE GLÚCIDOS REDUCTORES (GLUCOSA)	85
ANEXO 7	A7. IMÁGENES DE LOS CROMATOGRAMAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO (CLAR)	89
ANEXO 8	A8. DIAGRAMA ECOLÓGICO	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
Tabla 1	Composición química del residuo de malta proveniente del proceso cervecero (Adaptado de Mussatto <i>et al</i> , 2006)	18
Tabla 2	Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico (Adaptado de Serna-Cock y Rodríguez-de-Stouvenel, 2005; INR, 2013)	22
Tabla 3	Principales bacterias productoras de ácido-láctico (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000 y Jay, 2000)	27
Tabla 4	División de la especie <i>Lactobacillus</i> en grupos (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000 y Ray y Bhunia, 2008)	28
Tabla 5	Comparación entre los procesos de hidrólisis ácida concentrada y diluida (Adaptado de Taherzadeh y Karimi, 2007)	34
Tabla 6	Factores de análisis de varianza para la desarrollo de la investigación	38
Tabla 7	Diseño de experimento propuesto para hidrólisis químicas y enzimática	39
Tabla 8	Información sobre las masas ² (húmedas y secas) de las muestras	50
Tabla 9	Información sobre los porcentajes de humedad determinados en cada etapa de hidrólisis	50
Tabla 10	Análisis de varianza (ANDEVA) para la pérdida de masa que se tiene para cada tratamiento y entre las etapas del mismo	53
Tabla 11	Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de glucosa (mg/g de malta inicial)	60
Tabla 12	Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de glucosa (mg/g de malta inicial) por tipo de muestra	60
Tabla 13	Pruebas de rangos múltiples para glucosa (mg/g de malta inicial) por tipo de muestra	61
Tabla 14	Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de glucosa (mg/g de malta inicial) por tipo de relación (2:100) y (5:100)	61
Tabla 15	Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de glucosa (mg/g de malta inicial) por tipo de muestra y las relaciones (2:100) y (5:100)	62
Tabla 16	Cantidad de ácido láctico obtenido de los 100 g de residuo de malta inicial	63

² El **peso**, en física, es la medida de la fuerza que ejerce la gravedad sobre la masa de un cuerpo. Normalmente, se considera respecto de la fuerza de gravedad terrestre. El peso depende de la intensidad del campo gravitatorio, de la posición relativa de los cuerpos y de la masa de los mismos. La **masa** es una propiedad característica de los cuerpos: la cantidad de materia, y no depende de la intensidad del campo gravitatorio, ni de su posición en el espacio. Por ejemplo, una persona de 60 kg de **masa**, pesa 60 **kg-fuerza** en la superficie de la Tierra; pero, la misma persona, en la superficie de la Luna pesaría sólo unos 10 kg-fuerza; sin embargo, su masa seguirá siendo de 60 kg. Las unidades de **peso** y **masa** tienen una larga historia compartida, en parte porque su diferencia no fue bien entendida cuando dichas unidades comenzaron a utilizarse. Cotidianamente, el término "peso" se utiliza a menudo **erróneamente** como sinónimo de masa. La unidad de **masa** del SI es el **kilogramo, kg**, y la de **fuerza** es el **Newton, N**, aunque se usa el **kg-fuerza** que no es una unidad del Sistema Internacional (<http://www.profesorenlinea.com.mx/fisica/masaypeso.htm>)

Tabla	Nombre	Página
Tabla 17	Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de ácido láctico (mg/g de malta inicial) por tipo de muestra	65
Tabla 18	Pruebas de rangos múltiples para ácido láctico (mg/g de malta inicial) por tipo de muestra	66

II. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica	Nombre	Página
Gráfica 1	Cultivo de cebada e importación de malta (FND; 2014)	10
Gráfica 2	Masas de las muestras tratadas secas, obtenidas en las hidrólisis (ácida–alcalina)	54
Gráfica 3	Aumento de glucosa respecto al tiempo para las muestras de tratamiento NO DRÁSTICO	57
Gráfica 4	Aumento de glucosa respecto al tiempo para las muestras de tratamiento DRÁSTICO	57
Gráfica 5	Aumento de glucosa respecto al tiempo para las muestras de SIN TRATAMIENTO	58
Gráfica 6	Relación de la producción de ácido láctico con la cantidad de glucosa (muestras CON TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS QUÍMICAS)	64
Gráfica 7	Relación de la producción de ácido láctico con la cantidad de glúcidos reductores (muestras SIN TRATAMIENTO)	65

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
Figura 1A	Representación general de la estructura longitudinal del grano de cebada (Adaptado de Delcuor y Hosenev, 2010)	6
Figura 1B	Estructura de las capas externas del grano de cebada (Adaptado de Delcuor y Hosenev, 2010)	6
Figura 2	Imagen de microscopía electrónica a las secciones transversales de un grano de cebada con barrido de 100 μm (Adaptado de Delcuor y Hosenev, 2010)	8
Figura 3	Secuencia del procedimiento del malteado de la cebada (Adaptado de Serna-Saldívar, 1996 y Ramos-Cuevas, 2006)	13
Figura 4	Mezcla de maltas: base pálida, chocolate, tostada y <i>black patent</i> , (CERVEZARTE Sueña Global-Bebe Local)	14
Figura 5	Secuencia del proceso de la producción de cerveza (Adaptado de Serna-Saldívar, 1996 y Ramos-Cuevas, 2006)	15
Figura 6	Molécula del ácido láctico con isomería L(+) y D(-) (Adaptado de Narayanan <i>et al.</i> , 2004)	22
Figura 7	Mezcla racémica de ácido láctico (Wikipedia, 2016)	23
Figura 8	Esquema general de la respiración y de la transformación bioquímica (glicólisis, ciclo de Krebs y la fermentación) (Tortora <i>et al.</i> , 2007)	25

Figura	Nombre	Página
Figura 9	Representación de las reacciones que ocurren en la transformación bioquímica (Adaptado de Lee, 1992)	26
Figura 10	Ruta metabólica homofermentativa (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000)	30
Figura 11	Ruta metabólica heterofermentativa (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000)	30
Figura 12	Producción de ácidos mixtos por la metabolización del piruvato (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000)	31
Figura 13	Composición del material lignocelulósico y sus principales productos de hidrólisis químicas (Adaptado de Taherzadeh y Karimi, 2007)	32
Figura 14	Representación de la estructura del material lignocelulósico (Adaptado de Mussatto y Texeira 2010)	33
Figura 15	Estructuras químicas de (a) Celulosa, (b) Hemicelulosa, (c) Lignina y (d) Almidón. (Adaptado de Kobayashi <i>et al.</i> , 2012)	35
Figura 16	Modelo general de análisis de varianza con tres factores (Johnson y Wichern, 2007)	38
Figura 17	Diagrama de flujo de la metodología realizada	40
Figura 18	Filtrado del mosto (Planta piloto de Ingeniería Química, FQ-UNAM)	41
Figura 19A	Malta sometida a hidrólisis ácida	42
Figura 19B	Lavado de la malta después de la hidrólisis ácida	42
Figura 20A	Malta en proceso de hidrólisis alcalina	43
Figura 20B	Lavado de la malta después del proceso de hidrólisis alcalina	43
Figura 21	Hidrólisis enzimática de las muestras usando una relación 2:100 y 5:100, empleando un volumen de 150 μ L de celulasas de <i>Aspergillus sp</i>	44
Figura 22	Determinación de glúcidos reductores (glucosa) por medio del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	45
Figura 23A	Filtrado de las muestras después de la hidrólisis enzimática	45
Figura 23B	Sobrenadante de la muestra después de la hidrólisis enzimática (celulasas)	45
Figura 24	Matraz con medio MRS y bacteria <i>Lactobacillus casei sp</i>	46
Figura 25	Tubos inoculados en proceso de biodegradación y transformación bioquímica sin movimiento a 37°C durante 48 horas	47
Figura 26A	Serie de diluciones para la determinación de microorganismos viables	47
Figura 26B	Caja de Petri con colonias para determinar el inóculo de bacterias viables adicionadas a cada tubo de ensaye	47
Figura 27A	Malta sometida a hidrólisis ácida	51
Figura 27B	Malta sometida a hidrólisis alcalina	51
Figura 28A*	Malta sin ningún tratamiento	52
Figura 28B*	Gránulo de almidón presente en malta sin tratamiento	52
Figura 28C*	Malta húmeda después del tratamiento con H ₂ SO ₄ 1%	52
Figura 28D*	Malta húmeda después del tratamiento con NaOH 1%	52
Figura 29A	Malta seca después de hidrólisis ácida	55

Figura	Nombre	Página
Figura 29B	Malta seca después de hidrólisis alcalina con tratamiento NO DRÁSTICO	55
Figura 29C	Malta seca después de hidrólisis alcalina con tratamiento DRÁSTICO	55

*Estas imágenes fueron vista al microscopio óptico de campo claro con el objetivo 40X

IV. GLOSARIO DE TÉRMINOS

TÉRMINO	SIGNIFICADO
Ácido láctico	Ácido orgánico, líquido, incoloro, soluble en éter, miscible con agua y alcohol, su fórmula condensada es $C_3H_6O_3$, punto de fusión $17^\circ C$, punto de ebullición $124^\circ C$. Producto de un proceso de biodegradación y/o transformación bioquímica o síntesis química
Ácido poliláctico	Polímeros de ácido láctico
Bacterias ácido lácticas	Grupo de microorganismos que está conformado por diferentes géneros con características morfológicas y metabólicas en común producción de sustancias antibacterianas como diacetilo y ácidos orgánicos siendo el ácido láctico el principal
Cariópside	Fruto seco e indehiscente a cuya única semilla está íntimamente adherido el pericarpio
Cebada	Es un cereal (<i>Hordeum vulgare</i> L.), planta monocotiledónea, miembro de la familia de las gramínea
Celulosa	Polímero de D-glucosa unida por los enlaces glucosídicos β -1,4; formando estructuras largas de cadenas lineales
Cerveza	Bebida alcohólica no destilada producto de una degradación y transformación bioquímica realizada por levaduras del género <i>Saccharomyces</i>
Cuerpo de cerveza	Consistencia, viscosidad, densidad de la cerveza, que se produce por la cantidad de proteínas, dextrinas (glúcidos no biodegradables, glucanos y CO_2 provocando una sensación en el paladar
Glúcidos	Hidratos de carbonos; sustancia orgánica formada por carbono, hidrógeno y oxígeno (aldehídos y cetonas con múltiples grupos hidroxilos)
Hidrólisis	Transformación que las moléculas de gran tamaño son transformadas en productos más sencillos y fácilmente degradables, esto es producto de romper los enlaces con moléculas de agua
Hemicelulosa	Polímero complejo de heteropolisacárido formado principalmente por pentosas, unidos por enlaces glucosídicos β -(1,4) o β -(1,3)
Enzima	Son proteína que cataliza (Biocatalizadores) específicamente una reacción bioquímica del metabolismo
Estratos	Cada una de las capas de un tejido orgánico que se sobreponen a otras o se extienden por debajo de ella
Isómeros	Compuestos que tienen la misma composición atómica pero difieren en la estructura de la fórmula y por lo tanto poseen diferentes propiedades

TÉRMINO	SIGNIFICADO
Lemma	Cubierta floral o hoja que nace del pedúnculo (en la parte inferior) de las flores en las gramíneas
Levadura	Hongo unicelular de forma ovoide, que se reproduce por gemación o división, forma cadena y produce enzimas capaces de descomponer diversos cuerpos orgánicos, principalmente los glúcidos, en otros más sencillos
Lignina	Polímero amorfo, tridimensional formado por compuestos aromáticos
Lignocelulosa	Estructura de la pared celular de las plantas, compuesto de celulosa, hemicelulosa y lignina
Malta	Granos de cebada germinada bajo condiciones controladas seguidos de un secado lento y cuidadoso, con el objetivo de preservar la máxima actividad enzimática
Mosto	Líquido dulce que se obtiene del proceso de maceración, donde se lleva a cabo la hidrólisis del almidón por enzimas
Oragnoslov	Proceso químico en el que se usan solventes orgánicos, para producir pastas lignocelulósicas
Ozonólisis	Proceso que consiste en la ruptura oxidativa de los enlaces para producir grupos carbonilos
Pálea	Cubierta floral o hoja que nace del pedúnculo (en la parte superior) de las flores en las gramíneas
pH	Es una medida de la concentración de ión hidronio en solución, se expresa $\text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+]$
Residuo cervecero	Fracción sólida (residuo lignocelulósico) que se obtiene después de realizar la filtración del mosto, compuesto principalmente por granos macerados de malta de cebada con o sin adjuntos

V. ABREVIATURAS, SIGLAS Y UNIDADES

Abreviatura /Siglas	Significado
AOAC	(Association of Official Analytical Chemists) Siglas en inglés de la Asociación de Químicos Analíticos Estadounidenses quienes desarrollaron los Métodos Oficiales que llevan su nombre
ANDEVA (ANOVA)	Análisis de varianza (<i>Analysis of variance</i> , por sus siglas en inglés)
BAL	Bacterias ácido lácticas
CLAR (HPLC)	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , HPLC, por sus siglas en inglés)
FDA	(<i>Food and Drugs Administration</i>) Siglas en inglés de la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FND	Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural, Forestal y Pesquero
GI	Grados de libertad (análisis estadísticos)
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> Reconocimiento que se le da a una sustancia al ser segura
HMF	Hidroximetilfurfural Producto de formación de la degradación de glúcidos

Abreviatura /Siglas	Significado
L(-)	Estructura molecular que gira hacia la izquierda (enantiómero levorrotatorio)
D(+)	Estructura molecular que gira hacia la derecha (enantiómero dextrorrotatorio)
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SE	Secretaría de Economía
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
UFC	Unidades formadoras de colonias
rpm	Revoluciones por minuto

UNIDADES	
°C	Grado Celsius
g	Unidad de masa en gramos
mg	Unidad de masa en miligramos
mL	Unidad de volumen en mililitros
µL	Unidad de volumen en microlitros
µm	Unidad de volumen en micrómetros

Nota:

Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

VI. RESUMEN

La producción de cerveza indudablemente representa una de las industrias alimentarias más grandes y rentables a nivel mundial. La alta demanda por sus consumidores ha logrado que sea una de las bebidas alcohólicas más consumidas. Sin embargo, este crecimiento acelerado ha llevado un incremento en la generación de residuos y, por consiguiente, un creciente aumento de residuos contaminantes, ya que entre los principales residuos de esta industria se encuentra el residuo cervecero el cual representa el 85% del subproducto total generado. Este residuo es rico en proteínas, hidratos de carbono, fibra, vitaminas y minerales y es utilizado generalmente para la producción de alimento para ganado. Por ello, la presente investigación presenta una alternativa que se le puede dar a este residuo de malta de cebada al utilizarla como materia prima para la producción de ácido láctico, contribuyendo a la preservación del ambiente. Para la obtención de dicho ácido se planteó el realizar tanto hidrólisis químicas como enzimáticas a partir del bagazo de cebada obtenido de la práctica de elaboración de cerveza que se lleva a cabo en la Planta Piloto del Laboratorio de Ingeniería Química de la UNAM. Las hidrólisis químicas se llevaron a cabo con diluciones de un ácido inorgánico e hidróxido de sodio, las muestras de residuo de malta empleadas fueron nombradas con base a las características de estos tratamientos, muestras con tratamiento NO DRÁSTICO (H_2SO_4 1%v/v y NaOH 1% m/v), muestras con tratamiento DRÁSTICO (H_2SO_4 2% v/v y NaOH 4% m/v) y muestras SIN TRATAMIENTO. En las hidrólisis enzimáticas se usaron las enzimas celulasas obtenidas de *Aspegillus sp* en solución acuosa y fueron empleadas a tres diferentes volúmenes: 150, 300 y 450 μL . Entre los resultados obtenidos se tiene que la mayor cantidad de glucosa cuantificada resultó de una muestra de malta SIN TRATAMIENTO, relación 2:100 y con 450 μL de enzima, ya que en el proceso de hidrólisis enzimática se obtuvo un valor de 130.928 mg de glucosa/g de malta inicial. La mayor cantidad de ácido láctico cuantificado fue la obtenida de la muestra SIN TRATAMIENTO, relación 2:100 con 150 μL de enzima. El resultado de la obtención fue de 163.417 mg de ácido láctico/g malta inicial. De las muestras que fueron sometidas al procesos de hidrólisis química (ácido-alkalina);

la muestra del tratamiento NO DRÁSTICO relación 2:100 con 300 μ L de enzima, fue la que presentó una mayor cantidad de glucosa (4.210 mg de glucosa/g de malta inicial) con respecto de las demás y también presentó el valor más alto en la cuantificación de ácido láctico (8.745 mg/g de malta inicial). Se observó que la cantidad de glúcidos reductores (glucosa) delimita en cierta medida la producción de ácido láctico, pues la muestra procesada con el tratamiento NO DRÁSTICO, relación 2:100 y con 300 μ L de enzima, fue la muestra que presentó la mayor cantidad de glúcidos reductores y de ácido láctico. De manera similar está la tendencia que se presenta en las muestras SIN TRATAMIENTO. Comparando las tres muestras de tratamiento NO DRÁSTICO, DRÁSTICO Y SIN TRATAMIENTO en la cuantificación de glúcidos reductores (glucosa), la última presentó una diferencia estadística significativa con respecto de las otras dos ya que estas muestras al no ser sometidas a un pre-tratamiento químico no se eliminaron los gránulos de almidón que no fueron hidrolizados enzimáticamente en el proceso de maceración. Por tanto, se sugiere seguir con la experimentación usando una bacteria homofermentativa lo cual hará que la obtención de ácido láctico sea el principal o el único producto obtenido, además de buscar alternativas para obtener materia prima libre de gránulos de almidón pues la presencia de éstos fue un obstáculo para esta investigación al comparar la eficacia de los pre-tratamientos químicos que se realizaron al residuo de malta de cebada con aquellas muestras sin tratamiento. Esto permitirá darle un valor aún mayor a este residuo lignocelulósico pues se podrían obtener otros subproductos además del ácido láctico, ya que el almidón residual podría ser el sustrato para una biodegradación y transformación bioquímica nuevamente y así dejar disponible las estructuras de la cáscara para realizar los tratamientos de las hidrólisis químicas y enzimáticas que se proponen en la literatura y en esta investigación para la obtención de un producto terciario.

Palabras clave: Glucosa, ácido láctico, cebada -cereal-, industria cervecera, residuo de malta y ácido láctico.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática

Los residuos agroindustriales pueden convertirse en subproductos con valor económico y esto los convierte en un material potencialmente reusable ¿La razón de su uso? La producción de los residuos industriales y la reducción de su impacto al liberarlos al ambiente a través de su aprovechamiento les otorga un valor agregado además del producto final para el cual fueron empleados inicialmente. La producción de cerveza genera residuos secundarios que son usados en la producción de alimento para ganado ya que es rico en proteínas y fibra. Sin embargo, el residuo de esta agroindustria puede no limitarse solamente a ello sino también a la producción de ácido láctico, lo que representa una alternativa a la enorme cantidad de residuos que se producen en ella y que además se está convirtiendo en una industria que va en crecimiento. La industria cervecera constituye una de las agroindustrias más grandes y rentables en el mundo. La alta demanda por sus consumidores ha logrado que su desarrollo industrial aumente y con ello la generación de desechos, especialmente el residuo de malta o residuo cervecero, que representa alrededor del 85% del subproducto total generado (Aliyu y Bala, 2011). En México, la industria cervecera es una de las principales fuentes de la economía nacional, nuestro país se constituye como un productor internacional, de acuerdo con la información emitida por la Secretaría de Economía (SE) en junio de 2015. México ocupaba el séptimo lugar de una lista de 125 países como productor de cerveza, el primer lugar como exportador y el número quince como importador. Durante el 2014, de acuerdo con esta instancia, las empresas cerveceras del país produjeron alrededor de 8,095,000,000 litros de cerveza equivalentes a 6.1% más que en el año 2013 (SE, 2015). Países líderes en la producción de cerveza como Brasil, Estados Unidos y China generan grandes cantidades, así como también de remanentes de malta tratada; aproximadamente 16.9 millones de toneladas de residuo de cereal por año (Rocha-dos-Santos-Mathias *et al.*, 2014).

Por la alta disponibilidad y las características de este residuo lignocelulósico, autores como Aliyu y Bala (2011) sostienen que existen otros posibles usos al

residuo de malta tratada además del alimento, en éstas, destaca la producción de ácido láctico, que es un producto altamente empleado en diversas industrias, de bajo precio pero de alto costo en su producción, ya que su obtención en forma biotecnológica usa diferentes sustratos (glúcidos) los cuales determinan el grado de pureza del ácido láctico y, en consecuencia, el costo económico.

1.2 Justificación

¿Por qué utilizar un residuo lignocelulósico? ¿Es posible producir ácido láctico? ¿Cuál sería el mejor proceso para conseguirlo, entonces? Utilizar un residuo lignocelulósico para producir ácido láctico se justifica porque en su composición consta de celulosa, hemicelulosa y almidón, los que al ser hidrolizados son fuentes de glucosa, un hidrato de carbono degradable por un gran número de microorganismos. Estos residuos son sustratos de alta disponibilidad y baratos y, en algunos casos como en el residuo de la cerveza, se presentan grandes cantidades de fuentes de nitrógeno y carbono. Este tipo de sustratos debe tener un pre-tratamiento siendo principalmente de hidrólisis. Estas hidrólisis pueden ser químicas y/o enzimáticas para disminuir la presencia de algunas estructuras o barreras como la lignina que limitan la disponibilidad de los glúcidos biodegradables y así aumentar su sacarificación, pudiendo ser empleados en procesos biotecnológicos como la fermentación (biodegradación y transformación bioquímica) para la obtención de un nuevo producto que, para el caso de esta investigación, es la obtención de ácido láctico.

El ácido láctico, es un ácido orgánico que se emplea principalmente en la industria de los alimentos y es clasificado como *GRAS (Generally Recognized As Safe*, por sus siglas en inglés) por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*Food and Drug Administration, FDA*, por sus siglas en inglés), usado como acidulante en sabores o como agente amortiguador o inhibidor de bacterias (FDA, 2015). También presenta la función de ajustar el pH en las aguas duras que se utilizan en la producción de cerveza; en la industria farmacéutica tiene un uso en cosméticos y en formulaciones tópicas, en lociones y en soluciones de diálisis. En los últimos años los estudios sobre este ácido se centran en analizar procesos

de obtención a través de materiales residuales y su posterior transformación en compuestos químicos que pueden ir más allá de la industria alimentaria. Al respecto, en recientes desarrollos industriales se ha observado que el ácido láctico puede ser usado en la industria de los plásticos y fibras, en solventes para formulaciones, en la limpieza y en la oxigenación de las industrias químicas (Datta y Henry, 2006; Ghaffar *et al.*, 2014; Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000; Sreenath *et al.*, 2001). La producción de ácido láctico se realiza en grandes plantas y en diferentes calidades, alrededor del 60% de la producción mundial puede adjudicársele a Estados Unidos, Japón y Brasil. El resto se produce en Europa (Holanda, Inglaterra, España) y en Asia (China) que han demostrado tener gran capacidad de fabricación (Herryman-Munilla y Blanco-Carracedo, 2005). Los microorganismos que se utilizan para la producción del ácido láctico son diversos y dependen de cada industria pero, a pesar de esta diversidad, es notable el uso del género *Lactobacillus* debido a que al utilizar una bacteria homofermentativa se produce principalmente ácido láctico, mientras que al utilizar una bacteria heterofermentativa se produce ácido láctico y subproductos en cantidades apreciables (Herryman y Blanco, 2005). Para esta investigación se trabajó con *Lactobacillus casei sp.* que fue proporcionado por el cepario de la Facultad de Química de la UNAM, ya que no es un bacteria tipificada y en la literatura para autores como Hafvendahl y Hahn-Hägerdal (2000), *Lactobacillus casei sp* es una bacteria heterofermentativa facultativa debido a que en la producción biotecnológica del ácido láctico puede usar hexosas o pentosas como sustrato.

1.3 Objetivos

Objetivo general

Obtener la mayor cantidad de glucosa y ácido láctico a partir de un cereal pretratado (malta) de la industria cervecera; empleando para ello diferentes condiciones de tratamientos hidrolíticos (ácido-básico) y enzimáticos (celulasas de *Aspergillus sp.*) que permitan una mayor obtención de glúcidos reductores.

Objetivos particulares

- ❖ Comparar las mejores condiciones de tratamiento de hidrólisis (ácida-básica) y enzimática empleando enzimas celulasas para obtener la mayor cantidad de glúcidos reductores que serán utilizados para la biodegradación y transformación bioquímica.
- ❖ Comprobar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos hidrolíticos implementados (ácido-base), la relación masa-volumen (malta:solución amortiguadora) y el volumen de enzima (celulasa de *Aspergillus sp.*), empleando para ello un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%, para el parámetro evaluado de hidratos de carbono reductores.
- ❖ Relacionar la información de hidratos de carbono reductores con la producción de ácido láctico por medio de una biodegradación y transformación bioquímica usando *Lactobacillus casei sp.*

CAPÍTULO 2. RESIDUO CERVECERO UN MEDIO PARA PRODUCIR ÁCIDO LÁCTICO

El hacer uso de cereales germinados y/o malteados para la producción de bebidas y alimentos fermentados se ha practicado tradicionalmente desde hace varios cientos de años y en esa práctica la cebada ha resultado ser el cereal más empleado ya que contiene una gran actividad enzimática o diastásica por ello a continuación se realizará una breve descripción de este grano (Serna-Saldívar, 1996).

2.1 Grano de cebada

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es una planta monocotiledónea, miembro de la familia de las gramíneas, a nivel mundial es uno de los cereales más importantes después del trigo, el maíz y el arroz, la cebada se usa principalmente para la alimentación de animales o producción de cerveza (Mussatto *et al.*, 2006). Es un cereal altamente adaptado a diferentes climas que van desde los subtropicales a los de frío extremo (Gupta *et al.*, 2010; Salgado-Albarrán, 2014).

En México, los estados con mayor producción de cebada son Hidalgo, Tlaxcala y Puebla (Contreras-López *et al.*, 2008; FND, 2014) y que son los mismos que proveen en cierto porcentaje a las cerveceras mexicanas, ya que nuestro país también es un importador de cebada y malta.

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) puede categorizarse en tres subespecies (Ramos-Cuevas, 2006):

- a) *Hordeum hexastichon* (cebadas *hexásticas*) de 6 carreras de otoño o primavera con flores laterales infértiles.
- b) *Hordeum distichum* (cebada *dísticas*) de dos carreras de otoño o primavera con flores laterales infértiles.
- c) *Hordeum spontaneum* (*irregulare*), cebadas en general silvestres.

La cebada al igual que el arroz y la avena es recolectada con la cáscara intacta. La cáscara es la capa que protege al grano, principalmente formada por la lemma y la palea. Retirar la cáscara es un proceso difícil pues está fuertemente unida al pericarpio. Sin embargo, la cáscara de este grano es eliminada por medio de la trilla o molienda; dejando así disponible la cariósida (**Figura 1A y 1B**). La

semilla o grano está compuesta por el pericarpio, la testa, el epidermis y un embrión (Delcuor y Hoseneý, 2010).

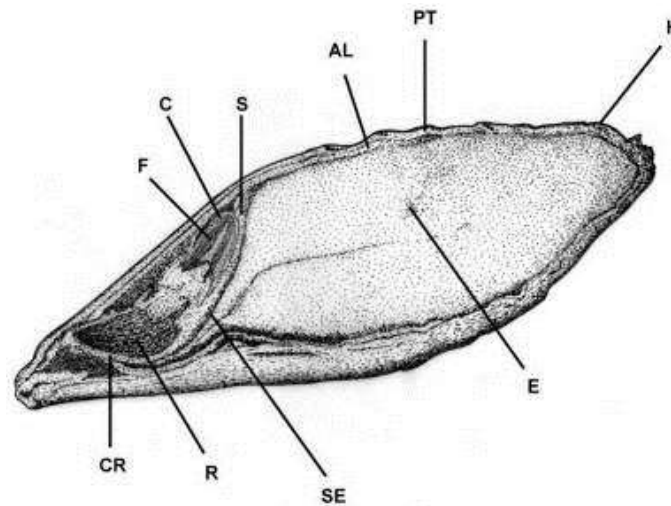


Figura 1A: Representación general de la estructura longitudinal del grano de cebada (Adaptado de Delcuor y Hoseneý, 2010)

Embrión: Coleoptilo (C), radícula (F), coleorriza (CR), raíz (R), escutelo (S), escutelo epitelial (SE)

Estructuras ajenas al embrión: Cáscara (H), pericarpio-testa (PT), capa de aleurona (AL), endospermo amiláceo (E)

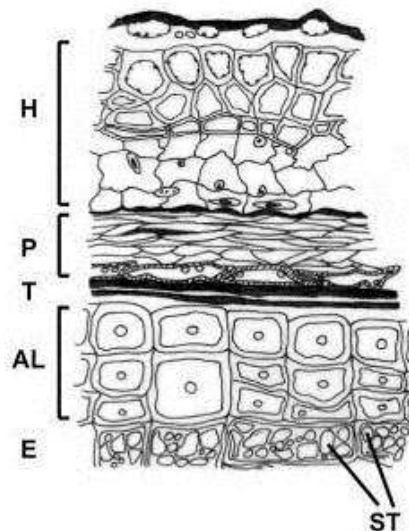


Figura 1B: Estructura de las capas externas del grano de cebada (Adaptado de Delcuor y Hoseneý, 2010)

Cáscara (H), pericarpio (P), testa (T), capa de aleurona (AL), endospermo amiláceo (E) y gránulos de almidón (ST)

De acuerdo con Serna-Saldívar (1996) “el grano de la cebada es rico en almidón y proteínas. Su estructura puede dividirse en tres partes principales:

- ✓ **El germen o embrión:** Se encuentra adherido al endospermo y es el almacén de nutrientes. Se caracteriza por su alto contenido de lípidos, proteínas, glúcidos solubles y cenizas, además de que genera la mayoría de las enzimas que dan inicio al proceso de germinación.

- ✓ **El endospermo:**
 - Endospermo periférico se caracteriza por su alto valor proteínico y por contener unidades de almidón pequeñas angulares y compactas.
 - Endospermo vítreo, las células maduras del endospermo maduro contiene básicamente cuatro estructuras: paredes celulares, gránulos de almidón, matriz y cuerpos proteínicos, las paredes celulares son las que encierran a los demás componentes así presenta alto contenido de fibra insoluble (celulosa y β -glucanos) y soluble (pentonasas). Los gránulos de almidón ocupan la mayoría del espacio celular y están rodeados y separados por la matriz proteínica que sirve como pegamento para mantener la estructura y no permitir espacios de aire que produzcan formas angulares (poligonales) y conseguir una estructura de apariencia vítrea o translúcida.
 - Endospermo almidonoso se encuentra cubierto por el endospermo vítreo en la parte céntrica del grano, pero las unidades de almidón son más grandes y menos angulares, no están fuertemente adheridos a la matriz proteínica, por lo que origina minúsculos espacios de aire y una apariencia almidonosa.
 - La aleurona no forma parte del endospermo, pues posee características propias ya que tiene de dos a cuatro estratos ó capas de células (**Figura 2**), la composición es diferente al resto del endospermo ya que presenta un alto contenido proteínico, además, juega un papel importante durante el proceso de germinación pues sintetiza las

enzimas indispensables para lograr los compuestos presentes en el endospermo.

