



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“Cinética de desarrollo de *Lactobacillus casei shirota* y *Lactobacillus acidophilus* a partir de los residuos de cerveza artesanal para la obtención de biomasas con potencial de consumo humano”.

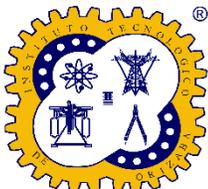
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

I.Q. Itzel Diaz Gonzalez

DIRECTOR DE TESIS:

*DR. Juan Manuel Méndez
Contreras*



Orizaba, Veracruz, **29/febrero/2024**

Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación
Asunto: Autorización de Impresión
Opción: I

C. Itzel Díaz González
Candidata a Grado de Maestra en
Ciencias en Ingeniería Química
P R E S E N T E.-

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

“Diseño de cinética de desarrollo *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus acidophilus* a partir de los residuos de cerveza artesanal para la obtención de biomásas con potencial de consumo humano”.

Comunico a usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®



Dra. Ofelia Landeta Escamilla
Encargada de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación



OLE/NAV



Av. Oriente 9 Núm.852, Colonia Emiliano Zapata. C.P. 94320 Orizaba, Veracruz.
Tel. 01 (272)1105360 e-mail: dir_orizaba@tecnm.mx | orizaba.tecnm.mx



Orizaba, Veracruz, 01/febrero/2024
Asunto: Revisión de trabajo escrito

C. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

ITZEL DÍAZ GONZÁLEZ

La cual lleva el título de:

**DISEÑO DE CINÉTICA DE DESARROLLO LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA Y LACTOBACILLUS
ACIDOPHILUS A PARTIR DE LOS RESIDUOS DE CERVEZA ARTESANAL PARA LA OBTENCIÓN
DE BIOMASAS CON POTENCIAL DE CONSUMO HUMANO**

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA – TÉCNICA - CULTURA®

PRESIDENTE: DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS

SECRETARIO: DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN

VOCAL: MIQ. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTÚ

VOCAL SUP.: DR. ERIK SAMUEL ROSAS MENDOZA



FIRMA


FIRMA


FIRMA


FIRMA

TA-09-18



Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 14 del mes de marzo del año 2024.

El(la) que suscribe

C. Itzel Diaz Gonzalez

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 93 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

“CINÉTICA DE DESARROLLO DE *LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA* Y
LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS A PARTIR DE LOS RESIDUOS DE CERVEZA
ARTESANAL PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASAS CON POTENCIAL DE
CONSUMO HUMANO”

del programa: Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección del Dr. Juan Manuel Méndez Contreras y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba.

También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: depi_orizaba@tecnm.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

Nombre y firma



Itzel Diaz Gonzalez

DEDICATORIAS

Agradezco a DIOS por la oportunidad de vivir esta etapa, agradezco por cada una de las experiencias que me dejó este reto, tanto a nivel profesional como personal, agradezco por nunca sentir su ausencia en los buenos y malos ratos, por hacerme sentir su cariño a través de muchas personas que conocí a lo largo de este camino y sobre todo doy gracias por no permitirme rendirme.

Agradezco a mi madre Ofelia González Hernández, por siempre tenerme presente en sus oraciones y por no dudar de mí en cada meta que me propongo en la vida, por todo su amor y toda su entrega, que a pesar de la distancia siempre ha sabido hacerme sentir cerca de ella, por ser la persona que más ha creído en mí.

Agradezco a mi padre, Fernando Díaz Méndez, por siempre brindarme su apoyo en todas mis decisiones, por impulsarme en seguir adelante cumpliendo las metas que me proponga, por todas sus palabras de aliento y por resaltar siempre lo mejor de mí.

Agradezco a mis sobrinos Ailin, Toñito, Guisselle y Mariam, a mi hermano Jorge, quienes en la distancia han sido un motivo muy grande para no rendirme, a mis abuelitos Guadalupe y Antonio, quienes siempre han sido unos padres para mí y me han hecho sentir orgullosa.