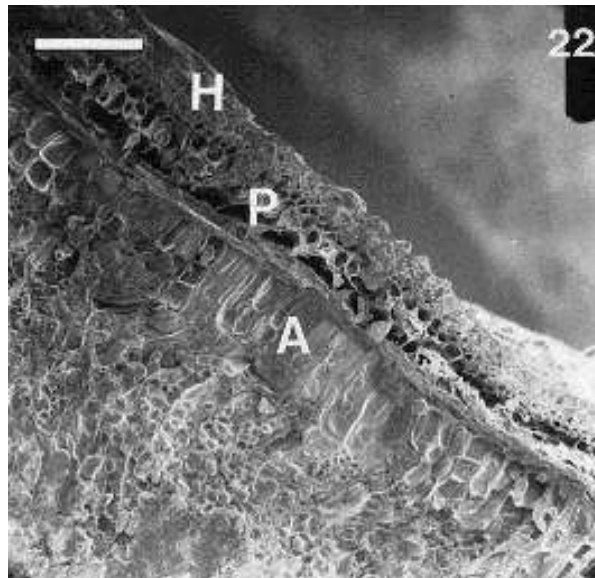


Figura 2: Imagen de microscopía electrónica a las secciones transversales de un grano de cebada con barrido de 100 μm (Adaptado de Delcuor y Hosenev, 2010)
Cáscara (H), pericarpio (P) y capas de aleurona (A)

✓ **El pericarpio:** Encierra a la semilla y está compuesto por varias capas de células, esta estructura se divide en epicarpio, mesocarpio y endocarpio:

- Epicarpio o epidermis es la capa más externa del pericarpio (células alargadas, rectangulares y con paredes celulares angostas)
- Mesocarpio formado por células transversales
- Endocarpio se subdivide en células intermedias, cruzadas y tubulares

Las funciones primordiales del pericarpio son la de proteger al grano contra agentes bióticos externos (insectos, microorganismos), impedir la pérdida de humedad, conducir y distribuir el agua y otros nutrientes al grano durante la germinación” (Serna-Saldívar, 1996).

✓ **“La testa** es otra parte de la estructura del grano que lo envuelve o protege se encuentra firmemente adherida a la parte ventral de las células tubulares y consiste en uno o dos estratos de células.

El uso del grano de cebada para la elaboración de cerveza se debe a la actividad enzimática de la malta que es determinada por la calidad del grano y por las condiciones de malteado, ya que la cebada posee una capa de aleurona conformada por múltiples estratos que rodea el resto del endospermo donde se generan gran parte de las enzimas amilolíticas que migran paulatinamente de la periferia hacia el centro de la cariósida, ocasionando a su vez el desdoblamiento gradual del almidón, de la proteína y de la fibra” (Serna-Saldívar, 1996).

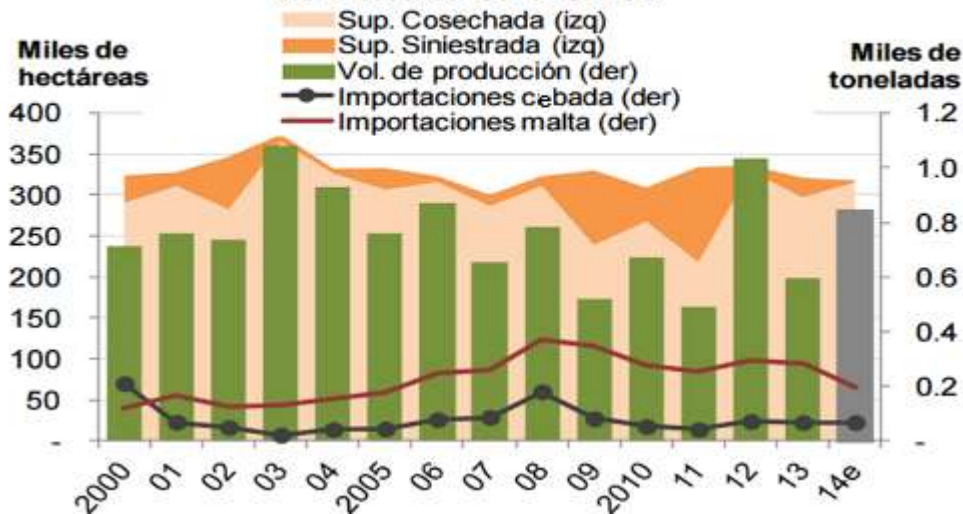
Existen cebadas malteras que proviene de variedades de dos a seis hileras. Una de las principales características que diferencia a las cebadas malteras de las forrajeras es el contenido proteínico y la actividad enzimática una vez germinadas. Es importante recalcar que las variedades malteras presentan un contenido proteínico menor, lo que se traduce en una mayor cantidad de almidón o glúcidos biodegradables en el grano (Bazán-Hernández, 2015).

2.1.1 Producción de cebada en México

En México la mayor producción de la cebada es de periodo temporal, es decir corresponde a la temporada alta de lluvia. El anuario Estadístico de la Producción Agrícola del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA, (SIAP, 2016); informa que la producción de cebada en el año 2014 fue de 845,706.95 toneladas mientras que la producción del 2013 fue de 594,000.00 toneladas, la mayor producción fue en el centro del país siendo los estados de mayor producción: Hidalgo, Tlaxcala, Guanajuato, Estado de México y Puebla (FND, 2014).

El hecho de que la producción de cebada en el país dependiera de las condiciones climatológicas que se presentan en el año es determinante, pues a pesar de que en nuestro país existen cerveceras importantes, México es un importador de cebada al igual que de malta (**Gráfica 1**) dado que no se logra satisfacer la demanda de este cereal, pues el uso de éste en algunas industrias como la cervecería es sumamente alto.

Superficie, Volumen de Producción e Importaciones de Cebada en México



Gráfica 1. Cultivo de cebada e importación de malta (FND, 2014)

Es necesario recalcar que si bien la cebada es usada para la producción de malta como materia prima para la industria cervecera y de whiskey, su uso principal es el de alimento para animales. Su uso en la dieta humana es limitada aunque recientemente se ha observado un aumento en su consumo debido al alto contenido de fibra (Patrick-Fox, 2010).

2.2 Cerveza

La cerveza es una bebida de sabor amargo de cierto grado alcohólico no destilada, resultado de una fermentación (producción de etanol) del mosto con levaduras seleccionadas; el mosto generalmente es procedente de la malta de cebada con o sin la presencia de otros cereales no malteados mezclado con agua; la mezcla de estos productos dan como resultado una composición donde se produce una conversión enzimática para posteriormente adicionar lúpulo y/o derivados para finalmente someterlos a un proceso de cocción. Al ser la cerveza una de las bebidas alcohólicas más consumidas en el mundo, se le reconoce también como una de las agroindustrias más rentables; es decir, la industria cervecera, ha demostrado ser un mercado a prueba de crisis donde la innovación, la creatividad y la competencia son los medios para crecer y sobrevivir, sin

embargo, este crecimiento acelerado lleva consigo el incremento también de residuos y una contaminación del medio ambiente (Callejo-González, 2002; Sánchez-Miguel, 2011).

2.2.1 Elaboración de cerveza

La producción industrial masiva de la cerveza obedece a la demanda de sus consumidores, por lo que se han creado distintas variedades de la bebida, siendo los tipos básicos de cerveza: **Lager** (fermentables con levaduras de fondo) y **Ale** (fermentadas con levaduras de superficie), las cuales presentan diferentes características. Esto obedece a que en la actualidad beber cerveza se ha convertido en un mercado rentable y en crecimiento. La clasificación de la cerveza se da en torno al tipo de fermentación que tenga; sin embargo, en México la Asociación de Cerveceros de México (2016) hace la clasificación con base en su contenido, su producción y su filosofía, las que son:

- a. Cerveza industrial
- b. Cerveza casera
- c. Cerveza artesanal

Más allá de los tipos y estilos de cerveza, esta bebida tiene como ingredientes base los siguientes: agua, malta, lúpulo y levadura y/o la presencia de algunos adjuntos; estos determinan la producción y calidad del producto en la industria.

Los ingredientes principales para la elaboración de cerveza son:

- ✓ **Agua:** puede representar el 90% del contenido de una cerveza, debe de cumplir con las legislaciones vigentes sobre los criterios básicos para el consumo humano, siendo los establecidos en México en la NOM-127-SSA1-1994 (DOF, 1994); además de que debe de tener una menor concentración de metales pesados, ya que esto afecta a la calidad del producto (Ramos-Cuevas, 2006).
- ✓ **Lúpulo** (*Humulus lupulus*) planta trepadora de la familia de las *cannabaceas*, da a la cerveza el sabor amargo, agradable y fino que la caracteriza (Ramos-Cuevas, 2006).

- ✓ **Levadura:** organismos unicelulares que se reproducen en la elaboración de cerveza, haciendo uso de los hidratos de carbono presentes para la producción de alcohol etílico. Se hace uso de dos especies *Saccharomyces*; la especie *Saccharomyces cerevisiae* que son levaduras flotantes y que son empleadas para la producción de cerveza tipo **Ale**, una cerveza de fermentación alta. La levadura *Saccharomices uvarum* es una levadura que se va al fondo durante la fermentación; es decir es una levadura que produce cerveza de fermentación baja (cervezas **Lager**) (Garduño-García *et al.*, 2014).
- ✓ **Malta:** es el producto final del proceso de malteo de los granos de cebada, dicho proceso consta de cuatro principales etapas con condiciones controladas con el fin de aumentar el contenido enzimático en el grano (Ramos-Cuevas, 2006).

En el malteo se involucran las especificaciones de la materia prima y de las condiciones de proceso. Por ejemplo, están el tipo de grano de cebada a usar y sus características, la temperatura y porcentaje de humedad a la que debe ser sometida para producir cambios físicos y bioquímicos y que deben ser detenidos al ser secados bajo condiciones específicas. Autores como Gupta *et al.* (2010) y Patrick-Fox (2010) describen el objetivo de realizar el malteo y las características que la materia prima debe poseer. Para el malteo se usan granos de cebada de 2 y 6 carreras (hileras) en buenas condiciones que presenten un color amarillo claro o blanquecino. Cuando los granos presentan una decoloración se consideran de mala calidad y al maltearlos se obtendrá una pobre germinación, además de la producción de sabores indeseables que afectan la calidad de la cerveza. Otro factor importante es la dureza del grano. La estructura e interacciones determinan la permeabilidad durante el proceso de remojo, por lo que es importante usar granos suaves, ya que el propósito principal del malteo es lograr un incremento en la actividad enzimática. Por estas razones es preferible usar granos de cebada con cáscara para lograr una degradación de la pared celular, proteínas y almidón y modificar así sus enlaces para aumentar la cantidad de sustratos de glúcidos simples y proteína soluble, pues estos sustratos afectan la calidad del perfil final de la cerveza ya que se ven involucrados en el desarrollo del color y sabor

característicos de esta bebida. Además, la presencia de la cáscara ayuda en el proceso de filtrado después de la maceración. Es importante destacar que el proceso de malteo (**Figura 3**) varía dependiendo del tipo de malta y/o cerveza a producir como se puede apreciar a continuación.

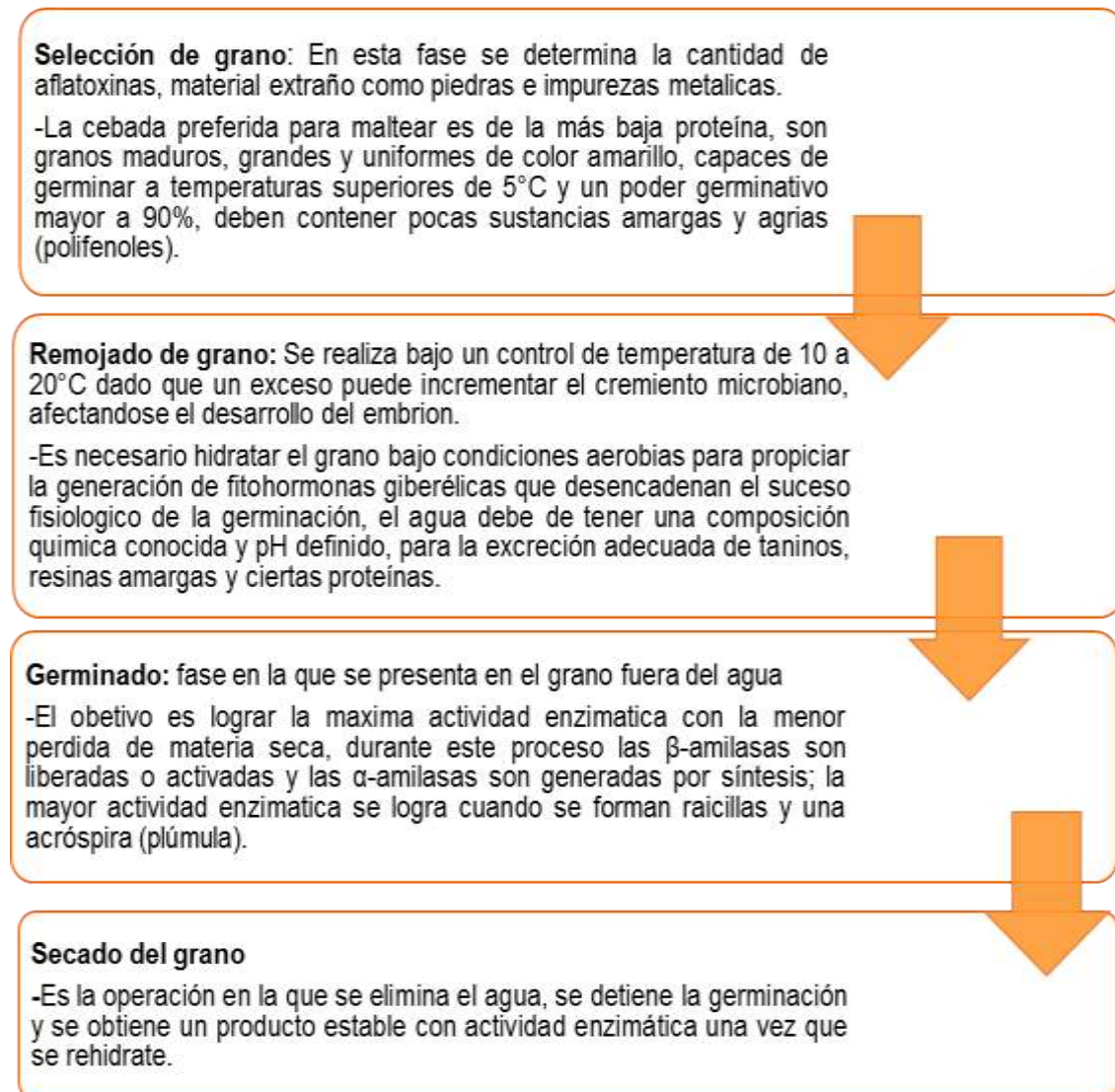


Figura 3. Secuencia del procedimiento del malteo de la cebada (Adaptado de Serna-Saldívar, 1996 y Ramos-Cuevas, 2006)

La producción de diferentes tipos de malta, permite elaborar cervezas que presenten características específicas de coloración, sabor, aroma pero sobre todo cuerpo, pues la mezcla de diferentes maltas y el tipo de levadura a usar en la

fermentación determina el tipo de cerveza que es producida y cuáles serán las particularidades que la definan.

En la **Figura 4** se muestra la mezcla de cuatro diferentes maltas para elaborar una cerveza artesanal venezolana Stout Garacas (Guinness de Caracas, 2016).



Figura 4. Mezcla de maltas: base pálida, chocolate, tostada y *black patent*
CERVEZARTE Sueña Global-Bebe Local

<http://www.cervezarte.com/cebada-malteada-para-la-cerveza-artesanal-venezolana/>
(17/09/2016)

La principal materia prima implicada en el proceso cervecero es la malta y/o adjuntos. Como adjuntos se les denomina a aquellos materiales amiláceos que son cereales menos caros que la malta sin maltear. Estos adjuntos suelen ser maíz o arroz. Por ejemplo, en países asiáticos se usa el arroz, en África el sorgo, en España el maíz es convertido en sémola y también es común el uso de jarabes de glucosa (Callejo-González, 2002).

En México, la cerveza producida industrialmente es la que hace uso de adjuntos como arroz y maíz pues son los más comunes y además son baratos. Estas materias primas proveen almidón o glúcidos biodegradables para ser hidrolizados por las enzimas presentes en la etapa de maceración, éstos al ser adicionados al proceso de cerveza deben de cumplir con algunas especificaciones pues no

deben proveer enzimas y poco o nada de nitrógeno soluble y compuestos que proporcionen sabor al producto final (Serna-Saldívar, 1996).

Al igual que otras bebidas alcohólicas el proceso de elaboración de la cerveza consta de diversas etapas fundamentales (**Figura 5**) en las que va adquiriendo las cualidades específicas que la caracterizan.

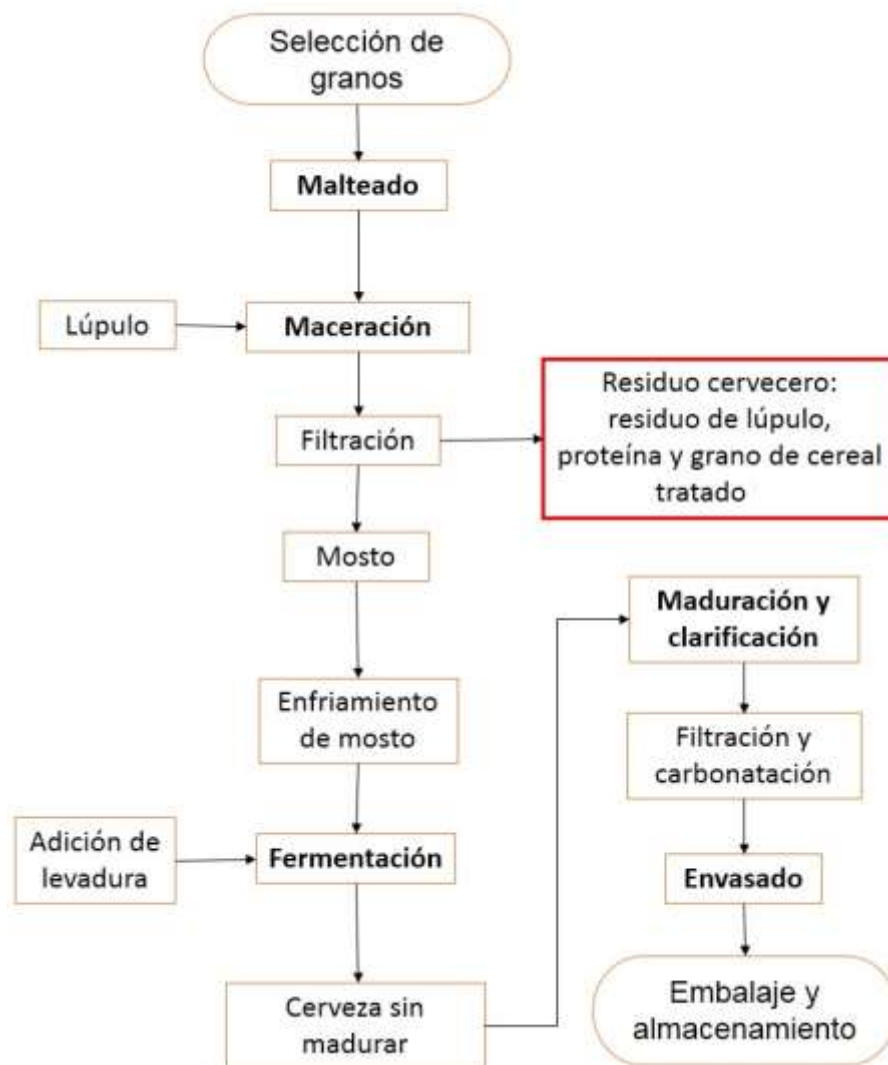


Figura 5: Secuencia del proceso de la producción de cerveza (Adaptado de Serna-Saldívar, 1996 y Ramos-Cuevas, 2006)

Siguiendo la secuencia mostrada en la **Figura 5**, después del malteo del grano de cebada, la maceración es el otro proceso importante; pues es donde se lleva a

cabo la obtención de glúcidos biodegradables y no biodegradables a condiciones específicas de temperatura con el objetivo de promover la actividad enzimática.³

➤ **Maceración**

El proceso de maceración es en el que la malta molida o triturada y/o sémola se mezcla con agua agitándose lentamente, para ello es necesario considerar las condiciones del proceso, el agua de maceración después de mezclarse debe poseer un pH de 5.4 siendo este el óptimo para la actividad amilolítica (Ramos-Cuevas, 2010).

Además, se realizará un incremento de temperatura de manera gradual (de 37 a 78°C) que se da con la finalidad de promover la hidrólisis enzimática, debido a que las enzimas β -amilasas tienen una termo-estabilidad que decrece rápidamente a 55°C, pero se ha observado que permanecen activas hasta una temperatura de 60°C. La α -amilasa tiene una actividad óptima alrededor de 65°C presentando también actividad a 75°C (Patrick-Fox, 2010) y las enzimas proteolíticas tienen temperaturas óptimas de 50 a 55°C (Ramos-Cuevas, 2006). El incremento de la temperatura poco a poco es para promover la hidrólisis enzimática que se realiza sobre los componentes de la malta como son el almidón y las proteínas ya que durante este proceso el almidón se convierte en glúcidos biodegradables principalmente maltosa y maltotriosa. También se obtienen glúcidos no biodegradables como las dextrinas que son necesarias para proporcionar características de cuerpo a la cerveza. De este proceso se obtienen dos fases, el líquido dulce denominado mosto que será utilizado como medio para llevar a cabo la biodegradación y transformación bioquímica de la glucosa para que se produzca la cerveza y la parte insoluble que es el residuo cervecero o residuo de malta. La denominación de este residuo es importante, ya que puede consistir solamente de residuo de malta de cebada o malta con adjuntos esto depende del tipo de cerveza que esté siendo producida (Mussatto *et al.*, 2006).

³ Esta investigación se centra en describir solamente aquellas etapas de la elaboración de cerveza en la que se involucre el grano de cebada sin y con proceso de malteado, pues la materia prima en este desarrollo experimental es el residuo de malta o denominado también residuo cervecero

2.3 Residuo de malta o grano tratado (cervecero)

En los últimos años, y ante la creciente demanda de la sociedad y grupos ecologistas, las industrias en general han mostrado una preocupación y/o se ven comprometidas a atender la contaminación que sus procesos industriales provocan en el ambiente. La industria cervecera no ha sido la excepción, ya que en ella se producen desechos de residuos de malta o grano tratado, residuos de líquidos turbios y algunos productos sólidos como la tierras de diatomeas que sirven para clarificar y purificar el mosto (Rocha-dos-Santos-Mathias *et al.*, 2014). Sin embargo, algunos de estos residuos pueden ser reutilizados o tratados de manera diferente para la obtención de un producto secundario y al ser residuo de malta el principal desecho de esta industria, es necesario reutilizarlo.

El residuo de malta como se ha mencionado es un desecho de material lignocelulósico, que representa alrededor del 85% del subproducto total generado, por lo que hace necesario para esta industria buscar nuevas o más alternativas en su aprovechamiento (Aliyu y Bala, 2011).

A pesar de que este residuo es utilizado generalmente en la industria alimentaria (alimento para ganado) grandes cantidades son liberadas al medio ambiente y dado al valor significativo de sus nutrientes y a su alta concentración de compuestos orgánicos, el requerimiento de oxígeno para la degradación de estos residuos es de aproximadamente del 30 al 60% (Aliyu y Bala, 2011; Rocha-dos-Santos-Mathias *et al.*, 2014). Por lo que, al ser aprovechado para la producción de ácido láctico resulta ser una buena alternativa, ya que el uso de éste no se limita a una sola rama del sector de la industria química.

2.3.1 Características del residuo cervecero

El residuo sólido que se obtiene de la filtración del macerado consta principalmente de la cubierta del grano (cáscara, pericarpio y testa) constituida principalmente por celulosa, lignina, proteínas y la presencia de algunos lípidos y minerales. Este residuo puede variar, dependiendo de las condiciones de malteado y de maceración, ya que pueden quedar residuos del endospermo

amiláceo adheridos a las paredes de la aleurona (Aliyu y Bala, 2011; Mussatto *et al.*, 2006).

Recientemente este tipo de residuos lignocelulósicos ha ganado interés por parte de investigadores, ya que dicho residuo puede tener un uso secundario, principalmente un nuevo proceso de biodegradación y transformación bioquímica pues éste es altamente nutritivo, barato y de gran disponibilidad. La composición química de este residuo puede variar debido a que puede ser solamente malta de cebada o la mezcla de ésta con algún(os) adjunto(s). Para esta investigación se retomó parcialmente la información presentada por Mussatto *et al.*, (2006), pues solamente se consideró aquella que exhibía los resultados del análisis bromatológico exclusivo del residuo de malta de cebada (**Tabla 1**).

La razón es que en el desarrollo de este proyecto se utilizó como materia prima el residuo de cebada malteada sin el acompañamiento de los adjuntos, ya que el proceso del que provinieron los residuos se llevó a cabo en la planta piloto del Laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad de Química de la UNAM en Ciudad Universitaria, Ciudad de México, la cual realiza un proceso similar al de elaboración de cerveza artesanal en pequeñas plantas.

Tabla 1: Composición química de residuo de malta proveniente del proceso cervecero (Adaptado de Mussatto *et al.*, 2006)

Composición (Porcentaje en masa seca)	Grano tratado
Celulosa	16.8
Arabinosilanos	28.4
Lignina	27.8
Proteína	15.2
Lípidos	No determinado
Cenizas	4.6

2.3.2 Posibles aplicaciones del residuo de cerveza

Debido a la composición química que presenta este residuo se le puede dar otro uso y así minimizar el impacto de contaminación que representa en el ambiente, además que al reusar este desecho se puede beneficiar el proceso económico de la producción cervecera. Investigadores como Aliyu y Bala, (2011), Mussatto *et al.*

(2006) y Mussatto *et al.* (2007) mencionan diversos usos que se le puede dar al residuo cervecero los cuales se citan a continuación de manera muy resumida:

a) Como ingrediente alimenticio

➤ Para nutrición humana

Por el alto contenido de fibra del residuo de malta puede ser adicionado a panes, galletas, tortillas, pastas o como cereal. Su consumo puede aportar beneficios a la salud al disminuir el riesgo de padecer ciertas enfermedades como cáncer de colon, desórdenes gastrointestinales, constipación o diarrea y puede ayudar a los enfermos con problemas de diabetes y también a quienes sufren enfermedades cardiovasculares.

➤ Nutrición animal

Considerado éste como su uso preferencial en los animales debido al alto contenido de proteínas y fibra, este residuo es una buena fuente de alimento para rumiantes, además de que puede ser combinado con otras fuentes de nitrógeno como la urea que provee ciertos aminoácidos indispensables, promoviendo en los animales el incremento de producción de leche después del proceso de fertilidad, así también, se han realizado investigaciones sobre incluir un porcentaje de residuo de malta a la dieta de pescados, donde se observa que la combinación de salvado de arroz y 30% de residuo de malta (grano tratado) produce que el pescado adquiera una mayor masa, comparado con aquellos que solamente tuvieron una alimentación con salvado de arroz.

b) En la producción de energía

La producción de biogás puede realizarse por medio de una transformación bioquímica realizada en dos partes; la primera consta de una hidrólisis. Se lleva a cabo haciendo uso de tratamientos alcalinos. La segunda parte consta de una degradación metanogénica que involucra la presencia de microorganismos acidogénicos y metanogénicos para producir una mezcla de metano y bióxido de carbono 60 a 70%, además de que se produce un porcentaje pequeño de hidrógeno, nitrógeno y monóxido de carbono.

c) *Productos obtenidos de proceso biotecnológicos*

La riqueza de polisacáridos y proteínas que contiene el residuo cervecero lo convierte en un buen sustrato de alto valor biotecnológico.

- Crecimiento de microorganismos:

El contenido de glúcidos, proteínas y alta humedad hacen que este residuo sea particularmente susceptible al crecimiento microbiano, principalmente por aquellos microorganismos que tratan de crecer haciendo uso de fuentes de carbono.

- Producción de enzimas:

La composición del sustrato que contiene residuos digeribles y no digeribles hace del residuo cervecero un sustrato potencial para el crecimiento de microorganismos amilolíticos, los cuales pueden producir β -amilasas y amiloglucosidasas, xilanasas y α -L-arabinofuranosidasas.

- Producción de bioetanol:

Puede ser producido del almidón o de la biomasa lignocelulósica que se encuentran presentes en las capas del grano tratado, pero requiere de un proceso de hidrólisis enzimática para producir glúcidos biodegradables.

- Producción de ácido láctico:

Este producto se ve desde la perspectiva económica, ya que la producción de este ácido es muy caro, debido a que se hace uso de fuentes de carbono caras como la glucosa, la sacarosa y el almidón y, a pesar de que el precio del ácido láctico es barato, su producción no lo es. Sus materias primas son costosas lo que no es económicamente factible para la industria. Sin embargo, al representar hasta el 85% del total de la producción industrial, el residuo cervecero es una excelente fuente de producción de ácido láctico, por su alta disponibilidad y bajo costo, así como el bajo nivel de contaminantes (de acuerdo con la calidad) y su alta velocidad de biodegradación. Son estas razones las que provocan a partir del residuo gran rendimiento para la producción del ácido láctico (Mussatto *et al.*, 2006, 2008).

2.4 El ácido láctico

El ácido láctico es un ácido orgánico, descubierto por primera vez en 1780 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheel quien lo aisló de la leche. Posteriormente, Lavoisier denominó a este compuesto “acide lactique”. Por un largo tiempo este compuesto se consideró exclusivo componente de la leche, hasta que Pasteur descubrió el fenómeno de la degradación metabólica generada por la presencia de algún microorganismo (Abdel-Rahman *et al.*, 2013; Mussatto *et al.*, 2006). Este ácido puede ser producido a través de una biodegradación y transformación bioquímica o de una síntesis química. Se encuentra presente de manera natural en muchos alimentos como producto de una transformación bioquímica microbiana inducida (yogurt, fermentación en pan, leche cortada, etc.). En la industria tienen diferentes usos, principalmente en la alimentaria es usado como acidulante, agente amortiguador, conservador o inhibidor bacteriano. En la industria de farmacia y cosméticos es usado para ungüentos, lociones, soluciones salinas y, recientemente, presenta aplicaciones en la industria de polímeros en donde se ha mostrado su gran utilidad. El requerimiento a nivel mundial de ácido láctico es de alrededor de 130,000 a 150,000 toneladas por año (Datta y Henry, 2006; Ghaffar *et al.*, 2014) por lo que es necesario encontrar nuevas fuentes o procesos para su producción.

✓ El uso del ácido láctico en la industria petroquímica

El uso de polímeros en la industria petroquímica trajo grandes beneficios pero también produjo grandes daños al ecosistema en consecuencia del impacto ambiental de los plásticos el cual es cada vez mayor, por lo que es fundamental y primordial encontrar sustitutos, es decir, obtener polímeros biodegradables. La versatilidad de la molécula del ácido láctico ha permitido generar investigaciones sobre su uso en este campo, y entre estas destaca el uso de ácido poliláctico (*PLA*, en inglés) que es una cadena del ácido láctico. El *PLA* permite la producción de polímeros sintéticos totalmente degradables por lo que es uno de los más empleados (Herryman-Munilla y Blanco-Carracedo, 2005).

2.4.1 Descripción del ácido láctico

Como se ha mencionado anteriormente, el ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanoico o ácido 1-hidroxietanocarboxílico) es un ácido orgánico, líquido, incoloro, soluble en agua y en alcoholes e insoluble en éter de petróleo en estado sólido puro y es altamente higroscópico. A continuación en la **Tabla 2** se presentan las características fisicoquímicas de este ácido orgánico.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico (Adaptado de Serna-Cock y Rodríguez-de-Stouvenel, 2005; INR, 2013)

Fórmula	C ₃ H ₆ O ₃
Masa molecular	90.08
Índice de refracción	1.4424
Punto de fusión	L(+) y D(-): 52.8 a 54°C DL (según descomposición): 16.8 a 33°C
Punto de ebullición a 14 mmHg (concentrado)	124°C
Punto de fusión (concentrado)	17°C
Gravedad específica	1206
Viscosidad	3606 cal/g
Densidad a 20°C	1.21 g/mL
Constante dieléctrica	22

La estructura de la molécula del ácido láctico presenta un carbono asimétrico el cual le da las propiedades de isomería óptica: D(-) y L(+) ácido láctico (**Figura 6**), siendo la de isomería L(+) la que es metabolizada por el organismo humano. Debido a la versatilidad de este ácido en la industria, su producción es muy demandada, por lo que su producción se realiza por síntesis química o por medios biotecnológicos.

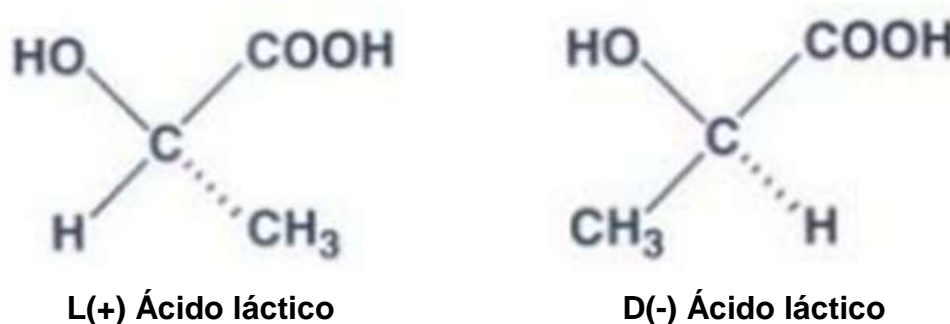
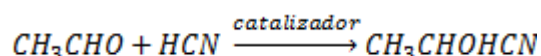


Figura 6. Molécula del ácido láctico con isomería L(+) y D(-)
(Adaptado de Narayanan *et al.*, 2004)

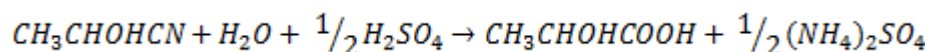
2.4.2 Síntesis química del ácido láctico

Esta síntesis se realiza al hacer reaccionar acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN), para producir lactonitrilo, el cual es hidrolizado a ácido láctico por H₂SO₄ o HCl para producir ácido láctico y sales de amonio para posteriormente esterificar al ácido láctico por metanol para la producción de metil lactato antes de la purificación por destilación para ser hidrolizado por agua en presencia de un catalizador ácido y así lograr la obtención de ácido láctico y metanol; la síntesis química tiene la desventaja de que el ácido láctico producido es una mezcla racémica D y L (Rocha-dos-Santos-Mathias *et al.*, 2014; Serna-Cock y Rodríguez-de-Stouvenel, 2005). Las reacciones involucradas en el proceso se presentan a continuación (Adaptado de Ghaffar *et al.*, 2014), donde las reacciones (a, b, c, d,) se llevan a cabo en la síntesis química del ácido láctico:

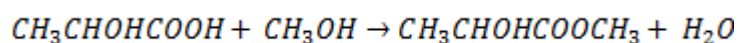
- a) El ácido cianhídrico es adicionado al acetaldehído en presencia de una base como catalizador para la formación de lactonitrilo



- b) Reacción en condiciones de alta presión en fase líquido, hidrólisis por H₂SO₄. Resultando ácido láctico y sulfato de amonio



- c) Purificación del ácido láctico a través de una destilación, por medio de una esterificación



- d) Hidrólisis con agua

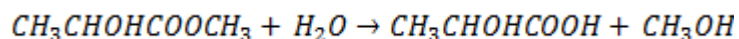


Figura 7. Mezcla racémica de ácido láctico (Wikipedia, 2016)

2.4.3 Producción biotecnológica del ácido láctico

Desde el ámbito comercial, el ácido láctico puede ser sintetizado por **conversión microbiana (biohidrólisis)** haciendo uso de hidratos de carbono como: glucosa, sacarosa, lactosa, almidón, maltosa o de derivados de algún proceso como son la remolacha azucarera y el suero de queso que contiene lactosa (Ghaffar *et al.*, 2014). El precio del ácido láctico dependerá entonces de la calidad del producto del cual es derivado.

➤ **Fermentación (biodegradación y/o transformación bioquímica)**

La fermentación es uno de los procesos más antiguos usados para la preservación de los alimentos o para la producción de bebidas alcohólicas, por lo que la palabra fermentación ha tenido diferentes definiciones.

El Diccionario de la Real Academia Española (RAE, 2016) en línea dice que fermentar es la degradación de glúcidos por acción enzimática dando lugar a un producto más sencillo como es el alcohol etílico. Esta definición es similar a la retomada por Lee (1992) del diccionario en línea de Merriam- Webster (2016) creado en 1828, que define a la fermentación como una transformación anaerobia enzimáticamente controlada de un compuesto orgánico (como de un glúcido a CO₂, etanol o un ácido orgánico) y el profesor emérito James M. Jay (2000) menciona que la fermentación es un proceso en el que los cambios químicos producidos en un sustrato orgánico son a través de las enzimas que son producidas por microorganismos.

Las definiciones anteriormente mencionadas hacen relación a lo que se describe bioquímicamente (**Figura 8**). La fermentación es un proceso metabólico que inicia con la glucólisis, en donde los hidratos de carbono y/o compuestos similares son parcialmente oxidados para la producción de ácido pirúvico o algún derivado, con la liberación de energía en ausencia de cadena transportadora de electrones. En la segunda etapa se realiza la transferencia de electrones e hidrógenos de las coenzimas reducidas (NADH, NADPH) producidas en la glucólisis al ácido pirúvico o algún derivado para llevar a cabo la formación de compuestos orgánicos reducidos como: ácido láctico, etanol, ácido acético, ácido propiónico, ácido

butírico, etc. La producción de energía (ATP) es en pequeñas cantidades, ya que la mayor energía almacenada en la molécula de glucosa inicial, pertenece al producto final que se obtiene (Jay, 2002; Tortora *et al.*, 2007).

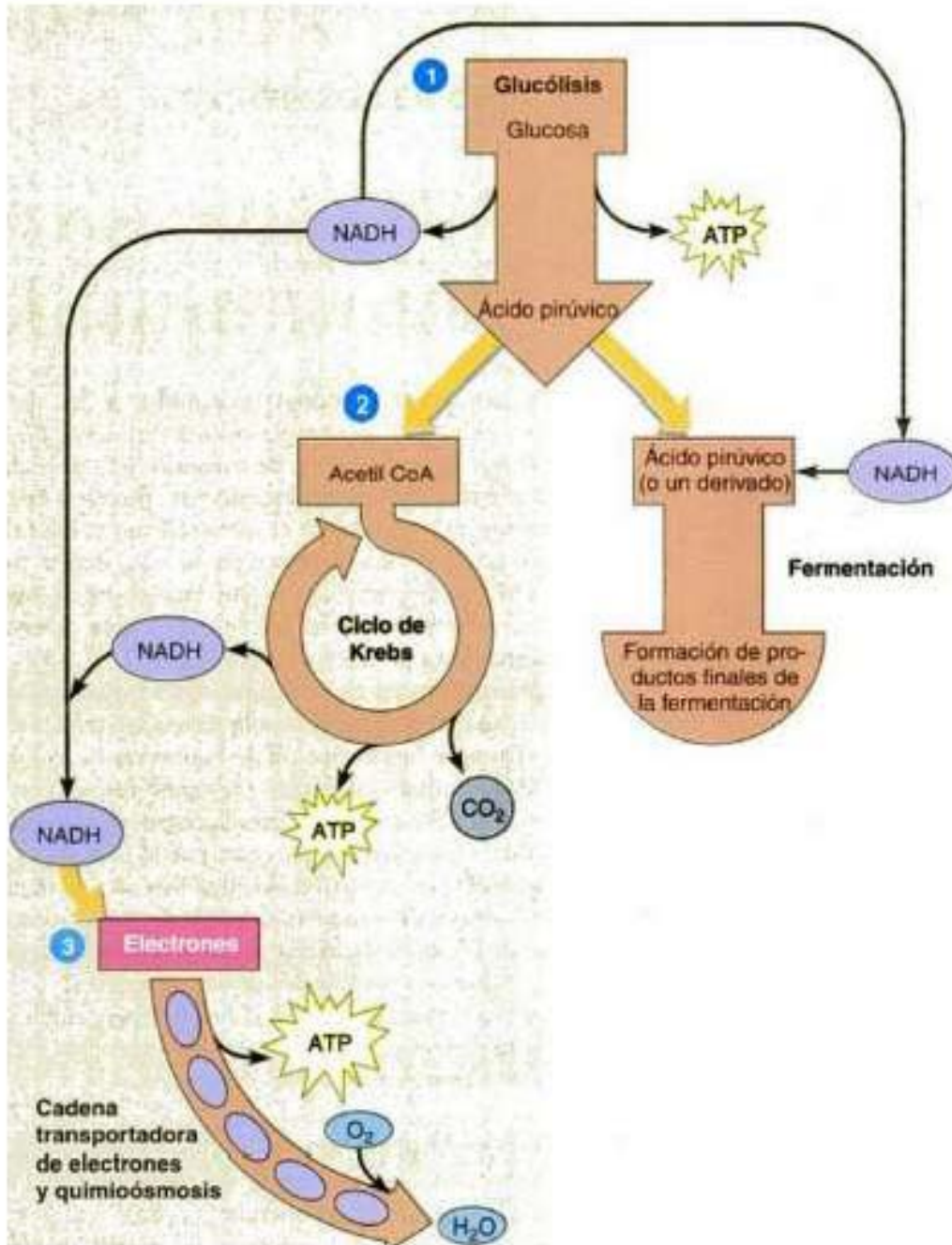


Figura 8. Esquema general de la respiración y la transformación bioquímica (glucólisis, ciclo de Krebs y fermentación) (Tortora *et al.*, 2007)

La fermentación tradicionalmente era conocida como el proceso para producir alcohol o ácido láctico (Lee, 1992). Ahora se sabe que algunos microorganismos tienen la capacidad de transformar bioquímicamente diversos sustratos y que los productos finales dependen del tipo de sustrato y de las enzimas que se encuentran en estado de activación del microorganismo (ver **Figura 9**) (Tortora *et al.*, 2007). Esto ha llevado a desarrollar en gran escala procesos para producción comercial de alimentos fermentados en donde los microorganismos más usados son bacterias ácido lácticas (BAL) para la producción de lácteos, carnes y vegetales fermentados. Estas bacterias poseen enzimas que producen componentes de aromas y sabores como el acetaldehído y diacetilo que son característicos de estos alimentos. Otra industria donde este bioproceso es fundamental es la de bebidas alcohólicas. En ella los microorganismos empleados son levaduras, siendo las más comunes *Saccharomyces cerevisiae* (Ross *et al.*, 2002).

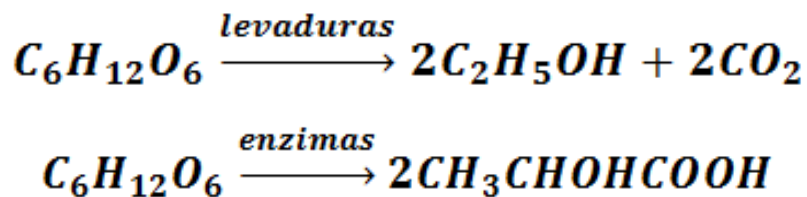


Figura 9. Representación de las reacciones que ocurren en la transformación bioquímica (Adaptado de Lee, 1992)

➤ Obtención de ácido láctico

El proceso biotecnológico para la producción y obtención de ácido láctico a través de sustratos baratos y que necesiten la adición mínima de nutrientes debe tener poca producción de biomasa y pocos subproductos (etanol, ácido acético, etc.). La presencia de subproductos depende en gran medida del microorganismo empleado. Estas bacterias que, como se dijo antes, se denominan *Bacterias Ácido Lácticas (BAL)* generalmente son gram positivas y se aprecian en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Principales bacterias productoras de ácido láctico (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000; Jay, 2000)

<i>Carnobacterium spp</i>	<i>Oenococcus spp</i>
<i>Enterococcus spp</i>	<i>Pediococcus spp</i>
<i>Lactococcus spp</i>	<i>Streptococcus spp</i>
<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Tetragenococcus spp</i>
<i>Lactosphaera spp</i>	<i>Vagococcus spp</i>
<i>Leuconostoc spp</i>	<i>Weisella spp</i>

spp= es una sigla que se añade cuando se escribe el género sin indicar las especies (Montoya-Villafañe, 2008)

Estos microorganismos pueden ser *homofermentativos*, es decir, que solo tendrán como resultado final el ácido láctico o puede ser microorganismos *heterofermentativos*, que producen ácido láctico y otros subproductos en cantidades apreciables.

2.4.3.1 Obtención del ácido láctico por medio de *Lactobacillus*

El ácido láctico se produce industrialmente por síntesis química y/o transformación bioquímica microbiana. Debido al impacto ambiental que generan los residuos agroindustriales se han planteado alternativas como son los bioprocesos ecológicos pues la industria alimentaria genera grandes volúmenes de residuos ricos en hidratos de carbono y lignocelulósicos los cuales son ideales para una bioconversión a nuevos productos como lo es el ácido láctico.

Los procesos biotecnológicos de ácido láctico producen enantiómeros D(-) o L(+) del ácido láctico, pero la producción de estos sustratos depende del tipo de bacteria empleada ya que ésta puede contener la enzima L(+) o D(-) lactato deshidrogenasa (LDH). Algunas bacterias contienen ambas enzimas, generalmente en proporciones distintas y otras bacterias pueden formar una mezcla racémica (DL) pues contienen la enzima lactato racemasa además de la LDH que transforma un isómero en otro (Romero y Mestres, 2004).

Por otra parte, la influencia que tiene la fuente del carbono, nitrógeno y el modo de transformarse bioquímicamente; existen otros parámetros que afectan de manera importante la producción de ácido láctico. Estos parámetros son pH, temperatura y

concentración de sustratos (Ghaffar *et al.*, 2014), siendo ejemplo de éstos la producción del L(+) ácido láctico por las bacterias *L. amylophilus* pues se da cuando hay un cambio de concentración en los nutrientes a 50 g/L de almidón en un proceso de biodegradación y transformación bioquímica por lotes. Las bacterias *L. delbrueckii* y *L. rhamnosus* producen este enantiómero del ácido láctico cuando tienen un proceso por lotes existiendo una variación en el pH, pues la primera bacteria produce el L-ácido láctico cuando el valor de pH cambia a 5.4 o 6.0 y la lactosa es usada como sustrato, la segunda bacteria produce L-ácido láctico cuando el valor de pH es 5.0 o 5.5 usando glucosa como sustrato. *L. delbrueckii* produce D-ácido láctico cuando la glucosa es metabolizada por lotes y en proceso continuo cuando el sustrato es glucosa + lactosa (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000). Los microorganismos del género *Lactobacillus* son considerados poseedores de una gran capacidad para transformar una variedad de glúcidos. Los microorganismos *Lactobacillus* son heterogéneos por lo que se dividen en grupos. Algunos ejemplos de ellos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. División de la especie *Lactobacillus* en grupos (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000; Ray y Bhunia, 2008)

Características	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Designación previa	Termo-bacteria	Streptobacteria	Bacterium
Tipo de fermentación (Biodegradación y transformación bioquímica)	Homofermentativo obligatorio	Heterofermentativo facultativo	Heterofermentativo obligatorio
Producto (s) final (es) después de la transformación bioquímica	Lactato	Lactato, acetato, etanol, CO ₂ , formato	Lactato, acetato, etanol, CO ₂
Transformación bioquímica de pentosas	-	+	+
Especies representativas	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> .	<i>L. casei</i> ssp. <i>L. plantarum</i> <i>L. sake</i>	<i>L. fermentum</i> <i>L. brevis</i> <i>L. sanfrancisco</i>

El resultado o los productos obtenidos al final de un proceso de transformación bioquímica dependerán de la vía que realizó el microorganismo inoculado y las condiciones de trabajo.

Autores como Hofvendahl y Hahn-Hägerdal (2000), dividen y describen las vías de transformación bioquímica de la siguiente manera:

- a. La vía homofermentativa el microorganismo únicamente utilizará las hexosas (glucosa) como sustrato y usa la ruta metabólica Embden–Meyerhof-Parnas, obteniéndose solamente como producto el ácido láctico (**Figura 10**).
- b. En la transformación bioquímica heterofermentativa se produce parcialmente ácido láctico, CO₂, etanol o acetato, los cuales son producidos de la glucosa usando la ruta metabólica de la fosfoacetolasa, la producción del etanol y del acetato dependen del potencial redox del sistema (**Figura 11**).
- c. Los ácidos mixtos son producidos por organismos homofermentadores que crecen bajo condiciones limitantes de sustratos de glúcidos, incremento de pH o descenso de temperatura pues, aunque se lleve a cabo la vía homofermentativa, existe diferencia en el metabolismo del piruvato, el cual es utilizado para la producción de ácido láctico por la lactato deshidrogenasa (LDH), el formato y acetil CoA por la piruvato formato liasa (PFL) (**Figura 12**).

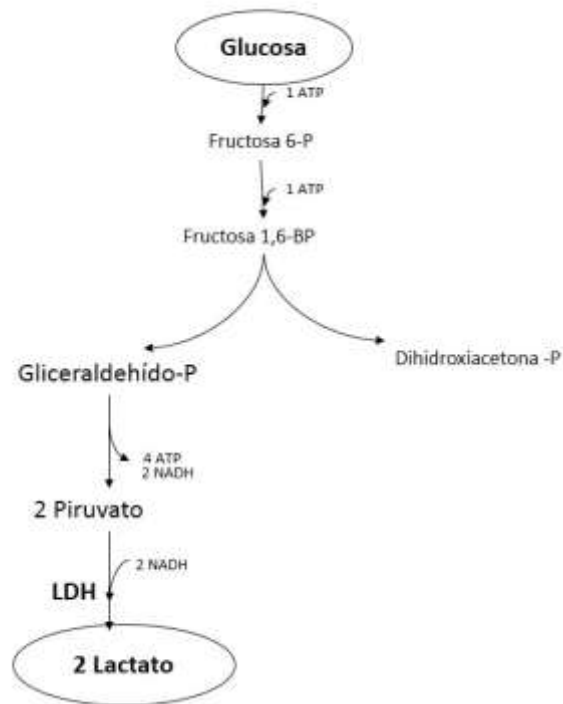


Figura 10. Ruta metabólica homofermentativa (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000)

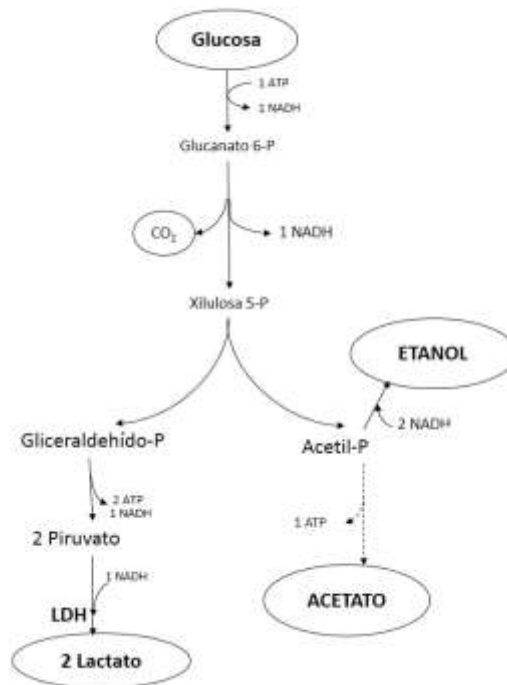


Figura 11. Ruta metabólica heterofermentativa (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000)

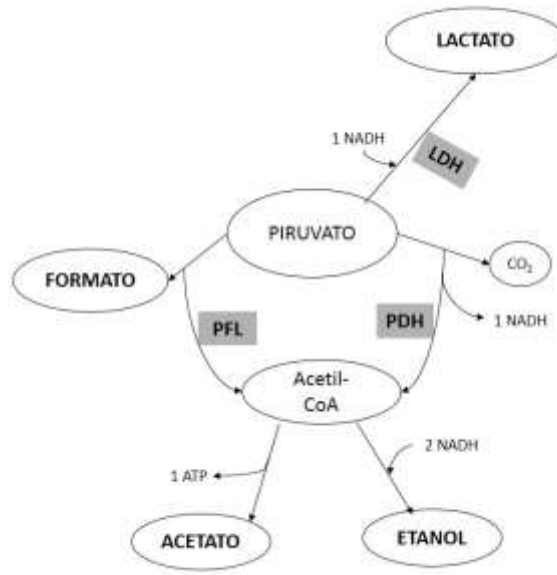


Figura 12. Producción de ácidos mixtos, por la metabolización del piruvato (Adaptado de Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000)

2.4.4 Obtención de ácido láctico usando un material residual

Debido a la versatilidad química que posee el ácido láctico para ser producido, la obtención biotecnológica es la ruta más utilizada. Esto se debe a que se obtiene una mejor calidad en el producto final, pues el microorganismo puede producir solamente un isómero D(-), L(+) o la mezcla. Su pureza dependerá del tipo de materia prima empleada (glúcidos, nitrógeno, etc.), siendo la preferencia por usar una materia prima u otra dependiente de su costo y su pureza (Ghaffa *et al.*, 2014). La biomasa lignocelulósica producida en las agro-industrias como residuos, posee un bajo costo y una alta disponibilidad. Además, tiene una composición rica de recursos de carbono, pues esta biomasa está conformada de polímeros de celulosa, hemicelulosa y de lignina que está fuertemente asociada con otro complejo celular de la biomasa vegetal. Básicamente la celulosa forma un esqueleto que está rodeado por hemicelulosa y lignina (Mussato y Teixeira, 2010). Cuando estos polímeros son hidrolizados, principalmente a glucosa u otro monómero, pueden ser metabolizados por diferentes microorganismos. Para que estos recursos sean empleados en la producción de ácido láctico deben haber tenido un pre-tratamiento de hidrólisis química (ver **Figura 13**) y enzimática para la

obtención de glúcidos que serán transformados a ácido láctico. Posteriormente, se realiza una separación de bacterias o partículas sólidas y se purifica el ácido láctico (Hofvedahl y Hän-Hägerdal, 2000).

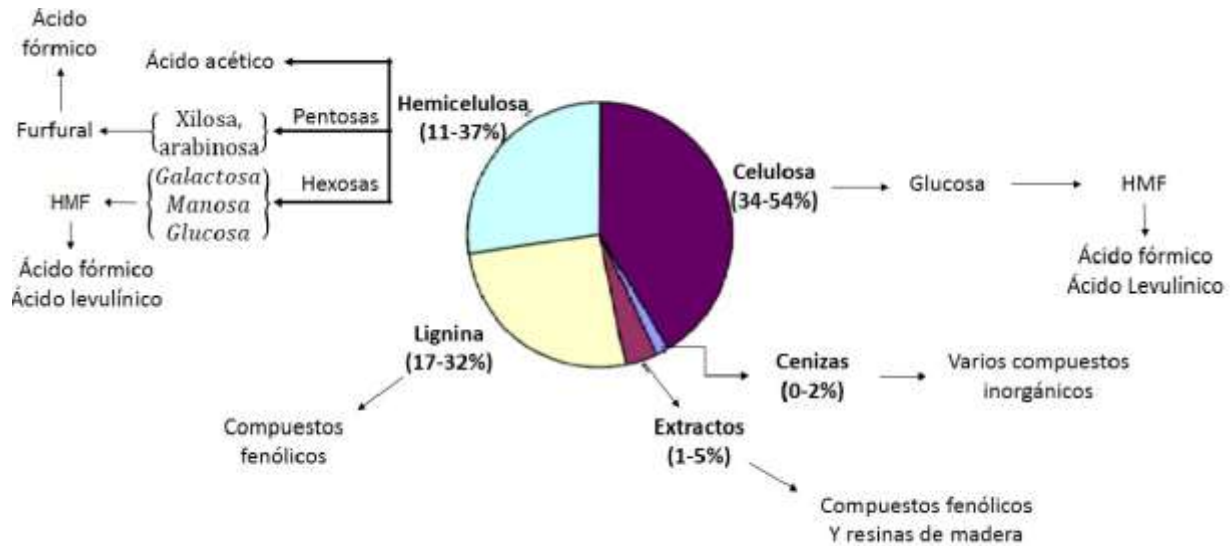


Figura 13. Composición del material lignocelulósico y sus principales productos de hidrólisis químicas (Adaptado de Taherzadeh y Karimi, 2007)

2.4.4.1 Hidrólisis químicas (ácido-alcálinas)

Autores como Mussatto y Texeira (2010) señalan que los pre-tratamientos de hidrólisis a materiales lignocelulósicos pueden ser químicos, enzimáticos o en conjunto. Las hidrólisis químicas se llevan a cabo para reducir el tamaño de partícula, para remover la lignina o modificarla y así promover a conveniencia la hidrólisis enzimática de los polisacáridos (Ghaffar *et al.*, 2014). El proceso químico se realiza con disoluciones. Para hidrolizar la hemicelulosa se emplean disoluciones ácidas de 1 a 4% de ácidos inorgánicos, siendo el H_2SO_4 el más utilizado, aunque también son usados el HCl, HNO_3 y H_3PO_4 , bajo condiciones de temperatura de 120 a 160°C. En la hidrólisis de la celulosa se emplean diluciones de H_2SO_4 o HCl con concentraciones del 10 a 30% con temperaturas de 160°C y presiones de 10 atm para liberar cadenas de glucosa fuertemente asociada porque la mayoría de este glúcido se encuentra cristalizado, en el proceso de hidrólisis de lignina, los métodos más empleados son tratamientos alcalinos,

ozonolisis y tratamientos organicos. Los tratamientos alcalinos se refieren al uso de diluciones de NaOH, Ca(OH)₂ o amonio y son los más usados para la eliminación de lignina en residuos agrícolas, pues causa un aumento de volumen (hinchazón) de la estructura interna, minimizando el grado de polimerización y separa la estructura que enlaza a la lignina y a los glúcidos al provocar un rompimiento del enlace (Mussatto y Texeira, 2010). En la **Figura 14** se esquematiza la estructura de un material lignocelulósico.

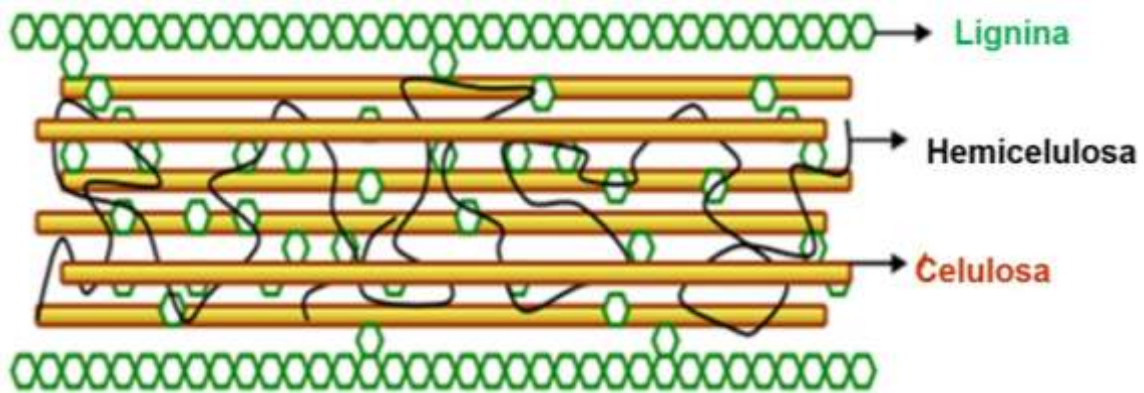


Figura 14. Representación de la estructura del material lignocelulósico (Adaptado de Mussatto y Texeira, 2010)

En la literatura se encuentran diferentes condiciones de trabajo con hidrólisis químicas (ácidas) ya que Taherzadeh y Karimi (2007) clasifican estas hidrólisis en dos grupos:

- a) La hidrólisis ácida concentrada (30 a 70%) tienen reportado un rendimiento teórico de glucosa del 90%. Este proceso puede ser operado a temperatura baja, aproximadamente de 40°C; sin embargo, es altamente corrosivo y puede dañar el recipiente o tanque en donde se lleva a cabo la hidrólisis.
- b) La hidrólisis ácida diluida es la más empleada y puede ser precedente de una hidrólisis enzimática, pero en esta hidrólisis el principal inconveniente es la formación de productos indeseables como son el HMF, ácido vinílico, ácido acético, ácido fórmico, ácido urónico, formaldehído, etc.

Los autores Taherzadeh y Karimi (2007) reportan que al someter un material lignocelulósico a condiciones de proceso de 0.5% H₂SO₄ con temperaturas de 188 a 234°C durante siete minutos se obtiene que más del 80% de la hemicelulosa puede ser hidrolizada a temperaturas menores de 200°C y que el máximo rendimiento de glucosa se obtiene a temperaturas mayores de 220°C. En la **Tabla 5** se recupera la comparación de ventajas y desventajas de los tratamientos de hidrólisis.