Agradezco a cada uno de las personas con las que compartí este camino, a marlene por toda su complicidad desde el primer día de clases, Roger, Joaquín, Diana, itzel, Viviana, Sol, por siempre ayudarme con todas mis dudas y a todos mis amigos y compañeros del laboratorio de ambiental II, quienes se han vuelto una familia para mí, ya que sin duda cada uno de ellos me han dejado un nuevo aprendizaje a lo largo de este camino.

RECONOCIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento y reconocimiento al Dr. Juan Manuel Méndez Contreras por su apoyo, orientación, confianza y dedicación durante todo el proceso de realización de esta tesis, por su conocimiento, sus consejos, agradezco por su disponibilidad de escuchar, su compromiso con mi crecimiento académico y también personal, ha sido una inspiración y un pilar fundamental en este camino académico.

Al Dr. Alejandro Alvarado Lassman y la M.I.Q. Norma Vallejo Cantú por sus consejos, comentarios y conocimientos que me han hecho aprender durante el trayecto en la maestría, por su disponibilidad de tiempo, compromiso y valiosos comentarios que contribuyeron significativamente a mejorar este trabajo.

Al Dr. Erick Rosas Mendoza por su tiempo y consejos que me brindó a lo largo de este camino, por esas palabras que fueron motivación y me ayudaron a crecer profesionalmente, por sus observaciones y sugerencias constructivas fundamentales para enriquecer este contenido y su disponibilidad para brindarme retroalimentación.

A la Dra. Ofelia Landeta Escamilla por apoyarme siempre en todas las dudas presentes, por sus palabras de aliento y por siempre estar disponible cuando la necesité.

Al M.C. Joaquín Estrada García por su apoyo incondicional por compartir su profundo conocimiento, sus consejos por ser guía no solo en aspectos académicos sino también por contribuir en el desarrollo de mis habilidades investigativas, por apoyarme en el laboratorio, por brindarme las herramientas profesionales y también por ser un gran amigo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca 1179944 para la realización de este trabajo

RESUMEN

Cinética de desarrollo de *Lactobacillus casei shirota* y *Lactobacillus acidophilus* a partir de los residuos de cerveza artesanal para la obtención de biomasas con potencial de consumo humano

Elaborada por: I.Q. Itzel Díaz González

Dirigida por: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

En la actualidad, el mercado de cerveza artesanal se encuentra en constante crecimiento, debido a que los productores tienen la versatilidad de modificar los ingredientes con sus características propias, sin embargo, en este proceso se generan cantidades importantes de residuos que desafortunadamente la mayoría de las veces son dispuestos de una manera inadecuada, generando grandes impactos negativos, el objetivo de esta investigación radica en la valorización de los granos gastados de cerveza (BSG) mediante la transformación de sus componentes en subproductos beneficiosos como estrategias significativas desde el punto de vista ambiental como económico. En este trabajo se determinaron las condiciones de operación del proceso de bioconversión para la obtención de biomasas probióticas y nutritivas mediante la acción fermentativa de *L. casei shirota* y *L. acidophilus* utilizando los granos gastados de cerveza como sustrato. Los experimentos se realizaron con diferentes concentraciones de sustrato e inóculo 4, 6 y 8 % p/p y 5, 10 y 15 % v/v respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que los granos gastados de cerveza implementados como sustrato tienen posibilidades de desarrollar y mejorar el crecimiento de ambas bacterias probióticas, debido a su composición nutrimental que las enriquece, mediante los parámetros obtenidos del proceso se consideró 6 % p/p de sustrato y 10 % v/v de inóculo como la relación sustrato microorganismo correspondiente a *L. casei* que maximiza el contenido nutricional de las biomasas obtenidas, de igual forma, mediante los parámetros cinéticos se determinó la relación correspondiente al incremento de proteínas siendo 8 % p/p de sustrato y 5 % v/v de inóculo.

ABSTRACT

Development kinetics of *Lactobacillus casei shirota* and *Lactobacillus acidophilus* from craft beer waste to obtain biomass with potential for human consumption.