Tabla 5. Comparación entre los procesos de hidrólisis ácida concentrada y diluida (Adaptado de Taherzadeh y Karimi, 2007)

Método de análisis	Ventajas	Desventajas
Proceso con ácido concentrado	<ul style="list-style-type: none"> *Proceso a baja temperatura *Alto rendimiento de monómeros de glúcidos 	<ul style="list-style-type: none"> *Alto consumo de ácido *Corrosión de equipo *Alto consumo de energía para recuperar el ácido *Largo tiempo de reacción
Proceso con ácido diluido	<ul style="list-style-type: none"> *Bajo consumo de ácido *Corto tiempo de proceso 	<ul style="list-style-type: none"> *Proceso de trabajo a altas temperaturas *Bajo rendimiento de glúcidos *Corrosión de equipo *Formación de productos indeseables

2.4.4.2 Hidrólisis enzimática (celulasas)

El uso de enzimas para la formación de sacáridos solubles del material lignocelulósico (cereal tratado) es una posible alternativa a la degradación química, pero requiere de pre-tratamientos, porque la actividad de la enzima está restringida por la existencia de barreras como la lignina o por la alta cristalización de la celulosa (Macheiner *et al.*, 2003), ya que la hidrólisis enzimática es una reacción heterogénea que requiere contacto físico directo entre la enzima y el sustrato. Es necesario que las enzimas estén difundidas en la solución acuosa – partículas del sustrato para difundirse a través de las barreras físicas (Mussatto *et al.*, 2008). La restricción que la enzima tiene sobre el acceso a la estructura del residuo lignocelulósico es la fuerte asociación de cada uno de los polímeros constituyentes de la estructura. A continuación se presentan (**Figura 15**) y se

describen los principales polímeros que constituyen al residuo lignocelulósico (Pérez *et al.*, 2002):

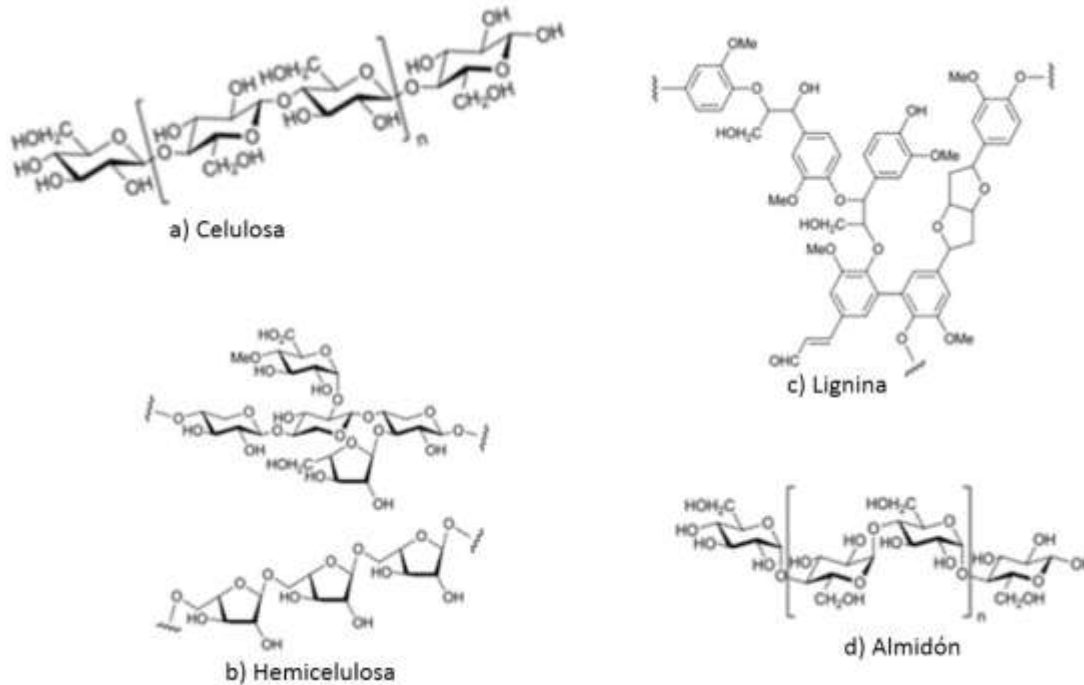


Figura 15. Estructuras químicas de (a) Celulosa, (b) Hemicelulosa, (c) Lignina y (d) Almidón (Adaptado de Kobayashi *et al.*, 2012)

- La celulosa es un polímero lineal de glucosa unido por enlaces β -1,4-glucosídicos formando moléculas de celobiosa.
- La hemicelulosa es un polímero de glúcidos con ramificaciones de cadena corta de diferentes glúcidos en contraste a la glucosa. Estos polímeros fácilmente hidrolizables están constituidos de D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa y los ácidos 4-O-metil-glucurónico, D-galacturónico, D-glucurónico. Los glúcidos están unidos por enlaces β -1,4-glucosídicos y ocasionalmente por β -1,3.
- La lignina es sintetizado por la generación de radicales libres que se liberan por una hidrogenación, mediada por la peroxidada, de tres alcoholes fenilpropiónicos: alcohol coniferílico (propanol guayacil), alcohol cumarílico (p-hidroxifenilpropanol) y el alcohol sinapílico (siringilpropanol).

La diversidad de los residuos de celulosa y lignina han contribuido a dificultar la realización de estudios enzimáticos, sin embargo, éstos también han permitido obtener resultados en que los microorganismos del reino Fungi son los mejores para la degradación de los tres polímeros ya que éstos producen diferentes enzimas bajo condiciones específicas de trabajo (Pérez *et al.*, 2002).

Autores como Mussatto *et al.* (2008) y Pérez *et al.* (2002) mencionan que las enzimas celulasas hidrolizan los enlaces β -1,4-glucosídicos de la celulosa. Estas enzimas están divididas en dos clases diferentes:

- a) Las endoglucanasas (endo- β -1,4 endoglucanasas) que hidrolizan los enlaces internos, preferiblemente la región de la celulosa amorfa liberando extremos terminales
- b) Las celobiohidrolasas (exo- β -1,4 glucanasas) que actúan sobre las cadenas generadas por las endoglucanasas, liberando celobiosa de los extremos no reductores

Sin embargo, para realizar una hidrólisis efectiva de celulosa a glucosa es necesario usar las enzimas β -glucosidasa o celobiosa que realizan el proceso de biodegradación de la celobiosa para producir glucosa.

CAPÍTULO 3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y METODOLOGÍA

3.1 Metodología

Como se mencionó en el capítulo uno, el objetivo de realizar esta investigación fue el de encontrar las mejores condiciones químicas, físicas y biológicas que permitieran obtener la mayor cantidad de glúcidos reductores (glucosa) y de ácido láctico. Para ello, se seleccionó un diseño experimental de tipo multifactorial, es decir, un diseño que permitiera analizar y explicar el efecto de dos o más variables independientes sobre una dependiente como es el caso de esta investigación.

3.2 Hipótesis

*El uso de la hidrólisis química auxiliada con el uso de enzimas celulasas (provenientes de *Aspergillus sp.*) permitirá una mayor obtención de glúcidos reductores lo cual promoverá una mayor producción de ácido láctico.*

3.3 Diseño de experimentos

Los métodos de análisis multifactorial son aquellos que permiten analizar y explicar los comportamientos de una variable aleatoria (variable de respuesta) debido al efecto o influencia de varios factores (variables explicativas). En consecuencia, son métodos analíticos más complejos que requieren el uso de programas estadísticos para realizar cálculos más exactos. A este tipo de análisis de varianza multifactorial se les denomina ANDEVA o ANOVA (*Analysis of Variance*, por sus siglas en inglés), ya que consiste en una prueba estadística que evalúa el efecto de los factores: variables independientes o explicativas, sobre una variable independiente: respuesta (Johnson y Wichern, 2007). En esta investigación se identificaron tres factores: a) Tipo de muestra, b) relación malta-volumen de la solución amortiguadora de citratos (sin y con tratamiento) y c) volumen de suspensión de enzimas celulasas (*Cellulase from Aspergillus sp.*) con tres réplicas por cada combinación de factores. En la **Figura 16** se muestra el modelo general del estudio de análisis de varianza con tres factores.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\gamma\alpha)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + U_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, I$$

$$j = 1, \dots, J$$

$$k = 1, \dots, K$$

$$U_{ijk} \sim N(0, \sigma^2) \text{ independientes}$$

Figura 16. Modelo general de análisis de varianza con tres factores (Johnson y Wichern, 2007)

3.3.1 Factores del análisis de varianza

En la **Tabla 6** se enumeran los factores utilizados para el ANDEVA de esta investigación.

Tabla 6. Factores de análisis de varianza para la desarrollo de la investigación

a) Tipo de muestra: se utilizó muestra con tres tratamientos diferentes
Muestra: con tratamiento NO DRÁSTICO (H ₂ SO ₄ 1% v/v y NaOH 1% m/v)
Muestra: con tratamiento DRÁSTICO (H ₂ SO ₄ 2% v/v y NaOH 4% m/v)
Muestra: SIN TRATAMIENTO
b) Relación masa muestra-volumen de la solución amortiguadora Gramos de malta (con y sin tratamiento)-volumen de solución amortiguadora de citratos 0.05M con pH=4.8
Relación 2:100
Relación 5:100
c) Volumen de enzimas celulasas (cellulase from Aspergillus sp.) Se inocularon estos volúmenes por cada 100 mL de solución amortiguadora
V ₁ = 150 µL
V ₂ =300 µL
V ₃ =450 µL

A continuación se presentan los factores propuestos para este diseño de experimentos; siendo la variable de respuesta, la cantidad de glúcidos reductores medidos como mg de glucosa obtenida/100g de residuo de malta inicial. Este mismo diseño experimental fue empleado para la determinación de ácido láctico,

siendo la variable de respuesta la cantidad del ácido láctico obtenido después de un proceso de transformación bioquímica con *Lactobacillus casei* sp. (ver **Tabla 7**). Todos los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con una $\alpha=0.05$, mediante el paquete estadístico (Statgraphics Centurion Versión XVI.I).

Tabla 7. Diseño de experimento propuesto para hidrólisis químicas y enzimática

	Tipo de muestra																	
	SIN TRATAMIENTO						Tratamiento NO DRÁSTICO (H ₂ SO ₄ 1% (v/v) y NaOH 1% (m/v))						Tratamiento DRÁSTICO (H ₂ SO ₄ 2% (v/v) y NaOH 4% (m/v))					
	Relación malta-solución amortiguadora						Relación malta-solución amortiguadora						Relación malta-solución amortiguadora					
	2:100			5:100			2:100			5:100			2:100			5:100		
	Volumen de enzima			Volumen de enzima			Volumen de enzima			Volumen de enzima			Volumen de enzima			Volumen de enzima		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
No. réplica																		
1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Donde. V1=150 μ L, V2=300 μ L, V3=450 μ L

Los tratamientos propuestos para esta investigación se realizaron de acuerdo con los tratamientos propuestos por Taherzadeh y Karimi (2007) y también por Mussatto y Texeira (2010). Estos autores plantearon realizar modificaciones y la eliminación de las estructuras barrera que se encuentren presentes en el residuo lignocelulósico para poder lograr hidrolizar la celulosa presente del pericarpio. La propuesta de las concentraciones usadas experimentalmente se realizaron considerando los parámetros de soluciones ácidas diluidas que pudieran ser precedentes de hidrólisis enzimáticas (Taherzadeh y Karimi, 2007).

Debido a que las condiciones de trabajo en el laboratorio no permitían alcanzar temperaturas de 120°C-230°C; se optó por prolongar el tiempo de hidrólisis para observar si se lograba la remoción de las barreras.

3.4 Metodología del desarrollo experimental

A continuación se presenta el desarrollo experimental (**Figura 17**).

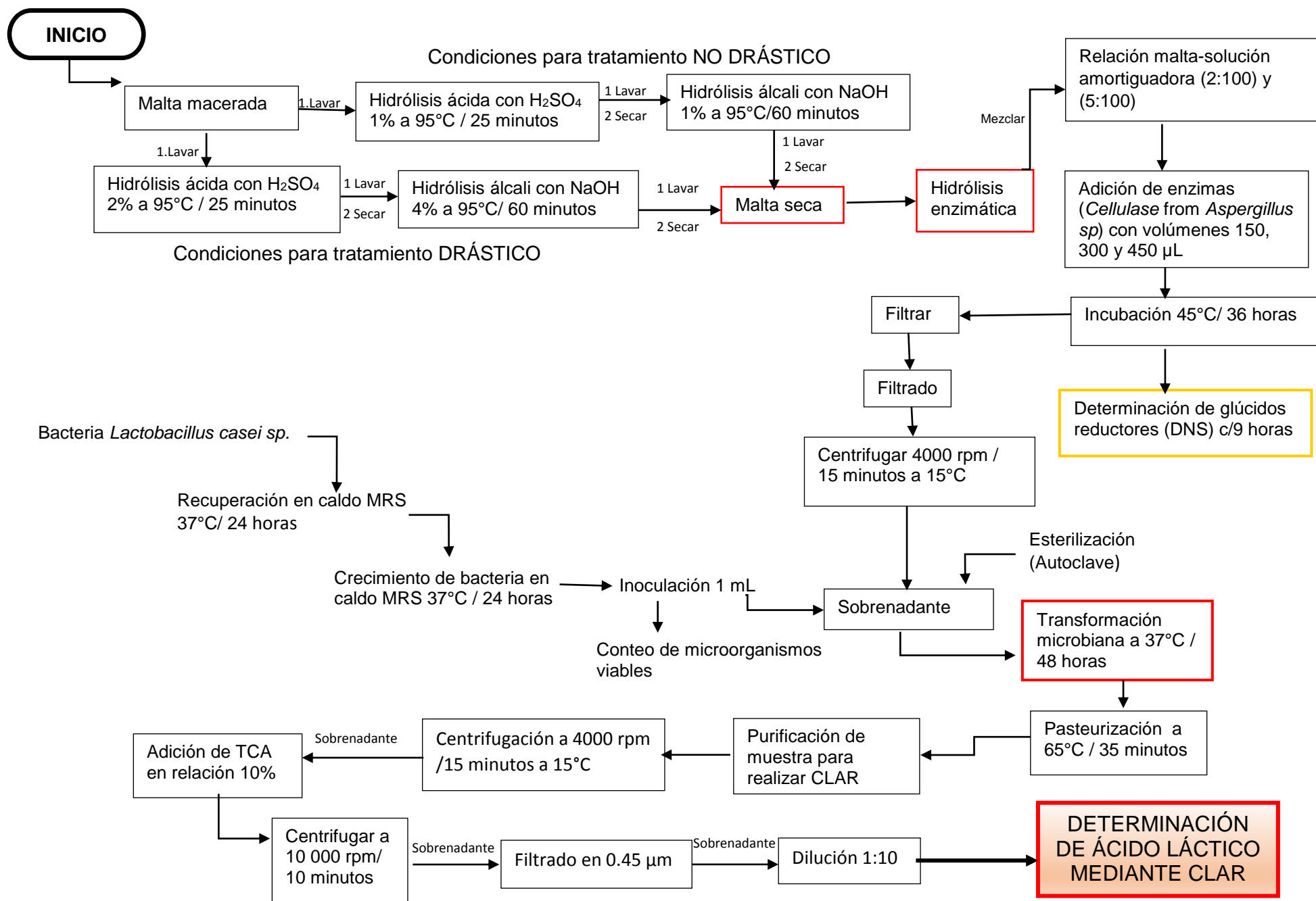


Figura 17. Diagrama de flujo de la metodología realizada

3.5 Preparación de las muestras

3.5.1 Materia prima utilizada

La materia prima (malta macerada) fue adquirida después del proceso de maceración donde fue filtrado el mosto (**Figura 18**) de la práctica de elaboración de cerveza que se lleva a cabo en la Planta Piloto del Laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad de Química en Ciudad Universitaria. Esto se hizo en abril del 2016.



Figura 18. Filtrado del mosto (Planta piloto de Ingeniería Química, FQ-UNAM)

El proceso del tratamiento de hidrólisis química se inició con residuos de malta húmeda, ya que provenían del proceso de maceración de la producción de cerveza, por lo que se realizó un lavado con agua potable para eliminar cualquier residuo de mosto presente, pues los glúcidos disueltos en el mosto pueden ser un factor que pudiera intervenir en las hidrólisis químicas.

3.5.2 Procesos de hidrólisis químicas (ácida-alcalina)

Los procesos de hidrólisis químicas (ácida-alcalina) que se realizaron a la materia prima se les denominó dependiendo de las condiciones de proceso a las que fueron sometidas en: TRATAMIENTO NO DRÁSTICO utilizando H_2SO_4 1% v/v y NaOH 1% m/v y TRATAMIENTO DRÁSTICO utilizando H_2SO_4 2% v/v y NaOH 4% m/v. Cada uno de estos procesos de hidrólisis consistió en dos etapas. En la

primera de ellas se realizó la hidrólisis ácida y en la segunda etapa la hidrólisis alcalina. A continuación se describe cada uno los procesos de hidrólisis química.

3.5.2.1 Hidrólisis ácida con H_2SO_4 al 1.0% o 2.0% v/v

Los tratamientos de hidrólisis química ácida se realizaron colocando una muestra inicial de 100 g de residuo de malta macerada con 800 mL de una solución de H_2SO_4 en concentraciones de 1.0 o 2.0% v/v (de acuerdo con el tratamiento a realizar), bajo las mismas condiciones de temperatura de $95^\circ C$ durante 25 minutos y con una agitación de 1200 rpm. Una vez finalizado el tratamiento de hidrólisis ácida se procedió a realizar lavados con agua destilada hasta lograr un pH neutro (**Figura 19A y B**) y después se secaron a $50 \pm 5^\circ C$ durante aproximadamente cuatro horas en un horno de convección marca Arsa®.



Figura 19A. Malta sometida a hidrólisis ácida



Figura 19B. Lavado de la malta después de la hidrólisis ácida

3.5.2.2 Hidrólisis alcalina empleando NaOH al 2% o 4% m/v

La hidrólisis química alcalina se realizó empleando una relación de 1 g de malta seca tratada con 20 mL de NaOH con concentraciones de 2.0 o 4.0% m/v dependiendo del método a realizar, empleando las mismas condiciones de temperatura de $95^\circ C$ durante 60 minutos con una agitación de 1200 rpm. Finalizada la hidrólisis alcalina se realizaron lavados con agua destilada hasta

lograr un pH neutro (**Figura 20A y B**), para poder secarse a $50\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente cuatro horas en un horno de convección marca Arsa®.



Figura 20A. Malta en proceso de hidrólisis alcalina



Figura 20B. Lavado de la malta después del proceso de hidrólisis alcalina

3.6 Proceso de hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se realizó a partir de las metodologías establecidas por Mussatto *et al.* (2007), así como las de Proañes y Piñeros-Castro (2014). Para ello, las muestras de malta fueron colocadas en matraces Erlenmeyer de 125 mL, mezclándose con solución amortiguadora (*buffer*, en inglés) de citratos 0.05M con $\text{pH}=4.8$ en una relación de gramos de malta seca-volumen de solución amortiguadora (2:100 y 5:100). En los matraces se adicionaron volúmenes de inoculación de 150, 300 y 450 μL de las enzimas celulasas (*Cellulase from Aspergillus sp.*) (Sigma-Aldrich) para después someterse a agitación en un baño de 45°C durante 36 horas a 100 rpm (**Figura 21**).



Figura 21. Hidrólisis enzimática de las muestras usando una relación 2:100 y 5:100, empleando un volumen de 150 μ L de células de *Aspergillus sp*

3.6.1 Determinación de glúcidos reductores (glucosa)

El objetivo principal de esta investigación fue la cuantificación de glucosa; obtenida de la hidrólisis enzimática que se realizó con base en la metodología del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la determinación de glúcidos reductores ⁴ establecida por la AOAC modificada por Miller en 1957 (Bello-Gil *et al.*, 2006; Gusakov *et al.*, 2011; Miller-Lorenz, 1959). Adicionalmente, la determinación de glúcidos reductores se realizó con base en el procedimiento del **ANEXO 1**, tomando una alícuota de 2 mL del sobrenadante durante cada 9 horas, centrifugándose a 4000 rpm durante 5 minutos a 15°C haciendo uso del equipo Marca Eppendorf Centrifuge 5810 R para eliminar los sólidos suspendidos (**Figura 22**). La cuantificación de los glúcidos fue realizada por medio de una curva patrón de glucosa como se aprecia en el **ANEXO 2**.

⁴ Es importante señalar que no es intención de este trabajo delimitar o debatir cuáles son los glúcidos reductores, por lo que se considerará a la glucosa como el glúcido reductor presente debido a la actividad de las enzimas celulasas y que la curva patrón empleada para esta determinación se realizó empleando este glúcido de interés (glucosa). Los valores de concentración a la que se realizó y los de la absorbancia manejada de 540 nm se pueden apreciar en el ANEXO 2



Figura 22. Determinación de glúcidos reductores (glucosa) por medio del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Finalizado el proceso de hidrólisis enzimática se filtró en vacío haciendo uso de papel GLASS MICROFIBRE FILTER 55mm Whatman™. El filtrado resultante fue centrifugado en un equipo a 4000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 15°C. El sobrenadante obtenido fue el que se empleó posteriormente como medio de cultivo durante el proceso de transformación bioquímica (**Figura 23A y B**).



Figura 23A. Filtrado de las muestras después de la hidrólisis enzimática

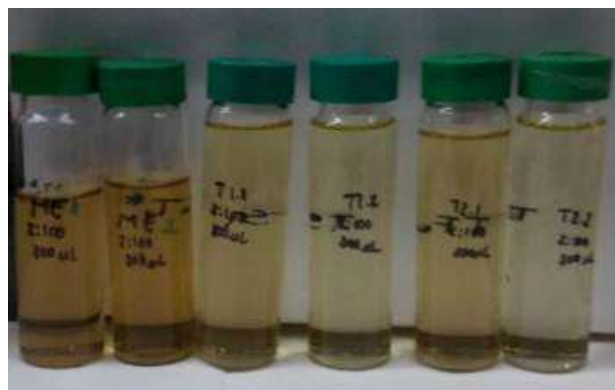


Figura 23B. Sobrenadante de las muestras después de las hidrólisis enzimática (celulasas)

3.6.2 Ajuste de pH del sobrenadante

Los sobrenadantes obtenidos de la hidrólisis enzimática fueron sometidos a un sobrecalentamiento (condiciones de pasteurización de 65°C durante 32 minutos) para desactivar las enzimas celulasas (*Cellulase* from *Aspergillus sp.*). Para ello se tomaron 10mL ajustándose el pH=6 con NaOH 0.1N (0.102N) por sugerencia

de Mussatto *et al.* (2007) para lograr las condiciones de inoculación de la bacteria *Lactobacillus casei sp.*

3.7 Proceso de biodegradación y transformación bioquímica empleando *Lactobacillus casei sp*

En el proceso de transformación bioquímica se empleó el microorganismo *Lactobacillus casei sp*, para la producción de ácido láctico, cabe mencionarse que esta cepa fue donada por el cepario del edificio A de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.7.1 Reactivación de la cepa de *Lactobacillus casei sp*

Para la reactivación de la cepa de *Lactobacillus casei sp.* se utilizó caldo estéril de MRS (De Man, Ragosa y Sharpe, Véase **ANEXO 3**) ya que es un medio líquido óptimo para el crecimiento de todas las especies de *Lactobacillus*, a condiciones de 37°C durante 24 horas (Ramirez-Gama *et al.*, 2010). Posteriormente, se inoculó 1mL de esta cepa en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de caldo MRS estéril para ser incubado nuevamente a 37°C durante 24 horas sin agitación (**Figura 24**).



Figura 24. Matraz con medio MRS y bacteria *Lactobacillus casei sp*

3.7.2 Preparación del medio y proceso biotecnológico seguido

En un volumen de 9 mL de sobrenadante ajustado a pH=6 (estéril) se inoculó 1 mL de *Lactobacillus casei sp* para posteriormente incubarse a 37°C durante 48

horas y realizar la transformación bioquímica a ácido láctico en una incubadora digital marca ECOSHEL modelo 9052 (**Figura 25**).



Figura 25. Tubos inoculados en proceso de transformación bioquímica sin movimiento a 37°C durante 48 horas

3.8 Cuantificación de microorganismos viables

Para la cuantificación de microorganismos viables inoculados en cada tubo se empleó la metodología de Miles y Misra (1938) y la de Thoha *et al.* (2012) descrita en el **ANEXO 4**. Para el conteo de microorganismos se realizó una serie de diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} , reportándose como unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un mililitro de muestra. Las placas inoculadas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas (**Figura 26A yB**).



Figura 26A. Serie de diluciones para la determinación de microorganismos viables



Figura 26B. Caja de Petri con colonias para determinar el inóculo de bacterias viables adicionadas a cada tubo de ensayo

3.9 Determinación de ácido láctico

La determinación de ácido láctico se realizó empleando un método analítico cuantitativo; ya que la bacteria láctica empleada para esta investigación es heterofermentativa por lo que se debe realizar la cuantificación de manera específica del producto (ácido láctico).

3.9.1 Cuantificación de ácido láctico mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La cuantificación de ácido láctico se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), como se conoce ahora a la USAI, de la Facultad de Química; empleándose el método analítico de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o *HPLC High Performance Liquid Chromatography*, por sus siglas en inglés) usándose un detector DAD a 195 nm; una columna ZORBAX SB C18 (150x4.6 mm) 3.5 μm , USEG011971 de Agilent a 25°C con flujo de 0.5 mL/min ISOCROTICO y utilizándose una muestra diluida 1:10 (150 μL de muestra + 1350 μL de agua) usándose 5 μL de inyección.

3.9.2 Limpieza de la muestra para la determinación de ácido láctico

Debido a las condiciones del proceso, las muestras presentaron una gran cantidad de macro-compuestos como proteínas, bacterias, glúcidos, etc., siendo estos compuestos un problema ya que pueden tapar la columna del equipo CLAR, por lo que fue necesario realizar una limpieza de estos compuestos como se cita a continuación:

1. Se toma una cantidad de 900 μL de la muestra y se adicionan 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) concentrado; solución que fue centrifugada a 10,000 rpm durante 10 minutos.
2. Se filtra a través de membranas de 0.45 μm

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada etapa del proceso experimental de esta investigación, así como la interpretación estadística de los resultados usando un nivel de confianza del 95%.

4.1 Proceso de hidrólisis químicas (ácida–alcalina)

Con la finalidad de encontrar las mejores condiciones de los procesos de hidrólisis química que ayudaran en la eliminación de las barreras de material lignocelulósico presentes en el residuo de malta macerada; se realizaron procesos de tratamientos denominados: TRATAMIENTO NO DRÁSTICO y TRATAMIENTO DRÁSTICO estos tratamiento se encuentran detallados en el capítulo de metodología y fueron empleados para determinar el efecto en la eliminación de barreras de material almidonado y/o lignocelulósico presentes y para conocer si existía una disponibilidad de la celulosa en el pericarpio del grano de la malta macerada.

En la **Tabla 8** se presenta la información de las masas iniciales y las obtenidas de las muestras tratadas después de las hidrólisis ácidas-alcalinas en condiciones húmedas y secas. También se presenta la información sobre la masa aproximada que se perdió durante estos procesos de hidrólisis a la que se le denomina aproximada ya que el tratamiento químico se inició con residuos de malta húmeda y en consecuencia se calculó la pérdida de masa en condiciones húmedas similares. Estas condiciones se obtuvieron con el objetivo de lograr un pH neutro después de realizar las hidrólisis ácidas-alcalinas y los lavados de la malta. El inicio de la hidrólisis química con materia prima húmeda se debe a que en la industria cervecera el residuo tiene origen en el proceso de filtrado después de la maceración y el secar este residuo en la industria generaría un costo económico elevado (Aliyu y Bala, 2011). Cabe mencionar que los resultados de pérdida de masa demostraron que no fue un impedimento el utilizar residuo de malta húmeda para iniciar los procesos químicos, puesto que los resultados exhiben que las muestras después de cada tratamiento de hidrólisis química

ácida y alcalina sufrieron una pérdida de masa. Esto se debe a lo mencionado por Mussatto y Texeira (2010) quienes indicaron que bajo condiciones ácidas se dañan la celulosa y la hemicelulosa, mientras que bajo condiciones alcalinas se produce una solvatación en la parte interna del material lignocelulósico, provocando así un incremento de área, se minimiza la polimerización y decrece la cristalización. De ello resulta la separación en los enlaces entre la lignina y los otros hidratos de carbono.

Tabla 8. Información sobre las masas (húmedas y secas) de las muestras

TIPO DE TRATAMIENTO	Masa inicial de malta húmeda (g)	Masa de la malta húmeda después de la hidrólisis ácida (g)	Pérdida de masa de la malta después de la hidrólisis ácida (g)	Masa de la malta seca después de la hidrólisis ácida (g)	Masa de la malta húmeda después de la hidrólisis alcalina (g)	Pérdida de la malta después de la hidrólisis alcalina (g) *	Masa de malta seca después de la hidrólisis alcalina (g)
NO DRÁSTICO	100.000 ^{±0.000}	57.731 ^{±5.061}	42.268 ^{±5.061}	28.301 ^{±4.354}	12.316 ^{±1.470}	45.414 ^{±5.520}	4.863 ^{±0.395}
PROMEDIO ^x							
DRÁSTICO	100.000 ^{±0.000}	55.622 ^{±1.553}	44.377 ^{±1.553}	22.823 ^{±1.334}	13.723 ^{±2.610}	41.899 ^{±2.113}	3.825 ^{±0.144}
PROMEDIO ^x							

^xPromedio de tres determinaciones.

*Este resultado se obtuvo considerando como "masa inicial" la masa de la malta húmeda después del proceso de hidrólisis ácida y la masa de la malta húmeda después del proceso de hidrólisis alcalina

El secar genera un costo, por lo que en esta investigación, el proceso de secado después de cada etapa de los tratamientos de hidrólisis química fue un proceso de control sobre el desarrollo experimental ya que los procesos de lavado y exprimido se realizaron manualmente. En la **Tabla 9** se observa que la cantidad de agua residual en la malta no fue la misma, pues los resultados de humedad calculados en base húmeda presentados en esta tabla difieren.

Tabla 9. Información sobre los porcentajes de humedad determinados en cada etapa de hidrólisis

TIPO DE TRATAMIENTO	% Humedad de la malta lavada después del tratamiento ácido	% Humedad de la malta lavada después del tratamiento alcalino
NO DRÁSTICO	*51.111 ^{±4.016}	*59.944 ^{±7.577}
DRÁSTICO	*58.937 ^{±2.861}	*71.243 ^{±6.967}

*Promedio de tres determinaciones

Debido a las condiciones en las que se realizan las hidrólisis químicas (ácidas-alcalinas); es posible dar origen a compuestos químicos como el furfural o el hidroximetil furfural (HMF) (**Figura 27A y B**) que son formados bajo condiciones ácidas o alcalinas a temperaturas altas. Es evidente la presencia de estos productos de reacción debido a la coloración que se presentó cuando se efectuaron los tratamientos (Macheiner *et al.*, 2003).



Figura 27A: Malta sometida a hidrólisis ácida



Figura 27B: Malta sometida a hidrólisis alcalina

Las muestras de residuo de malta con tratamientos y lavadas, fueron analizadas empleando un microscopio óptico de campo claro con el objetivo de 40X, antes y después de cada fase de los tratamientos de hidrólisis químicas en condiciones húmedas. En las **Figuras 28A-D** se aprecia que, después de los procesos químicos aplicados a las muestras de residuos de malta, existió una disminución de barreras lignocelulósicas y amiláceas, lo cual permite a las enzimas celulasas tener mayor acceso a los enlaces β -1,4-glucosídicos del polímero de la celulosa, que se encuentra disponible en el pericarpio del grano de la malta tratada para la obtención de glúcidos reductores. Entre estos glúcidos se genera principalmente glucosa debido a la acción de las enzimas β -glucosidasas.

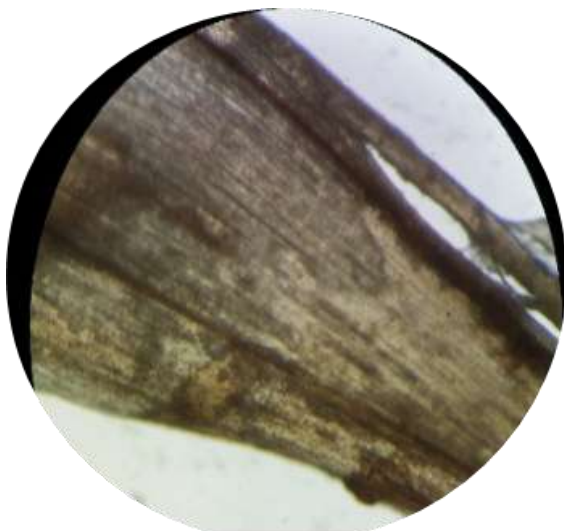


Figura 28A: Malta sin ningún tratamiento

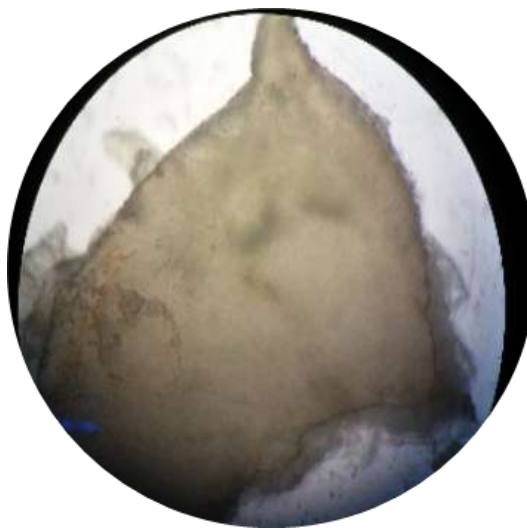


Figura 28B: Gránulo de almidón presente en malta sin tratamiento

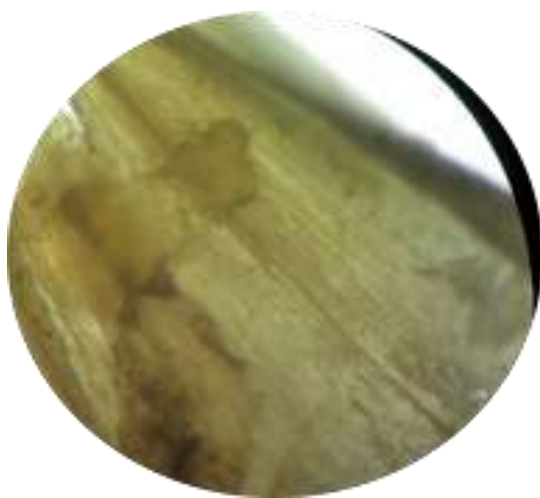


Figura 28C: Malta húmeda después del tratamiento con H₂SO₄ al 1%



Figura 28D: Malta húmeda después del tratamiento con NaOH al 1%

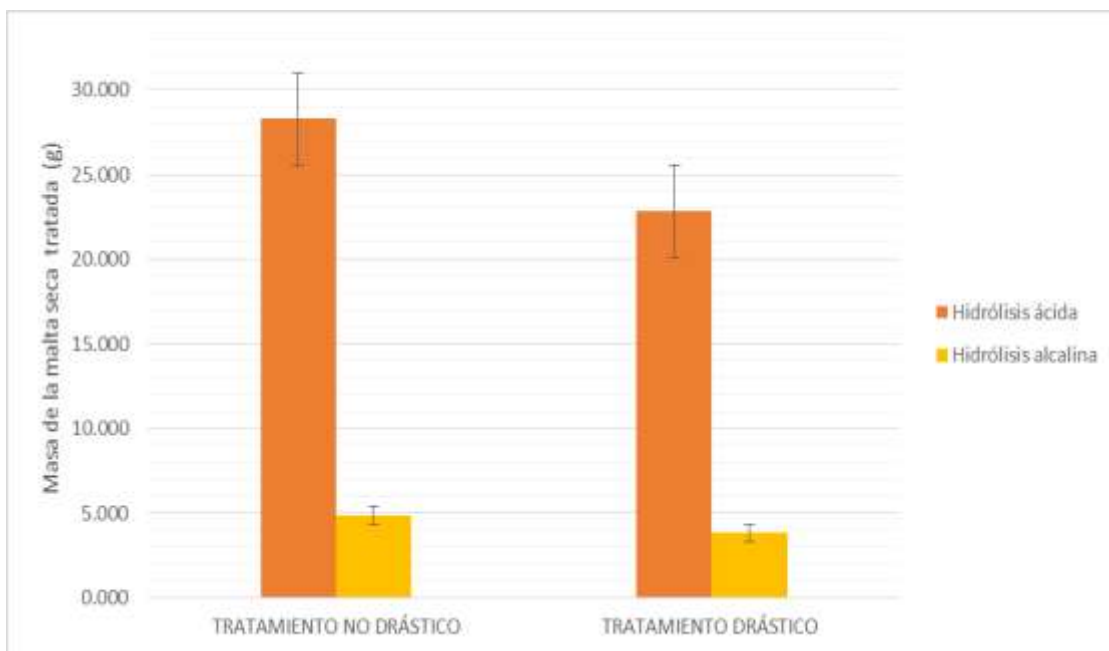
Con el objetivo de determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos empleados y sus etapas, se procedió a realizar un ANDEVA con el programa estadístico Statgraphics Centurion Versión XVI.I con un nivel de confianza del 95%. Como se aprecia en la **Tabla 10** no hubo diferencia estadísticamente significativa entre cada tratamiento ni en las etapas de los mismos ya que los valores-P no fueron menores a 0.05, por lo que se considera que se removió una cantidad de material lignocelulósico similar. Como

se mencionó en el apartado de marco teórico; el uso de estos procesos químicos hizo que se produjera una merma en la masa de las muestras. La información del análisis estadístico (**Tabla 10**) se realizó con la información de las masas de las muestras tratadas de residuo de malta en condiciones húmedas, obteniéndose como deducción general que no existió una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de material lignocelulósico removido.

Tabla 10. Análisis de varianza (ANDEVA) para la pérdida de masa que se tiene para cada tratamiento y entre las etapas del mismo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de tratamiento	1.483	1	1.483	0.09	0.766
B:Etapa del tratamiento	0.335	1	0.335	0.02	0.887
INTERACCIONES					
AB	23.713	1	23.713	1.51	0.254
RESIDUOS	125.936	8	15.742		
TOTAL (CORREGIDO)	151.467	11			

En el **Gráfico 2** se presentan las masas promedios resultantes del residuo de la malta tratada seca alcanzados después de cada etapa del proceso químico en los dos tratamientos propuestos. Se observa que en la etapa de hidrólisis ácida del tratamiento DRÁSTICO se tuvo una mayor merma comparada con el tratamiento NO DRÁSTICO. Esto podría deberse a que al usar una disolución de ácido más concentrada se logró tener una mayor remoción de hemicelulosa y la eliminación de restos de almidón aún presentes en el residuo de malta. Sin embargo, la masa de las muestras secas después de la hidrólisis alcalina fue muy similar entre ellas. En este gráfico también se observa la actividad que tienen las diluciones de NaOH al solvatar las estructuras internas del grano para eliminar lignina y posiblemente también restos de hemicelulosa o almidón que estaban unidos a este polímero; ya que el tratamiento NO DRÁSTICO tuvo como resultado de masa final (seca) un valor muy cercano al del tratamiento DRÁSTICO. La diferencia fue de aproximadamente un gramo (ver **Tabla 8**).



*Promedio de tres determinaciones

Gráfico 2. Masas de las muestras tratadas secas obtenidas en las hidrólisis (ácida–alcalina)

La información del análisis estadístico muestra que no existió una diferencia significativa. Sin embargo, se presentaron algunas diferencias en las características físicas de las muestras del residuo de malta tratadas. Éstas fueron más visibles en las condiciones secas al final del proceso de hidrólisis ácida-alcalina; pues con la hidrólisis ácida de ambos tratamientos se presentaron apariencias similares confirmándose este aspecto físico con el calculado como se observó en el ANDEVA (**Tabla 10**). No obstante, la diferencia de apariencia visible se presentó después de la hidrólisis alcalina en donde el tratamiento NO DRÁSTICO, si bien seguía conservando parcialmente la estructura del pericarpio de la malta lo hacía pero en un tamaño más pequeño y comprimido con una coloración más café. La muestra del tratamiento DRÁSTICO mostró una coloración más clara con aspecto más comprimido al perder la estructura del pericarpio provocando la formación de pequeños bultos (**Figuras 29A-C**).



Figura 29A. Malta seca después de hidrólisis ácida



Figura 29B. Malta seca después de la hidrólisis alcalina con tratamiento NO DRÁSTICO



Figura 29C. Malta seca después de la hidrólisis alcalina con tratamiento DRÁSTICO

4.2 Hidrólisis enzimática

Esta investigación se sustenta en un diseño experimental multifactorial. Por ello, en la etapa de hidrólisis enzimática se involucraron los tres factores; a) tipo de muestra, b) relación (masa de la malta seca-volumen de la solución amortiguadora) y c) el volumen de la enzima agregada. Lo anterior fue con el objetivo de determinar la existencia de una mayor cantidad de glúcidos reductores (glucosa).

4.2.1 Proceso de hidrólisis enzimática y obtención de glúcidos reductores (glucosa)

Con los tratamientos de hidrólisis química (ácida-alcalina) se consideró lograr un efecto de disminución de barreras de material lignocelulósico que no permitía la exposición y liberación de aquellas estructuras de glúcidos bioconvertibles presentes en el pericarpio del residuo de la malta tratada. En consecuencia, durante estos tratamientos quedaron glúcidos unidos a cadenas o polímeros celulósicos y, por esta razón, se hizo uso de una hidrólisis enzimática. Respecto de este proceso, Macheiner *et al.* (2003) y Forssell *et al.* (2008) comentan que las enzimas pueden ser usadas para la hidrólisis de polisacáridos a oligosacáridos y monosacáridos y, para ello, es necesario realizar un pre-tratamiento al residuo de la malta, ya que la presencia de lignina y la alta cristalización de la celulosa resultan ser una barrera para la actividad enzimática. El usar celulasas de *Arpergillus sp.* en solución acuosa fue debido a que autores como Pérez *et al.*

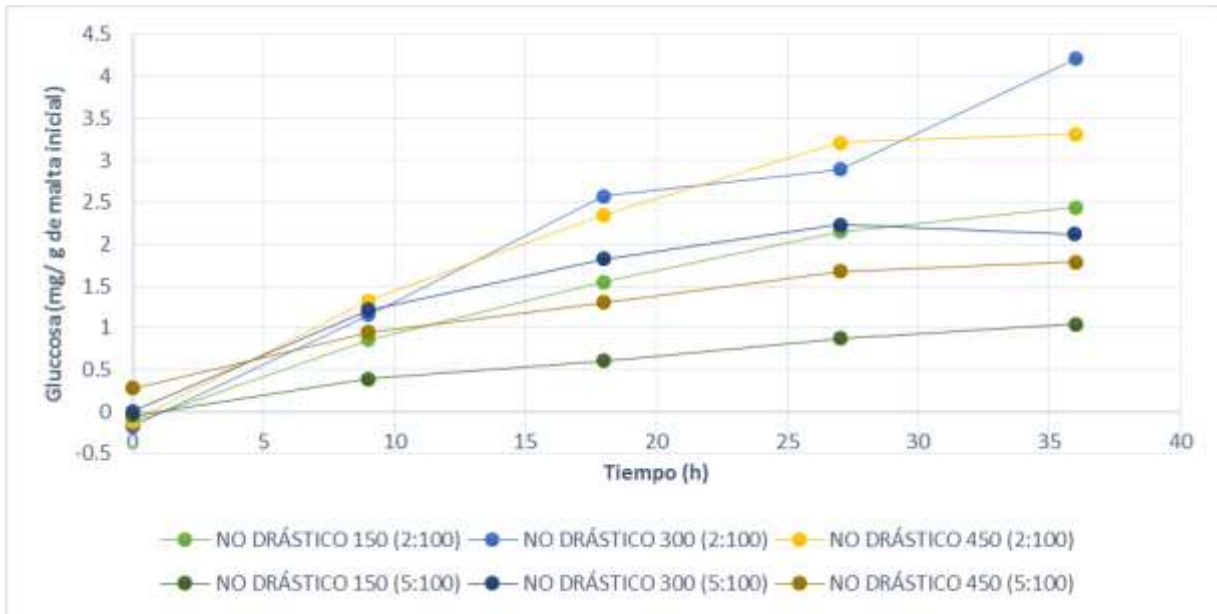
(2002) hacen mención que los microorganismos del reino Fungi son los mejores degradando los tres polímeros presentes en el residuo lignocelulósico (celulosa, hemicelulosa y lignina) debido a la síntesis de enzimas celulasas específicas que rompen el enlace β -1,4-glucosídico para obtener celobiosa y con la acción de la β -glucosidasa obtener glucosa.

Debido a que como resultado de los tratamientos de hidrólisis química se obtuvieron bajas masas de muestras de malta tratada, se procedió a realizar los ajustes de proporción para establecer la relación de **masa de malta seca-volumen de disolución amortiguadora** más efectivo (2:100 y 5:100) y, por consiguiente, un ajuste en la adición del volumen de celulasas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática propuesta en el diseño experimental. Este proceso de hidrólisis se realizó por **duplicado** para cada muestra. La información sobre la masa de la malta tratada, volumen de solución amortiguadora y volumen de enzima empleadas se pueden consultar en el **ANEXO 5**.

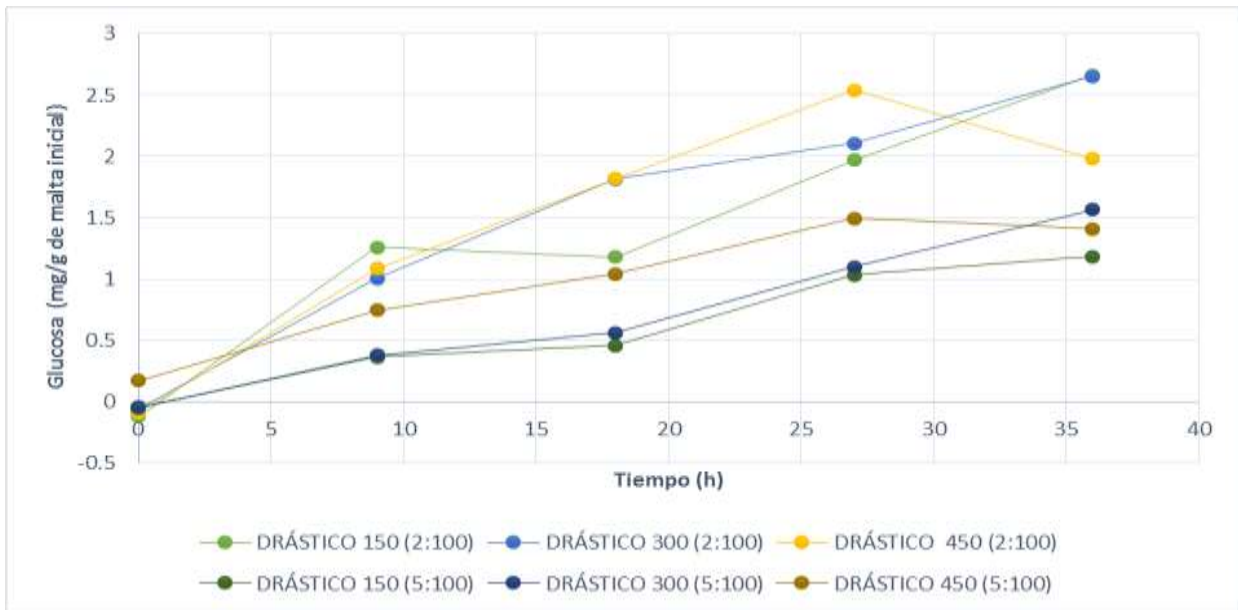
A continuación se presentan las gráficas en donde se observa el incremento de glúcidos reductores (glucosa) (**Gráficas 3, 4 y 5**)⁵ los resultados reportados son el promedio del duplicado de la cuantificación de glúcidos reductores durante 36 horas, haciéndose la determinación cada nueve horas. Estos valores son reportados como **mg de glucosa/g de malta inicial** con respecto al tiempo de la hidrólisis enzimática. Para la cuantificación se usó la curva patrón del **ANEXO 2**. Estas gráficas fueron analizadas por tratamiento, debido a que la cantidad de glucosa obtenida difiere entre tipos de malta (malta con tratamiento DRÁSTICO, NO DRÁSTICO y SIN TRATAMIENTO) y no es posible distinguir en la escala de una sola gráfica. En el **ANEXO 6** se pueden consultar los resultados promedios de la determinación de glúcidos reductores por tratamiento, relación malta-solución amortiguadora y volumen de enzima inoculada.

⁵ En las Gráficas 3 a 5, el código de las muestras corresponden al tipo de tratamiento, relación (malta - solución amortiguadora) y volumen de enzima que corresponden originalmente (ver Diseño de experimentos). No obstante, el ajuste realizado en la relación de malta-solución amortiguadora se mantuvo. Estas relaciones de masa-volumen y el volumen de enzima adicionado también fueron adecuadas de acuerdo con los ajustes realizados

En las **Gráficas 3 y 4** se exhibe la tendencia del incremento parcial de glúcidos reductores de las muestras de malta con tratamientos de hidrólisis químicas (NO DRÁSTICO y DRÁSTICO) con el paso del tiempo durante la hidrólisis enzimática. Para ambos tratamientos las muestras de malta relación 2:100 tuvieron una mayor obtención de glúcidos reductores al compararse con la relación 5:100.



Gráfica 3. Aumento de glucosa respecto al tiempo para las muestras de tratamiento NO DRÁSTICO



Gráfica 4. Aumento de glucosa respecto al tiempo para las muestras de tratamiento DRÁSTICO

Esto pudiera deberse a que en los experimentos de la primera relación (malta-solución amortiguadora) se presentó una mezcla más homogénea haciendo que el área de contacto resultara mayor, mientras que la segunda relación presentó una apariencia menos homogénea y, posterior a las 27 horas de hidrólisis enzimática, el aspecto de la mezcla resultó similar a la de una pasta, lo que hacía más difícil el mezclado, produciendo una disminución del contacto entre los componentes de la mezcla (muestra de malta, enzimas y solución amortiguadora). En consecuencia, se obtuvo como resultado final una mayor cantidad de glucosa en las muestras de residuo de malta que fueron sometidas al proceso de hidrólisis química con tratamiento NO DRÁSTICO. En la **Gráfica 5** se presenta la obtención y el aumento de glucosa respecto al tiempo de las muestras de residuo de malta que no fueron sometidas a ningún tratamiento (residuo de malta SIN TRATAMIENTO).

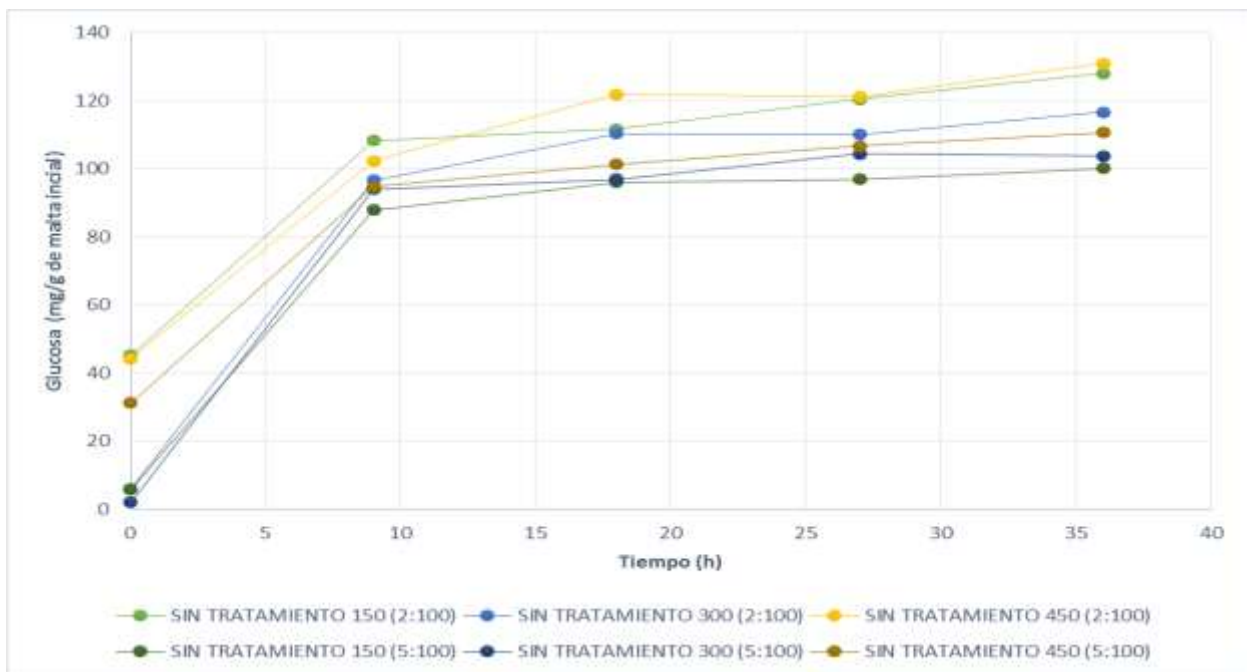


Gráfico 5. Aumento de glucosa respecto al tiempo para las muestras SIN TRATAMIENTO

Se aprecia que la cantidad de mg de glucosa obtenidos por cada 100 g de malta inicial fue mayor comparado con las maltas que previamente tuvieron un tratamiento químico. La relación 2:100 presentó una mayor cantidad de glucosa comparada con la relación 5:100. Esta diferencia se observa desde el tiempo

cero, confirmándose nuevamente que el contacto del sustrato con la enzima es una condición indispensable para que se realice la hidrólisis enzimática como lo mencionan Mussatto *et al.* (2008).

Esta situación se recalca debido a que se observa un aumento excesivo de glucosa del tiempo cero a las nueve horas. Este aumento brusco fue el resultado de la presencia de los gránulos de almidón existentes que no sufrieron hidrólisis durante el proceso de maceración en la producción de la cerveza. Estos gránulos se consideran como la principal fuente de sustrato para la degradación hidrolítica usada por el complejo de las enzimas celulasas SIGMA-ALDRICH. Esta consideración se debe a que después de las nueve horas la mayoría de las muestras presentaron un aumento de glucosa paulatino, y fue en esta etapa donde se observó la influencia que tiene la barrera lignocelulósica para bloquear el contacto de las enzimas celulasas con la celulosa. La muestra de malta SIN TRATAMIENTO, relación 2:100 con 450 μ L de enzimas, mostró un incremento de glúcidos durante la hidrólisis enzimática. Esto pudiera deberse a que aún quedaran residuos de endospermo amiláceo o que quizás la enzima realizó el rompimiento de otros enlaces β -1-4 glucosídicos presentes en el residuo de malta.

Con la finalidad de corroborar si realmente existió una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de glucosa obtenida, se realizó un ANDEVA de tres vías con una $\alpha=0.05$, considerando para el análisis estadístico la cantidad de glúcidos reductores obtenidos a las 36 horas que fue el tiempo final de la hidrólisis enzimática. Para ello se analizó el efecto de los tres factores que intervinieron en la obtención de glucosa durante la hidrólisis enzimática: a) tipo de muestra, b) la relación de masa de malta seca-solución amortiguadora y c) el volumen de suspensión de las enzimas celulasas (*Cellulase from Aspergillus sp.*). Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 11**. De acuerdo con los datos se puede observar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa para los factores A: tipo de muestra y B: relación (masa de malta-solución amortiguadora), pues los valores-P fueron menores a 0.05. Así mismo, se observó la existencia de diferencias estadísticamente significativas para la

interacción AB. Es decir, la cantidad de glúcidos reductores obtenidos presentaron diferentes comportamientos dependiendo del tipo de muestra aún con la misma relación (malta-solución amortiguadora). Lo mismo sucedió con la interacción AC, es decir, el tipo de muestra presentó un comportamiento distinto aunque se usara el mismo volumen de enzima.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de glucosa (mg/g de malta inicial)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de muestra	102658.	2	51328.8	3372.06	0.0000
B:Relación	494.032	1	494.032	32.46	0.0000
C:Volumen de enzima	84.2206	2	42.1103	2.77	0.0896
INTERACCIONES					
AB	659.116	2	329.558	21.65	0.0000
AC	203.997	4	50.9992	3.35	0.0323
BC	38.5717	2	19.2859	1.27	0.3056
ABC	78.7665	4	19.6916	1.29	0.3096
RESIDUOS	273.992	18	15.2218		
TOTAL (CORREGIDO)	104490.	35			

Como se observa en la **Tabla 11** el tipo de muestra usada afecta a los otros factores. Para corroborar la información se realizó un ANDEVA usando un nivel de confianza de 95%. Se analizaron los resultados de manera individual y/o en conjunto de los dos factores para que fuera evidente el efecto de cada factor o la dependencia de uno con otro. Se inició este análisis con un ANDEVA simple para el factor tipo de muestra. Con esta información se construyó la **Tabla 12** en la que se confirma lo presentado: que sí existe diferencia entre los tipos de muestra.

Tabla 12. Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de glucosa (mg/g de malta inicial) por tipo de muestra

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	102658.	2	51328.8	924.24	0.0000
Intra grupos	1832.7	33	55.5362		
Total (Corr.)	104490.	35			

Para determinar cuál o cuáles muestras presentan una diferencia estadísticamente significativa se procedió a realizar una prueba de rangos múltiples (**Tabla 13**). Se encontró que solamente la malta SIN TRATAMIENTO presentó una diferencia significativa en la cuantificación de glucosa, pues los resultados obtenidos fueron muy diferentes. Esto pudiera ser debido a la presencia de gránulos de almidón que no se hidrolizaron en la maceración o no se eliminaron por medio de procesos de hidrólisis química, como sucedió con las muestras de malta que fueron sometidas a un tratamiento de hidrólisis químicas.

Tabla 13. Prueba de rangos múltiples para glucosa (mg/g de malta inicial) por tipo de muestra

<i>Tipo de muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Muestra con tratamiento DRÁSTICO	12	1.90825	X
Muestra con tratamiento NO DRÁSTICO	12	2.48367	X
Muestra (SIN TRATAMIENTO)	12	115.474	X

Para comparar, si el factor relación (masa de malta seca -solución amortiguadora) tuvo una diferencia estadística significativa en cuanto a la determinación de glúcidos reductores de manera individual, se realizó un ANDEVA simple. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 14** y, a partir de ellos, se interpreta que esta relación no posee una diferencia estadísticamente significativa sobre la cantidad de glúcidos reductores, ya que los valores-P fueron mayores a 0.05.

Tabla 14 Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de glucosa (mg/g de malta inicial) por tipo de relación (2:100 y 5:100)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	494.032	1	494.032	0.16	0.6903
Intra grupos	103996.	34	3058.71		
Total (Corr.)	104490.	35			

De manera consecuente se corrobora que la diferencia estadísticamente significativa que se muestra en la **Tabla 11** es producto de la interacción de un factor sobre otro, es decir, la forma en cómo la malta-solución amortiguadora afecta el contenido de glucosa depende del tipo de muestra empleada, para demostrar este hecho se realizó un ANDEVA bifactorial involucrando únicamente

estos dos factores (**Tabla 15**). Luego de realizar el análisis estadístico de los dos factores es indudable que la diferencia estadística de relación (malta-volumen solución amortiguadora) depende del tipo de muestra confirmándose nuevamente lo presentado en la **Tabla 11**.

Tabla 15. Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de glucosa (mg/g de malta inicial) por tipo de muestra y las relaciones (2:100 y 5:100)

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de muestra	102658.	2	51328.8	2266.01	0.0000
B:Relación	494.032	1	494.032	21.81	0.0001
INTERACCIONES					
AB	659.116	2	329.558	14.55	0.0000
RESIDUOS	679.548	30	22.6516		
TOTAL (CORREGIDO)	104490.	35			

Después de realizar la hidrólisis enzimática, la cuantificación de glúcidos reductores y el ajuste de pH=6 se inoculó la bacteria *Lactobacillus casei* sp., para dar inicio al proceso de transformación bioquímica, como se cita en el apartado 4.3.

4.3 Biodegradación y transformación bioquímica (fermentación)

Para dar inicio al proceso de transformación de los glúcidos reductores (glucosa) obtenidos de la hidrólisis enzimática, los sobrenadantes ajustados a pH=6 y estériles fueron inoculados con 1 mL del cultivo de la bacteria *Lactobacillus casei* sp. Para determinar el número de microorganismos viables inoculados se realizó la metodología de Miles y Misra (1938) (**ANEXO 4**) obteniéndose como resultado que el inóculo fue de aproximadamente **3.2*10⁹ UFC** a cada tubo. El proceso de biotransformación se llevó a cabo a 37°C durante 48 horas.

4.4 Cuantificación de ácido láctico

Después de realizar el proceso de transformación bioquímica se efectuó la cuantificación de ácido láctico haciendo uso de la metodología de CLAR (*HPLC*). Las gráficas del área bajo la curva que se obtuvieron en la cuantificación con la

metodología empleada se encuentran en el **ANEXO 7**. De ella, se tienen los resultados finales presentados en la **Tabla 16** donde se observa que la mayor cantidad de ácido láctico obtenido fue la del sobrenadante adquirido de la hidrólisis enzimática de las muestras de residuo de malta SIN TRATAMIENTO. Estas muestras contenían gránulos de almidón que fueron hidrolizados por las enzimas celulasas produciendo monómeros de glucosa que fueron empleados por *Lactobacillus casei* sp. para proceder al proceso de biotransformación. Cabe recalcar que este microorganismo pertenece al Grupo II de la clasificación que se realizó en el capítulo de fundamentos teóricos (ver página 28). Es decir, que realiza un proceso de transformación bioquímica heterogénea facultativa; produciendo en gran cantidad ácido láctico pero también algún otro producto en menor proporción.

Tabla 16. Cantidad de ácido láctico obtenido de 100 g de residuo de malta inicial

Muestra	Tipo de muestra	Relación	Volumen de enzima (µL)	Ácido láctico (mg/g de malta inicial)
1	Tratamiento NO DRÁSTICO	2:100	150	4.440
2	Tratamiento NO DRÁSTICO	2:100	300	8.745
3	Tratamiento NO DRÁSTICO	2:100	450	6.294
4	Tratamiento NO DRÁSTICO	5:100	150	2.596
5	Tratamiento NO DRÁSTICO	5:100	300	2.814
6	Tratamiento NO DRÁSTICO	5:100	450	2.542
7	Tratamiento DRÁSTICO	2:100	150	7.517
8	Tratamiento DRÁSTICO	2:100	300	5.392
9	Tratamiento DRÁSTICO	2:100	450	6.015
10	Tratamiento DRÁSTICO ⁶	5:100	450	2.847
11	SIN TRATAMIENTO	2:100	150	163.418
12	SIN TRATAMIENTO	2:100	300	122.651
13	SIN TRATAMIENTO	2:100	450	150.890
14	SIN TRATAMIENTO	5:100	150	93.220
15	SIN TRATAMIENTO	5:100	300	98.381
16	SIN TRATAMIENTO	5:100	450	102.476

Los resultados son el promedio de datos obtenidos por duplicado

⁶ Las muestras de tratamiento drástico relación 5:100 de con volúmenes de enzima 150 y 300 µL se perdieron, pues presentaron un precipitado de una sal después del proceso de transformación bioquímica

Para graficar la cantidad de ácido láctico se hizo por tipo de muestra: muestras con tratamiento (NO DRÁSTICO y DRÁSTICO) y muestras SIN TRATAMIENTO. Esto obedeció a la diferencia de valores que hacía difícil su visualización en una misma gráfica (similar a lo presentado en la cuantificación de glucosa).

En las **Gráficas 6 y 7⁷** se puede observar los resultados de ácido láctico junto a los de glucosa obtenidos de la hidrólisis enzimática. Se graficaron juntos estos resultados para observar la relación que se presenta entre la cantidad de glucosa con la obtención de ácido láctico. Puede verse que las muestras que presentaron mayor cantidad de ácido láctico fueron aquellas que también tuvieron una cantidad alta de glucosa, mostrando así que la cantidad de glúcidos son una limitante para la producción del ácido láctico siendo para esta investigación el producto de interés.

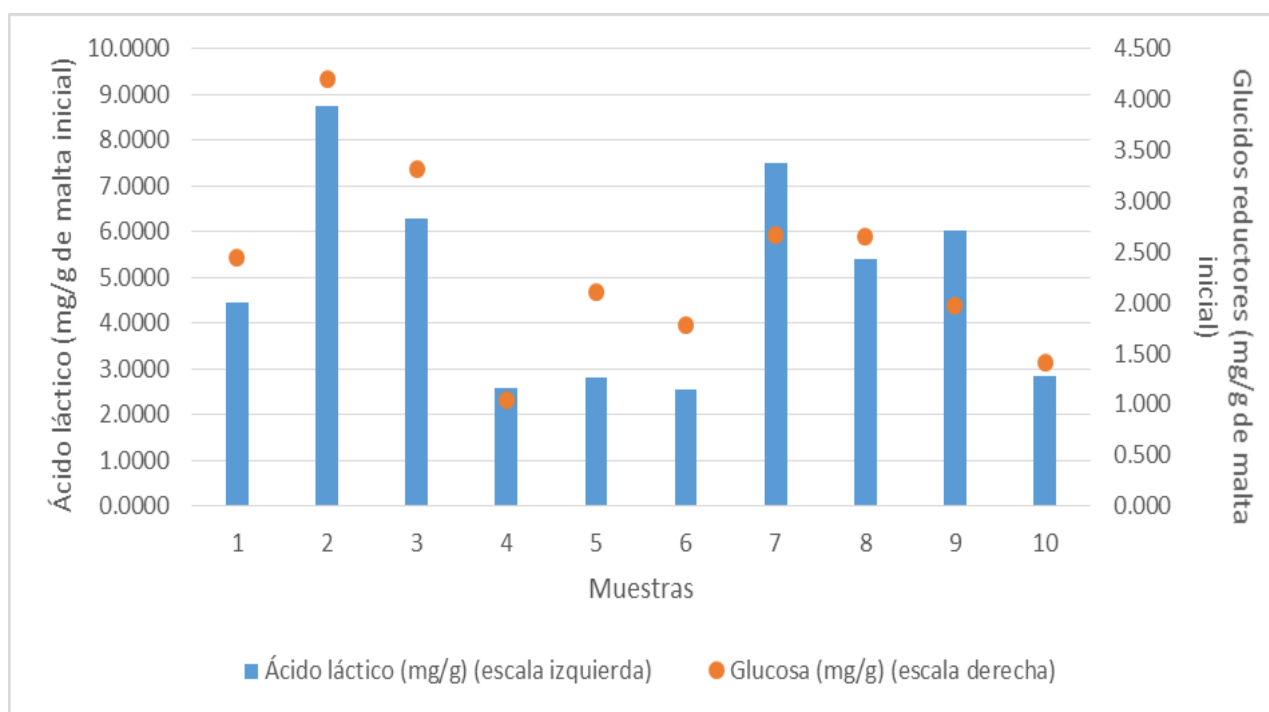


Gráfico 6. Relación de la producción de ácido láctico con la cantidad de glucosa obtenida en el proceso de hidrólisis enzimática (muestras CON TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS QUÍMICAS)

⁷ En las Gráficas 6 y 7 las columnas están codificadas con un número en la parte inferior. Este número corresponde al que se registró en la Tabla 16 en la columna de muestras, ya que escribir el nombre completo de la muestra ocuparía demasiado espacio en la gráfica obstaculizando su lectura e interpretación

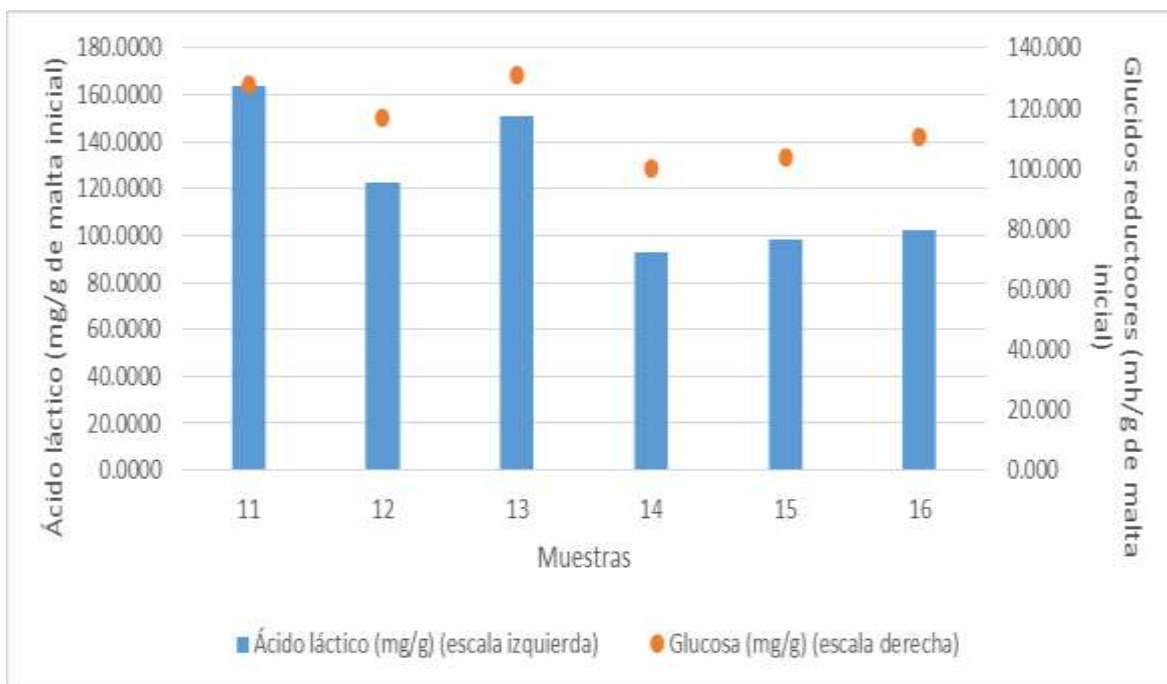


Gráfico 7. Relación de la producción de ácido láctico con la cantidad de glucosa obtenida en el proceso de hidrólisis enzimática (muestras SIN TRATAMIENTO)

Con la finalidad de corroborar la existencia de una diferencia significativa entre la cantidad de ácido láctico obtenido de las muestras de residuo de malta con y sin tratamiento, se realizó un análisis de varianza con una $\alpha=0.05$ (**Tabla 17**). Se aprecia que sí existe una diferencia estadística en la obtención de ácido láctico entre las diferentes tipos de muestras de malta empleadas.

Tabla 17. Análisis de varianza (ANDEVA) para la determinación de ácido láctico (mg/g de malta inicial) por tipo de muestra

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	51264.6	2	25632.3	76.42	0.0000
Intra grupos	4360.54	13	335.426		
Total (Corr.)	55625.1	15			

Para establecer qué tipo de muestras presentaron diferencias estadísticamente significativas se realizó una prueba de rangos múltiples (**Tabla 18**) en donde se observó que solamente las muestras de malta SIN TRATAMIENTO presentaron una diferencia estadísticamente significativa. Las muestras de residuo de malta

que fueron sometidas a hidrólisis química presentan homogeneidad en sus grupos (sin diferencia estadísticamente significativa).

Tabla 18. Pruebas de rangos múltiples para ácido láctico (mg/ g de malta inicial) por tipo de muestra

<i>Tipo de muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Muestra con tratamiento DRÁSTICO	6	4.57175	X
Muestra con tratamiento NO DRÁSTICO	4	5.4428	X
Muestra (SIN TRATAMIENTO)	6	121.839	X

El resultado del análisis estadístico realizado para el ácido láctico fue muy similar al que se obtuvo al analizar la cantidad de glucosa, pues las muestras SIN TRATAMIENTO fueron las que presentaron una diferencia estadísticamente significativa respecto de las otras muestras. Como resultado de esta información se puede afirmar que la cantidad de glúcidos reductores presentes delimita la producción de ácido láctico. Ahora bien, esto no significa que la producción de ácido láctico esté restringida únicamente por estos glúcidos, ya que existen otras alternativas bioquímicas que el microorganismo puede emplear. Para esta investigación se empleó una bacteria láctica heterofermentativa facultativa y es necesario plantearlo y recordar que esta bacteria puede hacer uso de otros glúcidos y metabolizarlos para la producción de ácido láctico. No obstante, aunque se controlen ciertas condiciones de crecimiento del microorganismo no se puede dominar la actividad de un organismo vivo, pues éste se desarrollará para sobrevivir de la manera más conveniente en el ambiente que lo rodee. Las bacterias, como todo organismo vivo, necesitan de nutrimentos indispensables como las proteínas para vivir y se considera que estas se encontraban disueltas en las muestras SIN TRATAMIENTO pues no se eliminaron por medio de las hidrólisis químicas.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Con los resultados obtenidos a partir del diseño de experimentos y de acuerdo con lo establecido en el objetivo general propuesto en esta investigación, el cual era: “Obtener la mayor cantidad de glucosa y ácido láctico a partir de cereales pre-tratados (malta) de la industria cervecera; empleando para ello diferentes condiciones de tratamientos hidrolíticos (ácido-básico) y enzimáticos (celulasas de *Aspergillus sp.*) que permitan una mayor obtención de glucosa”, se pueden derivar las siguientes conclusiones:

- ✓ La mayor cantidad de glucosa cuantificada resultó de una muestra de malta SIN TRATAMIENTO, relación 2:100 y con 450 μL de enzima, ya que en el proceso de hidrólisis enzimática se obtuvo un valor de 130.928 mg de glucosa/g de malta inicial.
- ✓ La mayor cantidad de ácido láctico cuantificado fue de la muestra SIN TRATAMIENTO, relación 2:100 con 150 μL de enzima, con 163.417 mg de ácido láctico/g malta inicial.
- ✓ De las muestras que fueron sometidas al proceso de hidrólisis química (ácido-alkalina); la muestra del tratamiento NO DRÁSTICO, relación 2:100 con 300 μL de enzima, fue la que presentó una mayor cantidad de glucosa (4.210 mg de glucosa/g de malta inicial) con respecto de las otras. Además, presentó el valor más alto en la cuantificación de ácido láctico (8.745 mg/g de malta inicial).
- ✓ La cantidad de glucosa delimita en cierta medida la producción de ácido láctico pues la muestra procesada con el tratamiento NO DRÁSTICO, relación 2:100 y 300 μL de enzima fue la que presentó la mayor cantidad de glúcidos reductores y de ácido láctico; siendo parcialmente similar a las

muestras SIN TRATAMIENTO, pues la muestra que contenía más ácido láctico presentó un valor de glúcidos reductores similar a la muestra que tuvo el valor numérico más alto.

- ✓ La realización de los procesos de hidrólisis enzimática cumplieron lo propuesto al inicio de esta investigación y que fue el obtener la mayor cantidad de glúcidos reductores (glucosa) con respecto al tiempo del proceso.
- ✓ Comparando las tres muestras de tratamiento NO DRÁSTICO, DRÁSTICO y SIN TRATAMIENTO en la cuantificación de glucosa, la última presentó una diferencia estadística significativa con respecto a las otras dos. Las enzimas hidrolizaron los gránulos de almidón presentes que no fueron eliminados por algún proceso enzimático (maceración) o químico (hidrólisis ácido-alcalina) precedente.
- ✓ No se presentaron diferencias estadísticamente significativas al usar tres volúmenes diferentes de la enzima (*Cellulase* from *Aspergillus* sp.), ya que la obtención de estos glúcidos dependió del tipo de muestra usada y no del volumen de la enzima.
- ✓ El factor relación 2:100 y 5:100 (malta seca-volumen de solución amortiguadora) aplicada a las muestras no presentaron una diferencia estadística significativa de manera individual. Sin embargo, la cantidad de glucosa obtenida presentó diferente comportamiento dependiendo del tipo de muestra aunque se encontraran bajo la misma relación.
- ✓ Los tratamientos de hidrólisis químicas (ácida-alcalina) remueven material lignocelulósico y material almidonoso que se encuentra fuertemente unido o cristalizado. Sin embargo, entre los tratamientos empleados en este desarrollo experimental denominados: NO DRÁSTICO Y DRÁSTICO;

estadísticamente no presentaron una diferencia significativa a un $\alpha=0.05$, ya que ambos removieron una cantidad similar de material lignocelulósico.

- ✓ La producción del ácido láctico es dependiente del microorganismo empleado, pues este ácido orgánico se producirá por vía homofermentativa o heterofermentativa.

- ✓ Las condiciones del medio de biodegradación y transformación bioquímica (fermentación) fueron determinantes, ya que la bacteria fue inoculada en un sobrenadante que contenía únicamente una mezcla de glúcidos con sales de citratos, lo que provocó una limitación en el desarrollo del microorganismo por falta de nutrimentos importantes como trazas de proteínas, minerales y otras.

5.2 Recomendaciones

La preocupación por disminuir el impacto ambiental de los residuos industriales es cada vez mayor. Esta situación ha generado la búsqueda de acciones efectivas para preservar el ambiente estando ante un gran reto. Por ello, se han generado investigaciones que proporcionan alternativas reales e innovadoras. Al respecto, la presente investigación tuvo la intención de contribuir a esta realidad al ofrecer información y procedimientos sobre cómo convertir un residuo lignocelulósico (residuo de malta cervecera) en un subproducto con valor económico y, al mismo tiempo, disminuir el impacto al ambiente que ocasiona ese residuo lignocelulósico al tener una incorrecta disposición. Quedan algunos puntos que serán importantes de considerar en futuras investigaciones y destacan entre ellos los siguientes:

- ◆ Proponer otras condiciones de hidrólisis química con soluciones de mayor concentración o con tiempos más prolongados que permitan observar si existen diferencias estadísticas significativas.

- ◆ Realizar el proceso de hidrólisis química con muestras de residuo de malta seca, lo cual permitirá observar el efecto de pérdida de material lignocelulósico o amiláceo, pues esta condición permitirá que sea mayor el contacto de las disoluciones con el residuo de malta.
- ◆ Es necesario trabajar con residuo cervecero proveniente de una industria cervecera y no únicamente de una planta piloto educativa ya que las condiciones de producción varían. Esta consideración es necesaria debido a que el residuo cervecero en el desarrollo experimental presentó una cantidad considerable de gránulos de almidón, que impidieron corroborar el uso de las hidrólisis químicas.
- ◆ Analizar por medio de CLAR el tipo de glúcidos reductores que se encuentran presentes en el sobrenadante obtenido de la hidrólisis enzimática, ya que en esta investigación se considera a la glucosa como el glúcido principal debido a la actividad de las enzimas celulasas.
- ◆ Es necesario utilizar una bacteria ácido láctica homofermentativa tipificada pues con la información exacta sobre los glúcidos existentes en el sobrenadante se puede indagar qué tipo de ruta metabólica realiza o podría realizar el microorganismo, así como el posible enantiómero del ácido láctico que se producirá. Esto se debe a que el metabolismo del microorganismo cambia al modificar uno o todas las condiciones de desarrollo (la temperatura, el pH y el sustrato o la concentración de estos).
- ◆ Trabajar simultáneamente hidrólisis enzimáticas y transformación bioquímica, dado que la bacteria podría utilizar los monómeros de glúcidos que se liberen para la producción de ácido láctico o el sub-producto de interés.

- ◆ Acondicionar el sobrenadante con nutrientes para que las bacterias se desarrollen de mejor manera, evitando la adición de algún glúcido pues éste alterará el metabolismo de la bacteria y no se tendrá certeza sobre el uso del glúcido que se obtuvo de la hidrólisis enzimática.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. y Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. ***Biotechnology Advances***, **31**(6):877-902. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Aliyu, S. y Bala, M. (2011). Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. ***African Journal of Biotechnology***, **10**(3):324-331.
- Bazán-Hernández B. A. (2015). Detección de cebada maltera genéticamente modificada en cervezas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ***Tesis Profesional***, UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Edo. de Mex., México.
- Bello-Gil, D., Carrera-Bocourt E., Díaz-Maqueira, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método de ácido 3,5 dinitrosalicílico. ***Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar***, **XL**(2): 45-50.
- Callejo-González, M. J. (2002). ***Industrias de Cereales y derivados***. 1ra Edición. S.A. MUNDI-PRENSA LIBROS: Madrid España. Pp. 244, 247.
- Cerveceros de México. (2016). Disponible en [http://www.cervecerosdemexico.org.mx/la-
cerveza-desde-el-origen/](http://www.cervecerosdemexico.org.mx/la-cerveza-desde-el-origen/) (último acceso 18 de octubre de 2016).
- Contreras-López, E., Jiménez-Ordaz, J., Hernández-Madrigal, T., Añorve-Morga, J., Beltrán-Hernández, R. (2008). Composición química de cebadas cultivadas bajo diferentes condiciones de labranza en tres localidades del estado de Hidalgo, México. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, ***Bioagro***, **20**(3):201-208. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714153007> (Último acceso 13 de agosto de 2016)
- Datta, R. y Henry, M. (2006). Review. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies. ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology***, **81**:1119-1129.
- Delcuor, A. J. y Hosney, C. R. (2010). ***Principles of Cereals Science and Technology***. 3ra Edición. St. Paul, Minnessota, U.S. Pp. 1-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/9781891127632.001> [En línea]. Disponible: <http://aaccipublications.aaccnet.org/doi/full/10.1094/9781891127632.001> (Último acceso el 15 de septiembre de 2016).
- DOF. (2009). DIARIO OFICIAL (Primera Sección). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. CUARTO. - Se modifica el encabezado de la tabla 13 para quedar como sigue: Tabla 21 - Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la

magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. **Diario Oficial de la Federación**: jueves 24 de septiembre de 2009. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.

- DOF. (1994). NOM-127-SSA1-1994. "SALUD AMBIENTAL, AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO-LIMITES PERMISIBLES DE CALIDAD Y TRATAMIENTOS A QUE DEBE SOMETERSE EL AGUA PARA SU POTABILIZACION". Dirección General de Normas. Poder Ejecutivo Federal. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México.
- FDA. (2015). Food and Drugs Administration. Department of Health and Human Services. Title 21--Food and drugs. Chapter I--Food and Drug Administration Department of Health and Human Services. Subchapter B--FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION (CONTINUED). Part 184. Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. Disponible en <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=184.1061> (Último acceso el 10 de noviembre de 2015)
- FND. (2014). Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural, Forestal y Pesquero. Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP). Disponible: <http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Ficha%20Cebada.pdf> (Último acceso 19 de agosto de 2016).
- Forssell, P., Kontkanen, H., Schols, H. A., Hinz, S., Eijsink, G. H. V., Treimo, J., Robertson, A. J., Waldron, W. K., Faulds, B. C. y Buchert, J. (2008). Hydrolysis of brewers' spent grain by carbohydrate degrading enzymes. **Journal of the Institute of Brewing**, *114*(4):306-314. <http://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00774.x>
- Garduño-García. A., Martínez-Romero, S., López-Cruz, I. L., Ruiz-García, A. (2014). Simulación del proceso de fermentación de cerveza artesanal. **Ingeniería Investigación y Tecnología**, *XV*(2):221-232.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N. y Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, *7*(2):222–229.
- Guinness de Caracas. (2016). CERVEZARTE Sueña Global-Bebe Local. Disponible en <http://www.cervezarte.com/cebada-malteada-para-la-cerveza-artesanal-venezolana/> (Último acceso el 17 de septiembre de 2016)
- Gusakov, V., Kondratyeva, G., Sinitsyn, P. (2011). Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. **International Journal of Analytical Chemistry**, 2011, ID 283658, 4 páginas. [En línea] (Actualizado al 15 de septiembre de 2015) Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ijac/2011/283658/> (Último acceso el 17 de septiembre de 2015).
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N. y Gallagher, E. (2010). Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, *9*(3):318-328.

- Herryman-Munilla, M., Blanco-Carracedo, G. (2005). Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. **Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XXXIX(1):49-59.** Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120659007> (Último acceso el 18 de agosto de 2016).
- Hofvendahl, K. y Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. **Enzyme and Microbial Technology, 26:87-107.**
- INR. 2013. Instituto Nacional de Rehabilitación. Comité de Bioseguridad. Disponible en: <http://www.inr.gob.mx/Descargas/bioSeguridad/acidoLactico54.pdf> (último acceso el 01 de junio del 2016).
- Jay, J. M. (2000). **Modern food microbiology.** Sixth ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publisher, Inc. P. 114.
- Johnson, A. R. y Wichern, W. D. (2007) **Applied Multivariate Statistical Analysis.** 6th ed. New Jersey, US: Person Prentice Hall.
- Kobayashi, H., Ohta, H. y Fukuoka, A. (2012). Conversion of lignocellulose into renewable chemicals by heterogeneous catalysis. **Catal. Sci. Technol., 2:869-883.**
- Lee, J. M. (1992). **Biochemical Engineering.** Prentice. Hall, Inc. London. P. 9 http://s3-ap-southeast-1.amazonaws.com/erbuc/files/5141_009ee939-86b8-43b4-b405-90c97b6eded9.pdf (Último acceso el 25 de septiembre de 2016).
- Macheiner, D., Adamitsch, F. B., Karner, F. y Hampel, A. W. (2003). Pretreatment and hydrolysis of brewer's spent grains. **Engineering in Life Sciences, 3(10):401-405.**
- Merriam-Webster. (2016). Disponible en <http://www.merriam-webster.com/dictionary/fermentation> (Último acceso 24 de octubre de 2016).
- Miles, A. A. y Misra, S. S. (1938). The Estimation of the Bacterioidal Power of the Blood. **Journal of Hygiene, 38(6):732-749.**
- Miller-Lorenz, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry, 31(3). 426-428.**
- Montoya-Villafañe, H., H. (2008). **Microbiología básica para el área de la salud y afines,** 2da Edición. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. P. 56
- Mussatto, S. I., Dragone, G. y Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science, 43(1):1-14.**
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Dragone, G., Mancilha, M. I., Roberto, I. C. (2007). Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Biotechnology Letters, 29(12):1973-1976.**
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, M.F. A., Roberto, I. C. (2008). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology, 43:124-129.**

- Mussatto, S. I., Teixeira, J. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. ***Applied Microbiology and Microbial Biotechnology***, **2**:897-907.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P., Srivastava, A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization, ***Electronic Journal of Biotechnology***, **7**(2):167-179
- Patrick-Fox, G. (2010). ***Chemical composition in Barley Grains and Malt Quality***. [Versión de ResearchGate] DOI: 10.1007/978-3-642-01279-2_3. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/227235861_Chemical_Composition_in_Barley_Grains_and_Malt_Quality (Último acceso 15 de agosto 2016).
- Peréz, J., Muñoz-Dorado, J., de-la-Rubia, T. y Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. ***International Microbiology***, **5**:53-63.
- Proaños, J. y Piñeros-Castro, Y. (2014). Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz por *Lactobacillus delbrueckii*. ***MUTIS. Journal of the Faculty of Sciences and Engineering***, **4**(1):33-39.
- RAE. (2016). Real Academia Española. Diccionario de la lengua española. Disponible en: <http://dle.rae.es/?id=HmGWTc5> (Último acceso 06 de octubre de 2016).
- Ramírez-Gama, R. M., Luna-Millán, B., Mejía Chávez A., Velázquez-Madrado, O., Tsuzuki-Reyes G., Vierna-García, L., Hernández-Gómez, L., Müggenburg-Rodríguez, I., Camacho-Cruz, A., Urzúa-Hernández M. del C. (2010). ***Manual de Prácticas de Microbiología General***. Sexta edición. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México. Pp. 142-165.
- Ramos-Cuevas, I. (2006). Recopilación bibliográfica para el estudio del proceso general de elaboración de cerveza. ***Tesis Profesional***. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Edo. de Mex., México.
- Ray, B. y Bhunia, A. (2008). ***Fundamental Food Microbiology***, Fourth Edition. CRC Press. Pp. 102-103, 111-112.
- Rocha-dos-Santos-Mathias, T., Moretzsohn-de-Mello, P. P. y Camporese-Sérvulo, E.F. (2014). Solid wastes in brewing process: A review, ***Journal of Brewing and Distilling***, **5** (1):1-9.
- Romero, R. y Mestres, J. (2004). ***Productos lácteos. Tecnología***. Universidad Politécnica de Catalunya, España. P. 98.
- Ross, P. R., Morgan, S., Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. ***International Journal Food Microbiology***, **70**:3-16.
- Salgado-Albarrán, M. (2014). Análisis de hordeínas en semillas y malta de diferentes variedades de cebada. ***Tesis Profesional***. UNAM, Facultad de Química, México, D.F. México.
- Sánchez-Miguel, A. (2011). Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. ***Tesis Profesional***. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca, México.

- SE. (2015). Secretaría de Economía. Industria de la cerveza en México. Disponible en: <http://www.gob.mx/se/articulos/industria-de-la-cerveza-en-mexico> (Último acceso 19 de agosto de 2016).
- Serna-Cock, L., Rodríguez-de-Stouvenel, A. (2005). PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁCTICO: ESTADO DEL ARTE. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **5**(1):54-65.
- Serna-Saldívar, S. (1996). *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*. Depto. Tecnología de Alimentos ITESM- Campus Monterrey, México. Pp. 34-45, 307-333.
- SIAP. (2016). Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Último acceso: 19 de agosto de 2016).
- Sreenath, K. H., Moldes, B. A., Koegel, G. R., Straub, J. R. (2001). Lactic acid production from agriculture residues. *Biotechnology Letters*, **23**:179-184.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, **2**(3):472-499.
- Thoha, T. B., Izuka, H. E., Sikirat, M. O., Toyin, A. M., Omobowale, A. K., Oluwabunmi, O. y Olowadun, A. (2012). Enumeration of microorganism in dried cassava power (Garri); a comparative study of four methods. *New York Science Journal*, **5**(1):140-144.
- Tortora, J. G., Funke, R. B., Case, L. C. (2007). *Introducción a la microbiología*. 9a edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires, Argentina. Pp. 125-137.
- Wikipedia. (2016). Mezcla racémica. En Wikipedia. Disponible en https://es.wikipedia.org/wiki/Mezcla_rac%C3%A9mica (Último acceso: 17 de octubre de 2016).

ANEXOS

ANEXO 1

A1. DETERMINACIÓN DE GLÚCIDOS REDUCTORES (Miller-Lorenz, 1957)

FUNDAMENTO: El procedimiento se basa en una reacción redox, que ocurre entre el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), para calcular la concentración de glúcidos reductores.

Reactivos.

- ✓ Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)
- ✓ Tartrato sodio-potasio
- ✓ NaOH 10%

Preparación de reactivo (DNS)

Mezclar 80mL de NaOH al 10% con 150 mL de agua destilada. Agregar 150 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado. Calentar a 50°C y agitar constantemente. Agregar 5 g de DNS y agitar constantemente a 50°C. Enfriar a temperatura ambiente y filtrar. Aforar a 500 mL. Guardarlo en frasco ámbar en lugar fresco y seco.

Procedimiento

1. Tomar 1mL de la solución acuosa de la muestra. Adicionar 1 mL del reactivo de DNS.
2. En un baño de agua hirviente, calentar durante 5 minutos y dejar enfriar.
3. Diluir con 10 mL de agua destilada.
4. Leer la absorbancia del color producido a 540 nm frente a un blanco de reactivos y agua tratada igual que la muestra.
5. Cuantificar los glúcidos reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar preparada con el carbohidrato reductor de interés en concentraciones de 0.2 – 2.0 mg/mL.

ANEXO 2

A2. CURVA PATRÓN DE GLUCOSA

Curva patrón empleada, para determinar la cantidad de glúcidos reductores (específicamente glucosa), durante la hidrólisis enzimática.

Tabla A2. Información sobre la concentración y absorbancia de la curva patrón de glucosa, para DNS

Concentración (mg/mL)	Promedio (n=3) (λ) nm
0	0.000
0.4	0.216
0.6	0.366
0.8	0.434
1	0.566
1.2	0.660
1.4	0.714
1.6	0.852
1.8	0.964
2	1.043
2.2	1.133
2.4	1.236
2.6	1.318
2.8	1.410

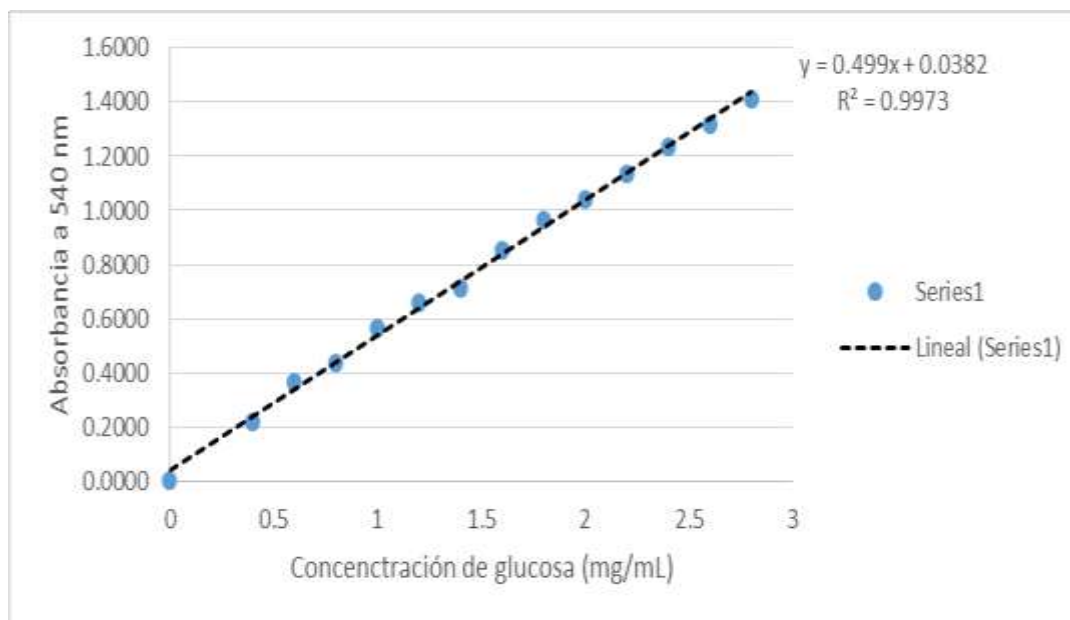


Figura A2. Curva patrón de glucosa

ANEXO 3

A3. CARACTERÍSTICAS DEL MEDIO DE CULTIVO CALDO MRS

Tabla A3.1. Medio de cultivo (Sigma-Aldrich, 2016)

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
Tel. (800) 521-8956 (314) 771-5755 Fax. (800) 325-5052 (314) 771-5757
email: techservice@sigmaaldrich.com sigmaaldrich.com

Product Information

69966 MRS Broth (Lactobacillus Broth acc. to De Man, Rogosa and Sharpe)

For the enrichment, cultivation and isolation of all species of *Lactobacillus* from all types of material according to DeMan, Rogosa and Sharpe.

Composition:

Ingredients	Grams/Litre
Peptone	10.0
Meat extract	8.0
Yeast extract	4.0
D(+)-Glucose	20.0
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Sodium acetate trihydrate	5.0
Triammonium citrate	2.0
Magnesium sulfate heptahydrate	0.2
Manganous sulfate tetrahydrate	0.05
Final pH 6.2 +/- 0.2 at 25°C	

Store prepared media below 8°C, protected from direct light. Store dehydrated powder, in a dry place, in tightly-sealed containers at 2-25°C.

Directions :

Dissolve 51 g in 1 litre distilled water and add 1 ml Tween 80 (Cat. No. P8074). Boil to dissolve the medium completely. Fill into containers and sterilize by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

Incubate the culture up to 3 days at 35°C or up to 5 days at 30°C. If possible, incubate the culture in a CO₂ enriched atmosphere in an anaerobic jar.

Principle and Interpretation:

The MRS media formulation was developed by de Man, Rogosa and Sharpe to replace the tomato juice medium and the meat extract tomato juice medium. It is a medium supporting good growth of lactobacilli in general, even those strains which have shown poor growth in existing media, like strains of *L. brevis* and *L. fermenti*. The MRS culture media contain polysorbate (Tween 80), acetate, magnesium and manganese which are known to act as special growth factors for lactobacilli as well as a rich nutrient base. As these media show a very low degree of selectivity *Pediococcus* and *Leuconostoc* species as well as other secondary bacteria may grow on them. Most of the accompanying microflora can be inhibited by thallium acetate (Cat. No. T8266), sorbic acid (Cat. No. S1626), acetic acid (Cat. No. 33209), sodium nitrite (Cat. No. S2252), cycloheximide (Cat. No. 01810) and polymyxin (Cat. No. P4932). These substances can be used at varying concentrations and combinations, but inevitably a compromise has to be reached between selectivity and productivity of the organism sought.

Cultural characteristics:

Organisms (ATCC)	Growth
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (4356)	++
<i>Lactobacillus fermentum</i> (9338)	++
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (11863)	++ (anaerobic)
<i>Escherichia coli</i> (25922)	-/+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	none to poor

Tabla A3.1. Medio de cultivo (Sigma-Aldrich, 2016) Continuación

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8950 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-3032 (314) 771-5757
email: technical@sigma-aldrich.com sigma-aldrich.com

Product Information

References:

1. J.C. de Man, M. Rogosa and M. Elisabeth Sharpe, *Appl. Bact.* 23. 130-135 (1960)
2. M. Briggs, *J. Dairy Res.* 20. 36-40 (1953)
3. G. Reuter, *Intern. J. Food Microbiol.* 2. 55-68 (1985)
4. ISO/TC 34/SC 6/WG 15, No.3 and 5, Enumeration of Lactobacteriaceae in meat and meat products (1984)
5. Lankaputhra W.E.V., Shah N.P. and Britz M.L. *Food Australia* 48. 113-118 (1996)
6. W. Hummel, et al., *Biocatalysis* 2, 293 (1989)
7. L.C. Laleye, et al., Involvement of heterofermentative lactobacilli in development of open texture in cheese, *J. Food Prot.* 50, 1009 (1987)
8. P. Laloi, et al., Cell-wall-associated proteinase of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 196 (1991)

Sigma-Aldrich. (2016). Disponible en <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/69966?lang=es®ion=MX> (Último acceso el 17 de octubre de 2016)

ANEXO 4

A4. DETERMINACIÓN DE CELULAS VIABLES (Metodología Miles y Misra, 1938)

FUNDAMENTO: Es un método de recuento de células viables, ya que cualquier célula viable inoculada en un medio de cultivo, se multiplica y procede su fácil identificación como la formación de colonias en placa de agar. La realización de esta metodología consiste en la preparación de una serie de diluciones, efectuando la medición exacta del volumen del diluyente y de la muestra. Se deben agitar y mezclar correctamente todas las suspensiones microbianas. La metodología de Miles y Misra (1938) consiste en colocar un volumen determinado (gotas) de la muestra diluida sobre las placas de agar con superficie seca. Después de que las gotas son totalmente absorbidas por el agar, se invierten las placas y se incuban. Después de la incubación se seleccionan las áreas donde se tuvo un número de colonias menores a 40 (ideal 10-20).

Material

- ❖ Micropipeta (10-100 μ L)
- ❖ Puntas estériles
- ❖ 2 o más cajas de Petri con medio MRS (**ANEXO 3**)
- ❖ Serie de diluciones

Procedimiento (condiciones de asepsia)

1. Dividir con un marcador las cajas en la parte externa inferior en los sectores dependiendo de las diluciones realizadas.
2. Marcar cada segmento con el factor de dilución realizada en la serie.
3. Con la micropipeta tomar una muestra de 20 μ L de la dilución, levantar la tapa de la caja de Petri, colocar la pipeta en posición vertical y a una altura aproximada de 2 cm sobre la superficie del medio de cultivo y dejar caer el volumen en el centro.

4. Repetir el paso anterior con otra punta estéril y con otra dilución; hasta terminar la serie de diluciones.
5. Dejar que las gotas se absorban en el medio MRS, invertir las cajas y dejar incubar a condiciones de 37°C por 24 horas.
6. Contar los sectores que presenten entre 20 y 30 colonias y proceder a la cuantificación de las mismas.
7. Calcular el número de bacterias/mL o de g e muestra con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de bacterias por mL} = \frac{N * f}{V}$$

en donde

N= número promedio de colonias

f=inverso del factor de dilución

V=volumen de inóculo

La metodología está fundamentada en el **Manual de Prácticas de Microbiología General (2010)** con un cambio en el volumen de inóculo, hecho con base a lo mencionado Milles y Misra (1938) y también por lo mencionado en una presentación encontrada en redes internacionales y recuperada el día 20 de junio de 2016; 15:40 horas: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf

ANEXO 5

A5. INFORMACIÓN DE LOS AJUSTES DE (MASA-VOLUMEN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA) PARA LA REALIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Tabla A5.1. Información sobre la masa de las muestras y el volumen de solución amortiguadora así como el volumen de enzima (con ajustes); para realizar la hidrólisis enzimática, relación (2:100)

Tratamiento	Relación	Masa muestra de malta usada (g)	Volumen se solución amortiguadora (mL)	Enzimas Vol. enzimas con ajuste a 150 µL
NO DRÁSTICO	2:100	0.6198	31	46.5
NO DRÁSTICO	2:100	0.6141	31	46.5
DRÁSTICO	2:100	0.6217	31.1	49.5
DRÁSTICO	2:100	0.6582	33	49.5
SIN TRATAMIENTO	2:100	2.0164	100	150
SIN TRATAMIENTO	2:100	2.0014	100	150
Tratamiento	Relación	Masa muestra de malta usada (g)	Volumen se solución amortiguadora (mL)	Enzimas Vol. enzimas con ajuste a 300 µL
NO DRÁSTICO	2:100	0.6184	31	93
NO DRÁSTICO	2:100	0.6137	31	93
DRÁSTICO	2:100	0.6432	32.1	99
DRÁSTICO	2:100	0.6625	33.1	99
SIN TRATAMIENTO	2:100	2.0014	100	300
SIN TRATAMIENTO	2:100	2.0137	100	300
Tratamiento	Relación	Masa muestra de malta usada (g)	Volumen se solución amortiguadora (mL)	Enzimas Vol. enzimas con ajuste a 450 µL
NO DRÁSTICO	2:100	0.616	30.8	139.5
NO DRÁSTICO	2:100	0.617	39	139.5
DRÁSTICO	2:100	0.6693	33.5	148.5
DRÁSTICO	2:100	0.6616	33.1	148.5
SIN TRATAMIENTO	2:100	1.0431	52.2	225
SIN TRATAMIENTO	2:100	1.0467	52.3	225

Tabla A5.2. Información sobre la masa de las muestras y volumen de solución amortiguadora y volumen de enzima (con ajustes); para realizar hidrólisis enzimática, relación (5:100)

Tratamiento	Relación	Masa muestra de malta usada (g)	Volumen se solución amortiguadora (mL)	Enzimas Vol. enzimas con ajuste a 150 µL
NO DRÁSTICO	5:100	0.6109	12.218	18.327
NO DRÁSTICO	5:100	0.614	12.28	18.42
DRÁSTICO	5:100	0.6024	12.048	18.072
DRÁSTICO	5:100	0.6077	12.154	18.231
SIN TRATAMIENTO	5:100	1.0044	20.088	30.132
SIN TRATAMIENTO	5:100	1.0084	20.168	30.252
Tratamiento	Relación	Masa muestra de malta usada (g)	Volumen se solución amortiguadora (mL)	Enzimas Vol. enzimas con ajuste a 300 µL
NO DRÁSTICO	5:100	1.0475	20.95	62.85
NO DRÁSTICO	5:100	1.0336	20.672	62.016
DRÁSTICO	5:100	1.0162	20.324	60.972
DRÁSTICO	5:100	0.6021	12.042	36.126
SIN TRATAMIENTO	5:100	1.0042	20.084	60.652
SIN TRATAMIENTO	5:100	1.0314	20.628	61.884
Tratamiento	Relación	Masa muestra de malta usada (g)	Volumen se solución amortiguadora (mL)	Enzimas Vol. enzimas con ajuste a 450 µL
NO DRÁSTICO	5:100	1.0023	20.046	90.207
NO DRÁSTICO	5:100	1.0097	20.194	90.873
DRÁSTICO	5:100	1.0055	20.11	90.495
DRÁSTICO	5:100	1.0028	20.056	90.252
SIN TRATAMIENTO	5:100	1.0972	21.944	98.748
SIN TRATAMIENTO	5:100	1.0389	20.778	93.501

ANEXO 6

A6. PROMEDIO DE LA CUANTIFICACIÓN DE GLÚCIDOS REDUCTORES (GLUCOSA)

Tabla A6.1. Información de los promedios de duplicados de la cuantificación de glúcidos reductores (glucosa) de las muestras con tratamiento NO DRÁSTICO, relación 2:100 obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática

Tratamiento	Relación	Volumen de enzima (µL)	Tiempo (horas)	mg de glucosa/g de residuo de malta inicial
NO DRÁSTICO	(2:100)	150	0	-0.130
NO DRÁSTICO	(2:100)	150	9	0.861
NO DRÁSTICO	(2:100)	150	18	1.548
NO DRÁSTICO	(2:100)	150	27	2.149
NO DRÁSTICO	(2:100)	150	36	2.440
NO DRÁSTICO	(2:100)	300	0	-0.170
NO DRÁSTICO	(2:100)	300	9	1.155
NO DRÁSTICO	(2:100)	300	18	2.575
NO DRÁSTICO	(2:100)	300	27	2.890
NO DRÁSTICO	(2:100)	300	36	4.210
NO DRÁSTICO	(2:100)	450	0	-0.116
NO DRÁSTICO	(2:100)	450	9	1.329
NO DRÁSTICO	(2:100)	450	18	2.350
NO DRÁSTICO	(2:100)	450	27	3.210
NO DRÁSTICO	(2:100)	450	36	3.313

Tabla A6.2. Información de los promedios de duplicados de la cuantificación de glúcidos reductores (glucosa) de las muestras con tratamiento NO DRÁSTICO, relación 5:100 obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática

Tratamiento	Relación	Volumen de enzima (µL)	Tiempo (horas)	mg de glucosa/g de residuo de malta inicial
NO DRÁSTICO	(5:100)	150	0	-0.046
NO DRÁSTICO	(5:100)	150	9	0.390
NO DRÁSTICO	(5:100)	150	18	0.604
NO DRÁSTICO	(5:100)	150	27	0.876
NO DRÁSTICO	(5:100)	150	36	1.043
NO DRÁSTICO	(5:100)	300	0	0.009
NO DRÁSTICO	(5:100)	300	9	1.213

Tabla A6.2. Información de los promedios de duplicados de la cuantificación de glúcidos reductores (glucosa) de las muestras con tratamiento NO DRÁSTICO, relación 5:100 obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática (continuación)

Tratamiento	Relación	Volumen de enzima (µL)	Tiempo (horas)	mg de glucosa/g de residuo de malta inicial
NO DRÁSTICO	(5:100)	300	18	1.823
NO DRÁSTICO	(5:100)	300	27	2.229
NO DRÁSTICO	(5:100)	300	36	2.112
NO DRÁSTICO	(5:100)	450	0	0.281
NO DRÁSTICO	(5:100)	450	9	0.951
NO DRÁSTICO	(5:100)	450	18	1.304
NO DRÁSTICO	(5:100)	450	27	1.675
NO DRÁSTICO	(5:100)	450	36	1.784

Tabla A6.3. Información de los promedios de duplicados de la cuantificación de glúcidos reductores (glucosa) de las muestras con tratamiento DRÁSTICO, relación 2:100 obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática

Tratamiento	Relación	Volumen de enzima (µL)	Tiempo (horas)	mg de glucosa/g de residuo de malta inicial
DRÁSTICO	(2:100)	150	0	-0.125
DRÁSTICO	(2:100)	150	9	1.259
DRÁSTICO	(2:100)	150	18	1.176
DRÁSTICO	(2:100)	150	27	1.969
DRÁSTICO	(2:100)	150	36	2.664
DRÁSTICO	(2:100)	300	0	-0.061
DRÁSTICO	(2:100)	300	9	1.005
DRÁSTICO	(2:100)	300	18	1.812
DRÁSTICO	(2:100)	300	27	2.107
DRÁSTICO	(2:100)	300	36	2.651
DRÁSTICO	(2:100)	450	0	-0.091
DRÁSTICO	(2:100)	450	9	1.084
DRÁSTICO	(2:100)	450	18	1.816
DRÁSTICO	(2:100)	450	27	2.539
DRÁSTICO	(2:100)	450	36	1.980

Tabla A6.4. Información de los promedios de duplicados la cuantificación de glúcidos reductores (glucosa) de las muestras con tratamiento DRÁSTICO relación 5:100 obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática

Tratamiento	Relación	Volumen de enzima (µL)	Tiempo (horas)	mg de glucosa/g de residuo de malta inicial
DRÁSTICO	(5:100)	150	0	-0.055
DRÁSTICO	(5:100)	150	9	0.361
DRÁSTICO	(5:100)	150	18	0.456
DRÁSTICO	(5:100)	150	27	1.031
DRÁSTICO	(5:100)	150	36	1.181
DRÁSTICO	(5:100)	300	0	-0.047
DRÁSTICO	(5:100)	300	9	0.374
DRÁSTICO	(5:100)	300	18	0.560
DRÁSTICO	(5:100)	300	27	1.097
DRÁSTICO	(5:100)	300	36	1.565
DRÁSTICO	(5:100)	450	0	0.167
DRÁSTICO	(5:100)	450	9	0.745
DRÁSTICO	(5:100)	450	18	1.039
DRÁSTICO	(5:100)	450	27	1.495
DRÁSTICO	(5:100)	450	36	1.409

Tabla A6.5. Información de los promedios de duplicados de la cuantificación de glúcidos reductores (glucosa) de las muestras SIN TRATAMIENTO relación 5:100 obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática

Tratamiento	Relación	Volumen de enzima (µL)	Tiempo (horas)	mg de glucosa/g de residuo de malta inicial
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	150	0	45.336
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	150	9	108.347
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	150	18	111.704
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	150	27	120.460
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	150	36	128.063
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	300	0	5.945
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	300	9	96.725
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	300	18	110.458
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	300	27	110.098
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	300	36	116.691
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	450	0	44.277
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	450	9	102.428
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	450	18	121.912

Tabla A6.5. Información de los promedios de duplicados de la cuantificación de glúcidos reductores (glucosa) de las muestras SIN TRATAMIENTO relación 5:100 obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática (continuación)

Tratamiento	Relación	Volumen de enzima (μL)	Tiempo (horas)	mg de glucosa/g de residuo de malta inicial
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	450	27	121.147
SIN TRATAMIENTO	(2:100)	450	36	130.928

Tabla A6.6. Información de los promedios de duplicados de la cuantificación de glúcidos reductores (glucosa) de las muestras SIN TRATAMIENTO relación 5:100 obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática, los resultados se reportan en mg de glucosa/g de malta inicial.

Tratamiento	Relación	Volumen de enzima (μL)	Tiempo (horas)	mg de glucosa/g de residuo de malta inicial
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	150	0	5.854
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	150	9	87.858
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	150	18	96.031
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	150	27	96.927
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	150	36	100.243
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	300	0	2.088
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	300	9	94.092
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	300	18	96.921
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	300	27	104.410
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	300	36	103.888
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	450	0	31.267
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	450	9	94.816
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	450	18	101.367
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	450	27	106.711
SIN TRATAMIENTO	(5:100)	450	36	110.666

ANEXO 7

A7. IMÁGENES DE LOS CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO (CLAR)

Se presentan imágenes de los cromatogramas de la determinación de ácido láctico mediante CLAR información proporcionada por la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, USAII, de la Facultad de Química, UNAM.

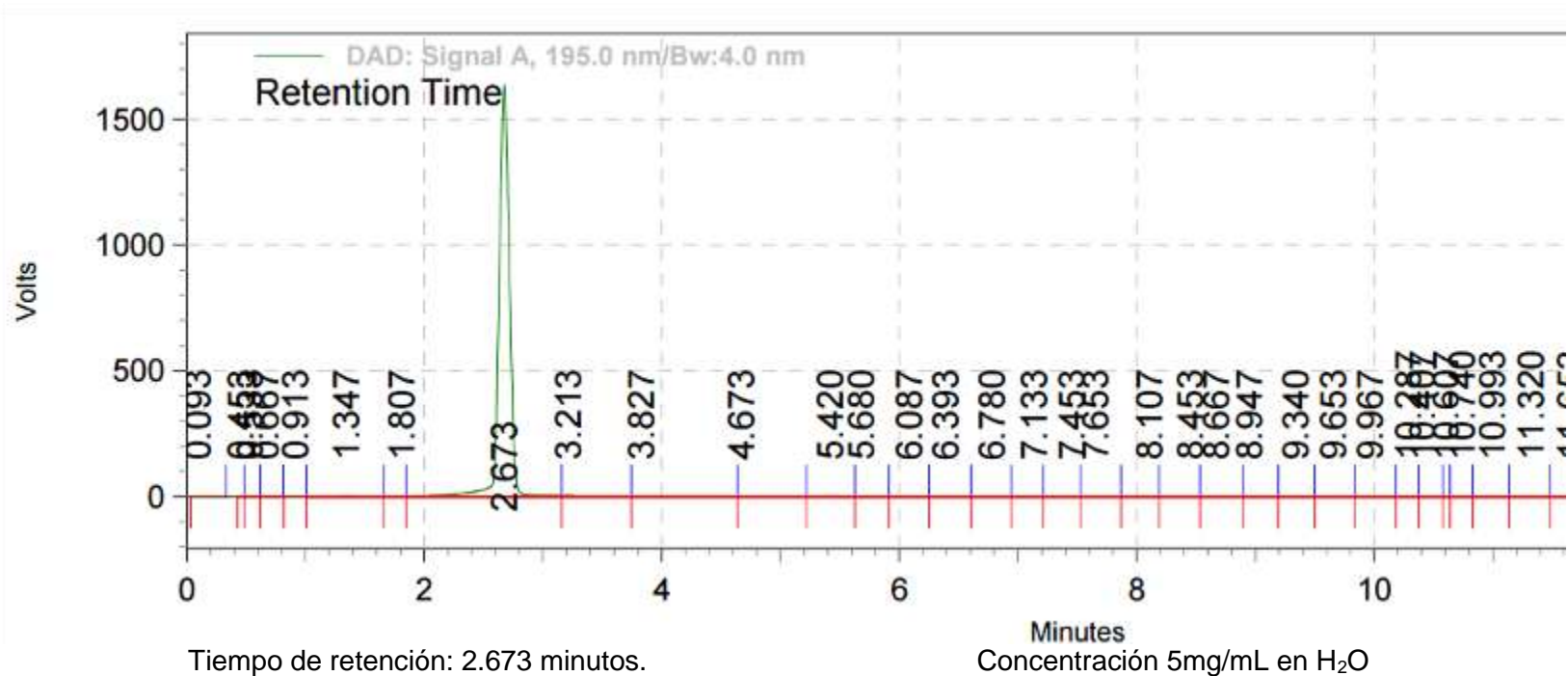
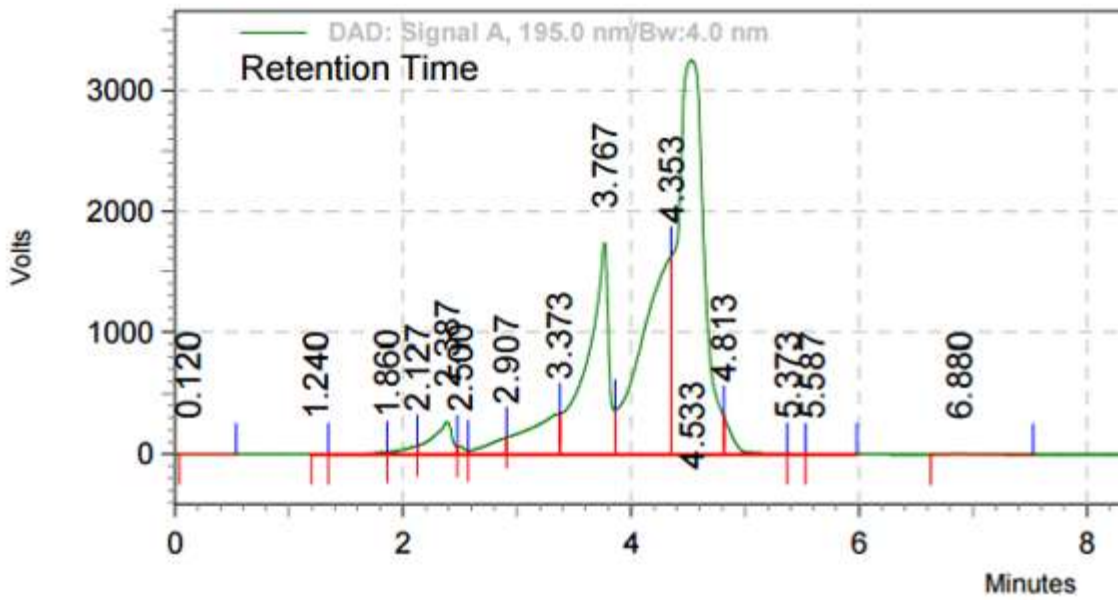
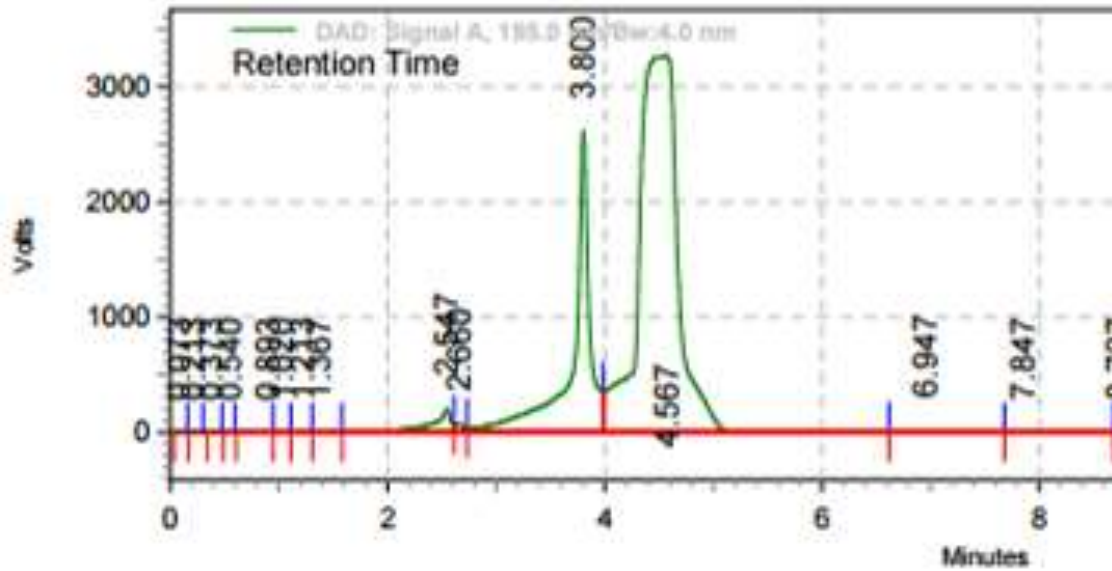


Figura A7.1. Cromatograma del estándar del ácido láctico (SIGMA-ALDRICH)



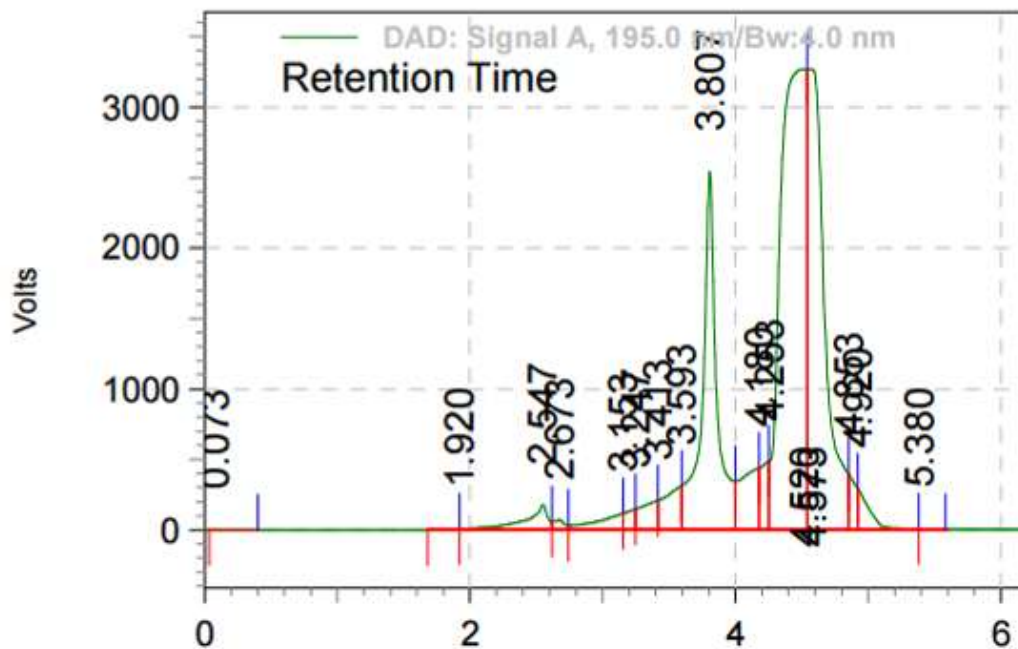
Tiempo de retención: 2.500 minutos

Figura A7.2. Cromatograma de la muestra de Tratamiento NO DRÁSTICO, (2:100) 150 µL enzimas



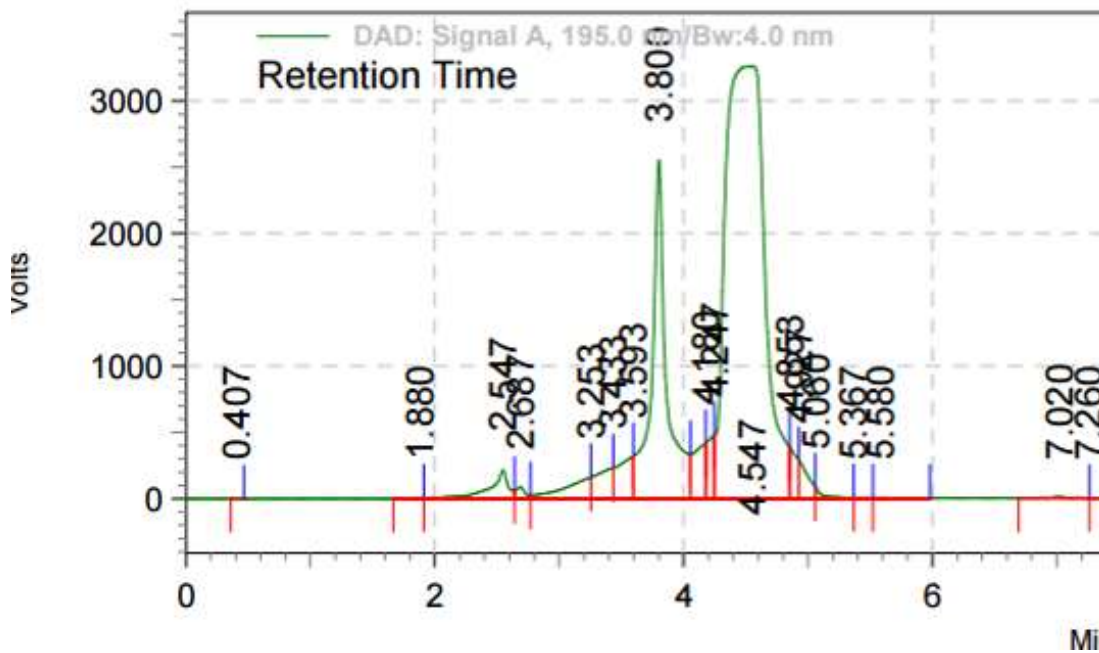
Tiempo de retención: 2.660 minutos

Figura A7.3. Cromatograma de la muestra de Tratamiento NO DRÁSTICO, (2:100) 300 µL enzimas



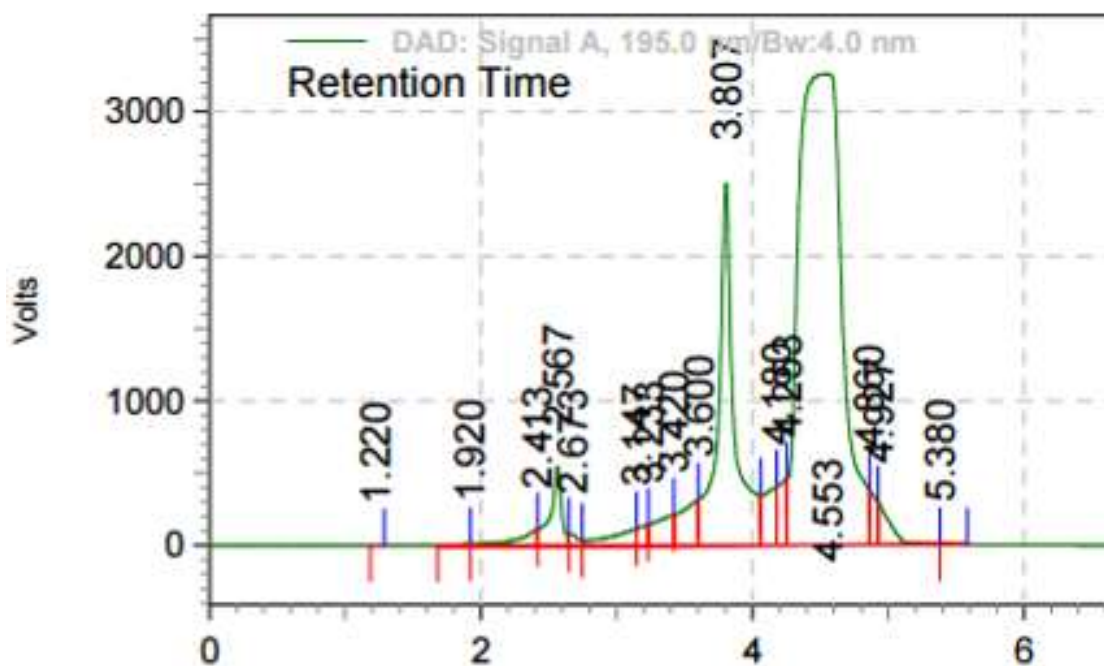
Tiempo de retención: 2.673 minutos

Figura A7.4. Cromatograma de la muestra de Tratamiento NO DRÁSTICO, (2:100) 450 μ L enzimas



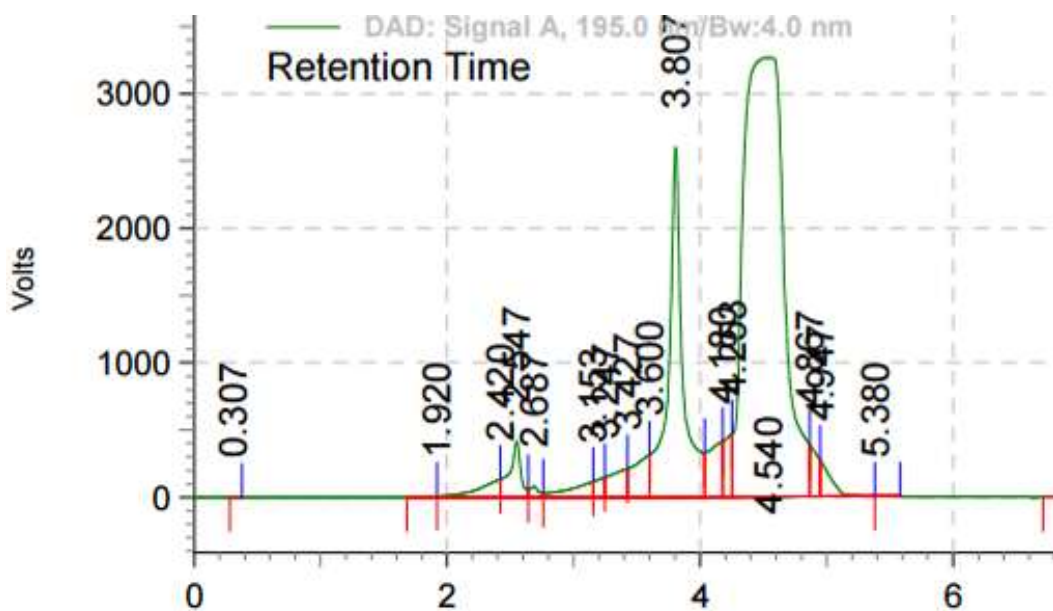
Tiempo de retención: 2.687 minutos

Figura A7.5. Cromatograma de la muestra de Tratamiento NO DRÁSTICO, (5:100) 150 μ L enzimas



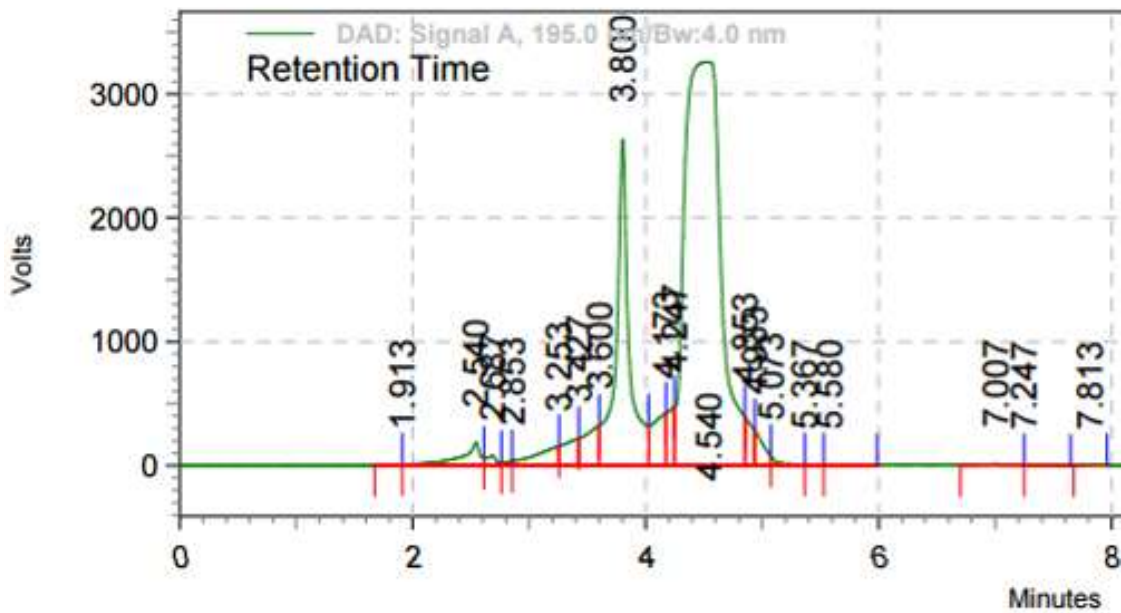
Tiempo de retención: 2.673 minutos

Figura A7.6. Cromatograma de la muestra de Tratamiento NO DRÁSTICO, (5:100) 300 µL enzimas



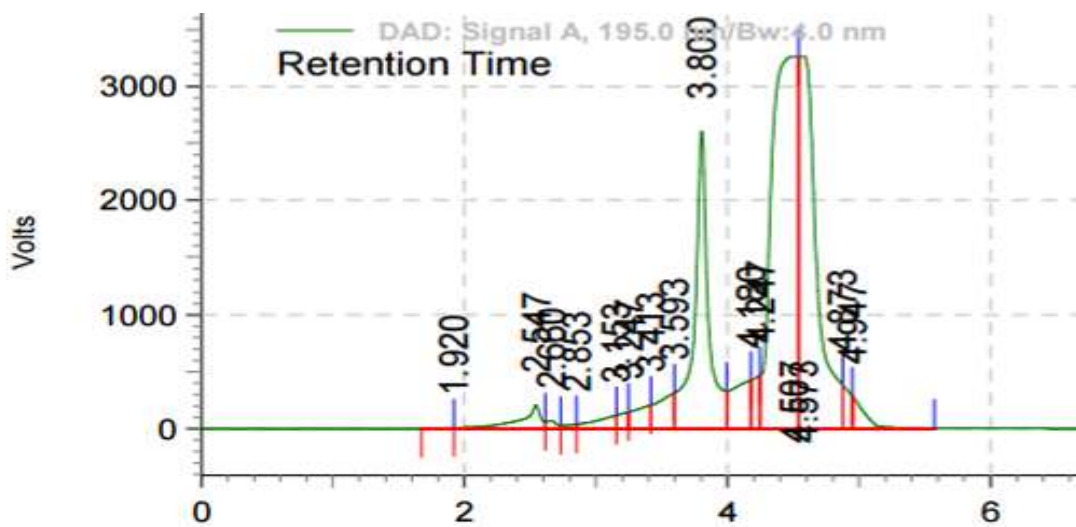
Tiempo de retención: 2.687 minutos

Figura A7.7. Cromatograma de la muestra de Tratamiento NO DRÁSTICO, (5:100) 450 µL enzimas



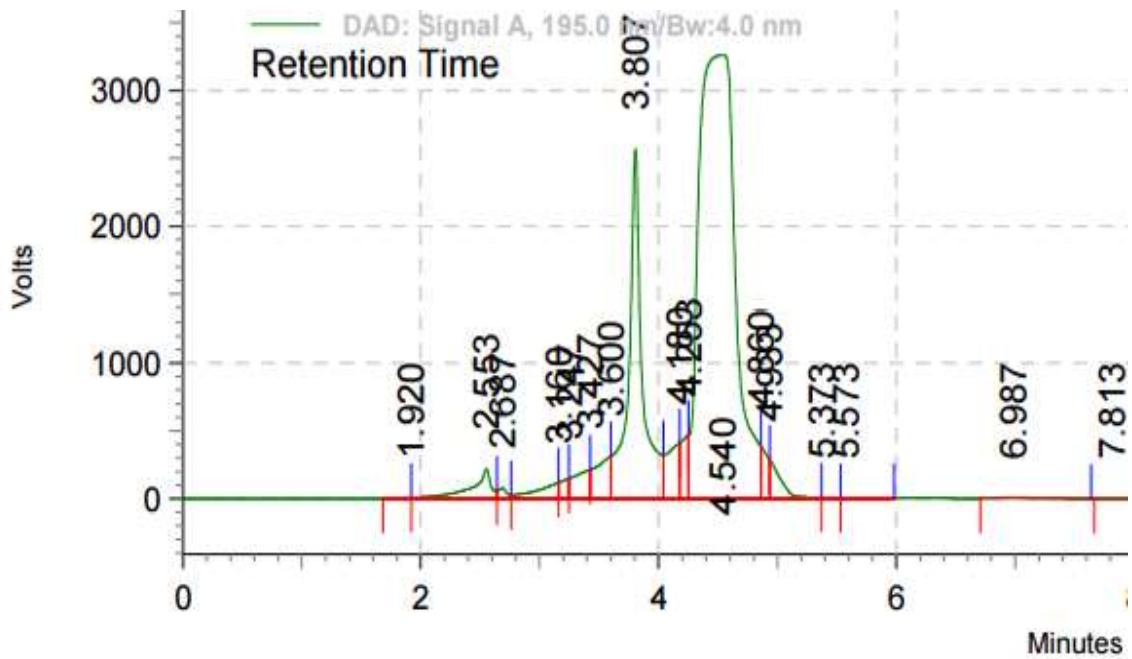
Tiempo de retención: 2.687 minutos

Figura A7.8. Cromatograma de la muestra de Tratamiento DRÁSTICO, (2:100) 150 µL enzimas



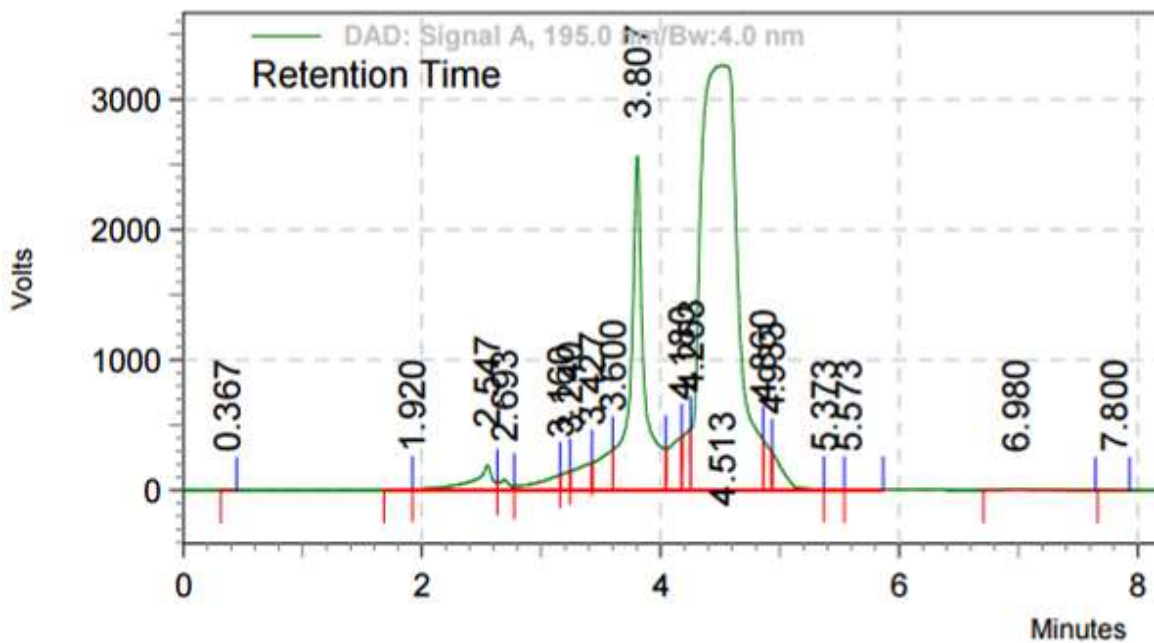
Tiempo de retención: 2.660 minutos

Figura A7.9. Cromatograma de la muestra de Tratamiento DRÁSTICO, (2:100) 300 µL enzimas



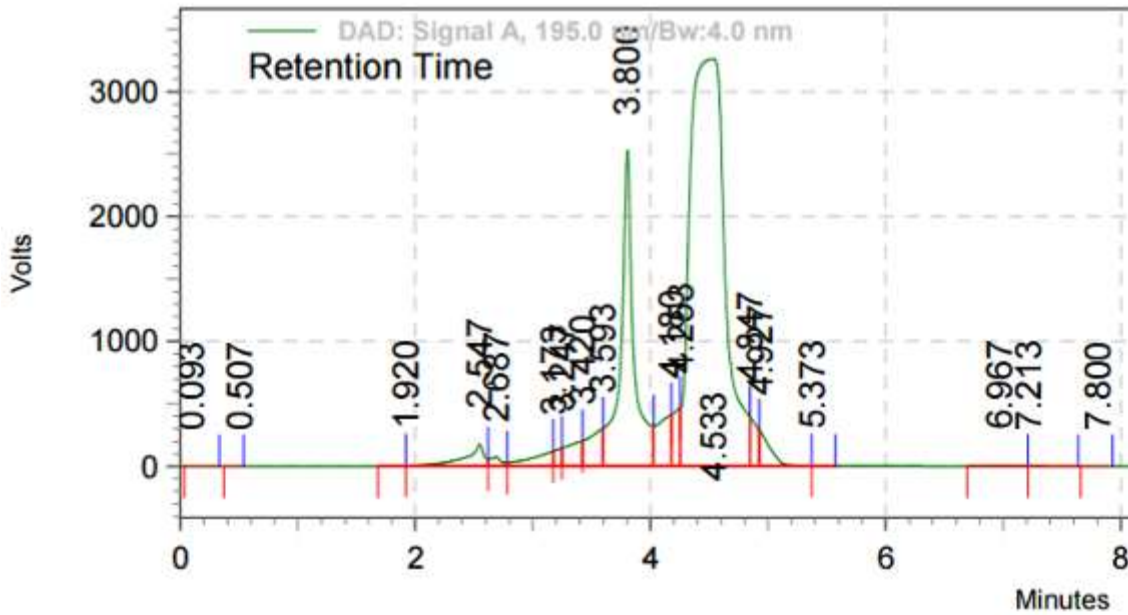
Tiempo de retención: 2.687 minutos

Figura A7.10. Cromatograma de la muestra de Tratamiento DRÁSTICO, (2:100) 450 µL enzimas



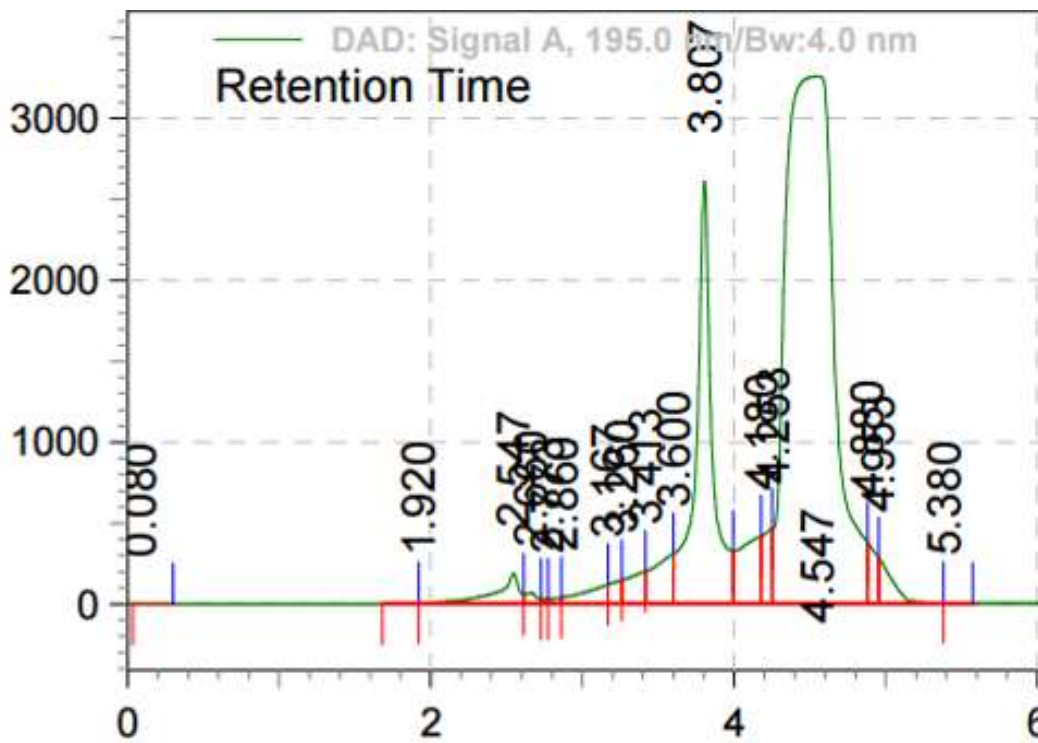
Tiempo de retención: 2.693 minutos

Figura A7.11. Cromatograma de la muestra de Tratamiento DRÁSTICO, (5:100) 450 µL enzimas



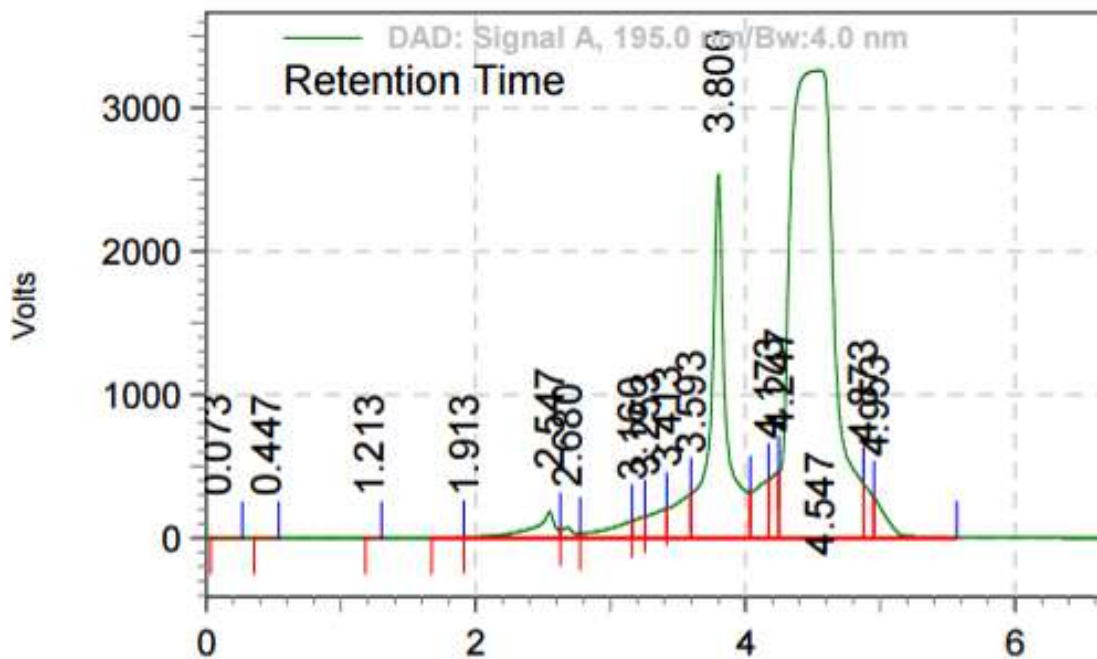
Tiempo de retención: 2.687 minutos

Figura A7.12. Cromatograma de la muestra SIN TRATAMIENTO, (2:100) 150 μ L enzimas



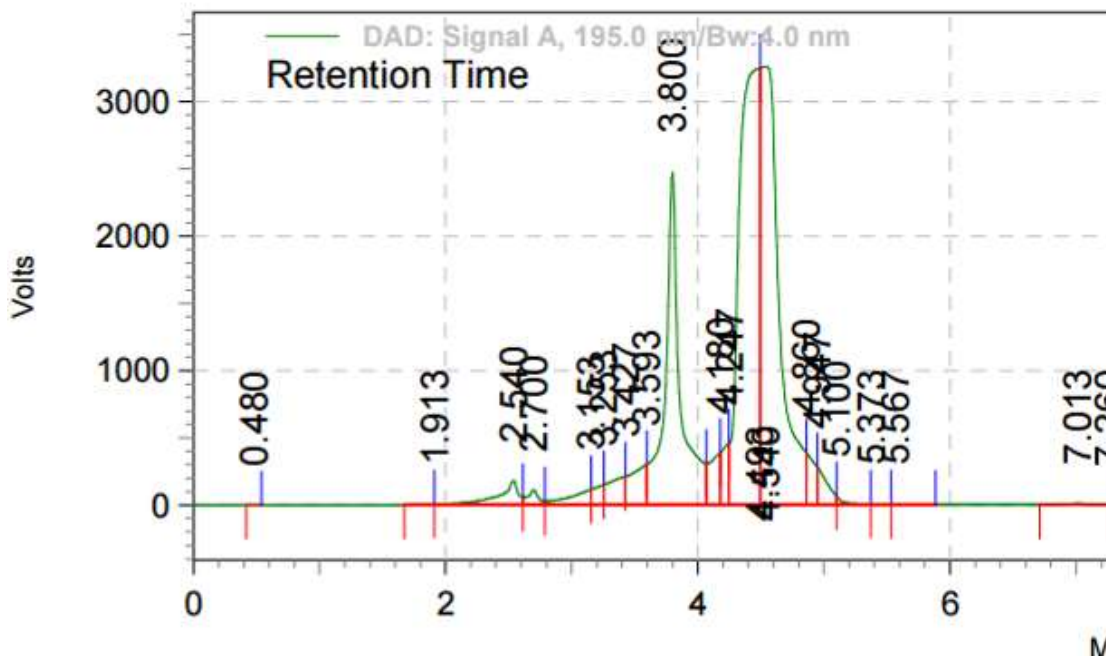
Tiempo de retención: 2.660 minutos

Figura A7.13. Cromatograma de la muestra SIN TRATAMIENTO, (2:100) 300 μ L enzimas



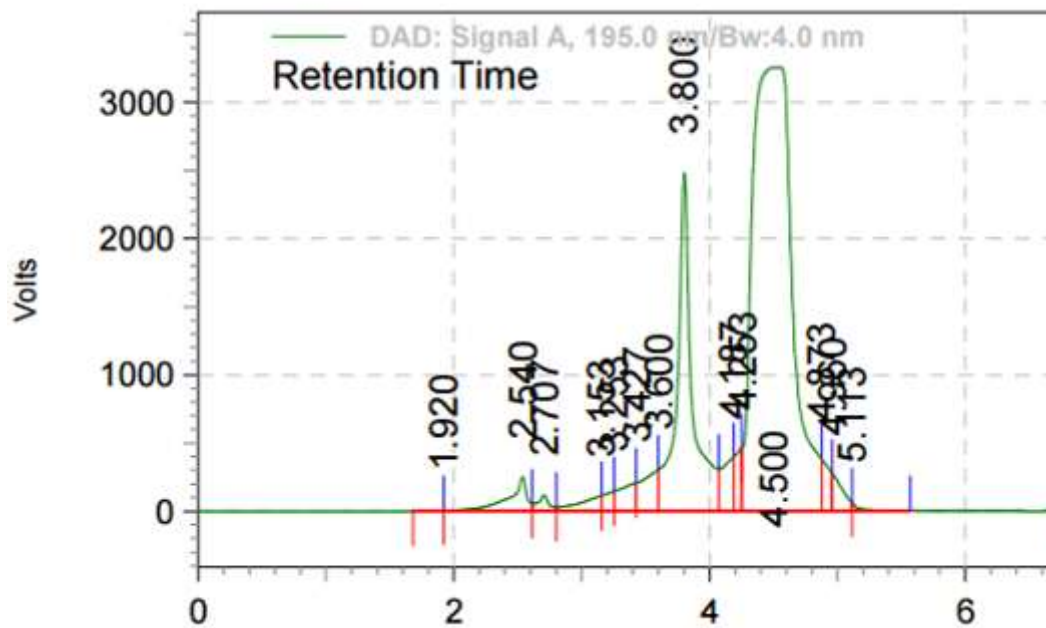
Tiempo de retención: 2.680 minutos

Figura A7.14. Cromatograma de la muestra SIN TRATAMIENTO, (2:100) 450 μ L enzimas



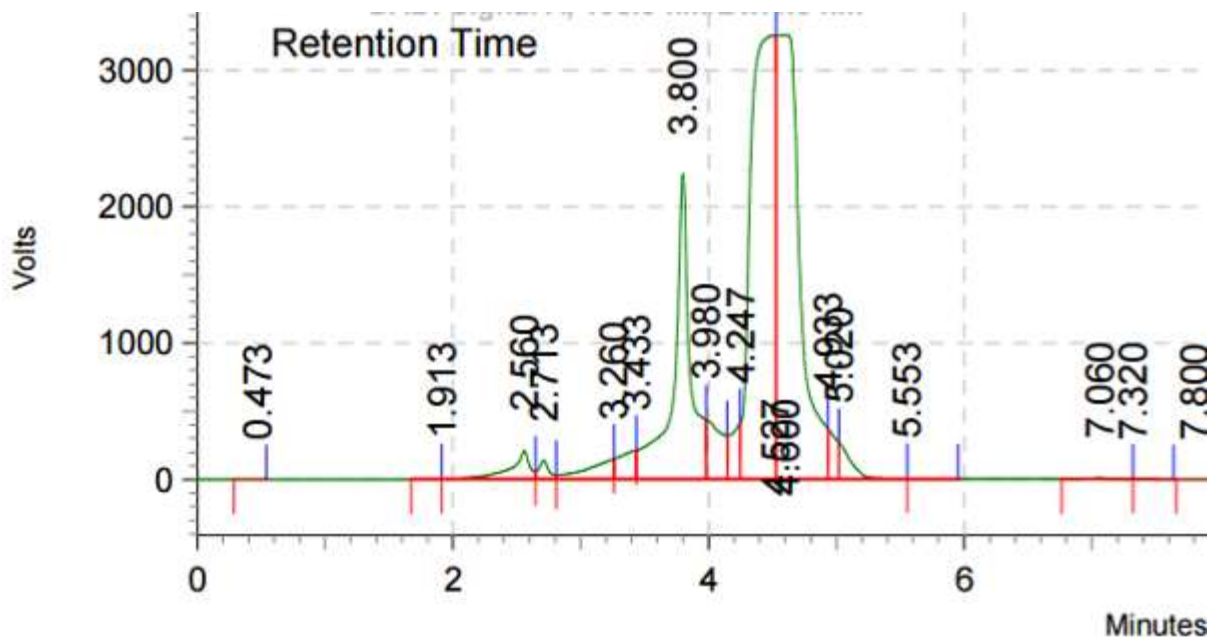
Tiempo de retención: 2.700 minutos

Figura A7.15. Cromatograma de la muestra SIN TRATAMIENTO, (5:100) 150 μ L enzimas



Tiempo de retención: 2.707 minutos

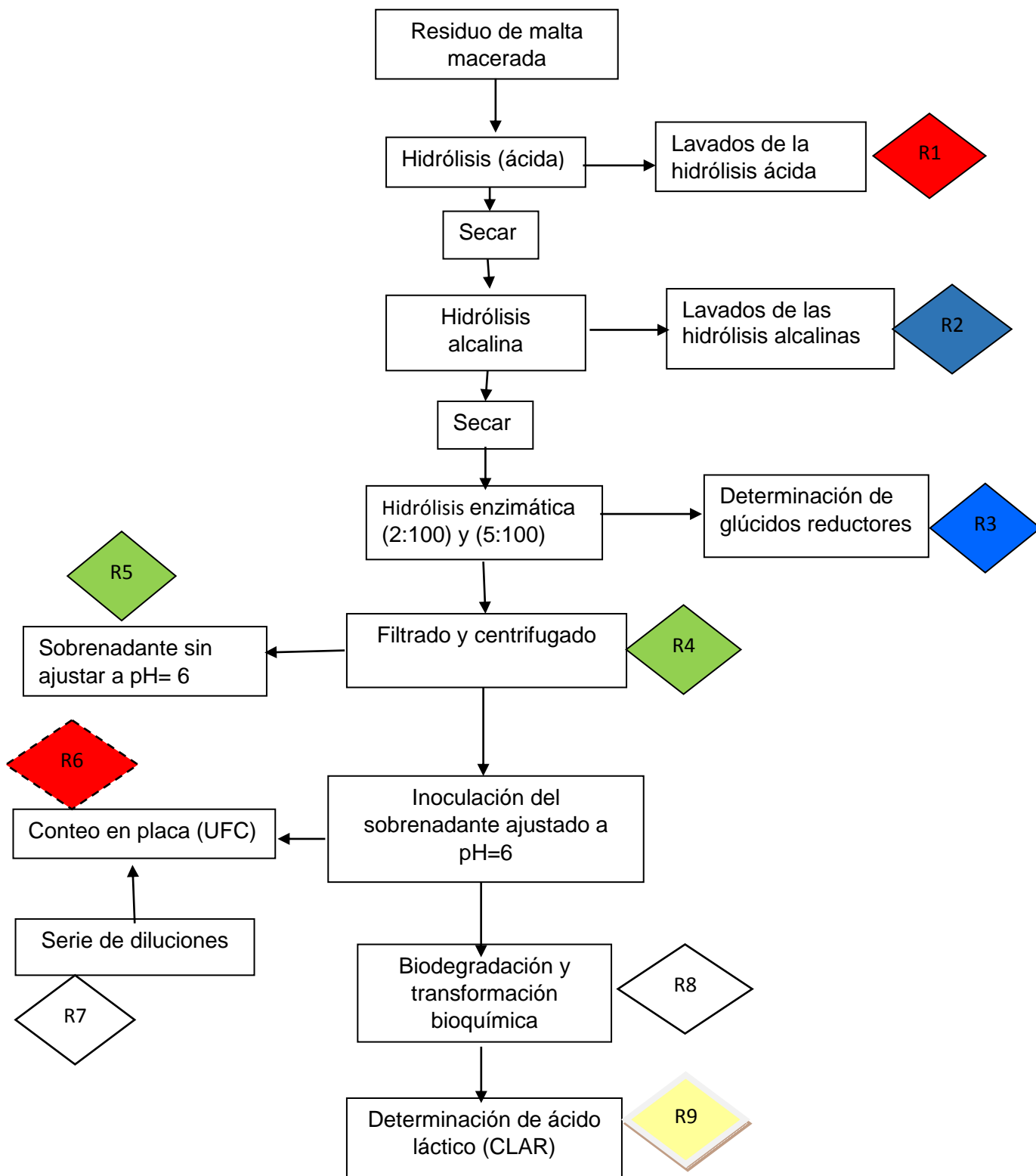
Figura A7.16. Cromatograma de la muestra SIN TRATAMIENTO, (5:100) 300 μ L enzimas



Tiempo de retención: 2.713 minutos

Figura A7.17. Cromatograma de la muestra SIN TRATAMIENTO, (5:100) 450 μ L enzimas

ANEXO 8
A8. DIAGRAMA ECOLÓGICO



R1 y R2: H₂SO₄ y NaOH se neutralizan el agua de los lavados y se desecha en la tarja.

R3: 3,5 dinitrosalicílico, tartrato Na-K, NaOH. Se almacena en un recipiente de plástico etiquetando con la información solicitada y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).

R4: Residuo de malta obtenida después de filtrar, papel filtro. Son residuos sólidos orgánicos no peligrosos. La malta se envían a disposición para producir composta y el papel se dispone de forma adecuada en la basura orgánica.

R5. Solución amortiguadora de citratos pH=4.8, glúcidos. Se neutraliza y se desecha en la tarja.

R6: Cajas de Petri de plástico con agar MRS y bacterias *Lactobacillus casei* sp. Se almacenan en una bolsa para residuos biológicos-infecciosos se etiqueta con la información solicitada y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).

R7y R8: Solución isotónica, medio MRS, bacterias *Lactobacillus casei* sp. Se esteriliza el material de vidrio a condiciones de autoclave y se desecha en tarja.

R9. Filtros. Se almacena en un recipiente de plástico etiquetando con la información solicitada y se envía a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM (UGA).