By : I.Q. Itzel Díaz González

Advisor(s) : Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Currently, the market for craft beer is growing steadily as producers have the opportunity to modify the ingredients with their own characteristics. However, this process generates large amounts of waste, which unfortunately is usually disposed of improperly, creating significant negative impacts. The aim of this research work is to utilize spent grains (spent grains) by converting its components into beneficial by-products as ecologically and economically significant strategies. In this work, the conditions for the bioconversion process to obtain probiotic and nutrient-rich biomass through the fermentation action of *L. casei shirota* and *L. acidophilus* using spent grains as substrate were determined. The experiments were carried out with different concentrations of substrate and inoculum: 4.6 and 8 % w/w and 5.10 and 15 % v/v, respectively. The results obtained show that spent grains used as substrate offer opportunities for the development and improvement of the growth of both probiotic bacteria, due to their nutritional composition that enriches them. 6% w/w of substrate and 10% v/v of inoculum were considered the substrate-microorganism ratio corresponding to *L. casei*, maximizing the nutritional content of the biomass obtained

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	iv
NOMENCLATURA	v
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
1.1 Residuos orgánicos	4
1.1.2 Residuos orgánicos en México	5
1.2 Panorama de la cerveza Artesanal.....	5
1.2.1 Producción de cerveza artesanal.....	7
1.2.2 Generación de residuos de cerveza (BSG)	8
1.2.3 Propiedades de los BSG.....	8
1.2.4 Rendimiento de BSG	10
1.2.5 BSG en proceso de fermentación	11
1.3 Probióticos.....	12
1.3.1 Especies de probióticos	13
1.3.2 Acción probiótica en humanos	13
1.3.3 Bacterias ácido lácticas.....	16
1.3.4 Lactobacillus acidophilus	17
1.3.5 Lactobacillus casei shirota	18
1.3.6 Mecanismo de acción de los probióticos.....	19
1.4 Productos obtenidos a partir de la fermentación probiótica.....	19
1.5 Crecimiento bacteriano.....	23
1.5.1 Ecuacion de Monod	24
1.6 Modelos cinéticos	26
1.7 Estudios previos	28
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1 Metodología experimental	33
2.2 Obtención y caracterización del sustrato.....	34
2.3 Caracterización fisicoquímica del residuo.	34
2.3.1 Determinación de pH	35
2.3.2 Determinación de ST	35

2.3.3 Determinación de STV	36
2.3.4 Determinación de Nitrógeno total.....	36
2.3.5 Determinación de proteínas	37
2.3.6 Determinación de carbohidratos	38
2.4 Obtención y propagación de <i>Lactobacillus</i>	38
2.4.1 Propagación de la bacteria probiótica <i>Lactobacillus casei</i>	38
2.4.2 Propagación de la bacteria probiótica <i>Lactobacillus acidophilus</i>	39
2.5 Determinación de los parámetros cinéticos de <i>L. casei</i> y <i>L. acidophilus</i>	39
2.5.1 Proceso de fermentación	40
2.5.2 Determinación de biomasa	41
2.5.3 Conteo celular.....	41
2.6 Determinación de parámetros cinéticos	42
2.7 Consumo de sustrato	42
2.8 Caracterización de la biomasa obtenida	43
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1 Caracterización fisicoquímica del residuo	45
3.2 obtención y propagación de bacterias probióticas <i>L. casei</i> y <i>L. acidophilus</i>	46
3.3 Cinéticas de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> mediante la conversión de BSG	47
3.3.1 Cinéticas de crecimiento de la especie <i>L. casei</i>	47
3.3.2 Cinéticas con <i>L. acidophilus</i>	52
3.4 Caracterización de la Biomasa.....	59
3.4.1 Biomasa <i>L. casei</i>	59
3.4.2 Biomasa <i>L. acidophilus</i>	60
3.5 Rendimiento y producción de Biomasa	62
3.5.1 Rendimientos y caracterización final de las biomasas para <i>L. casei</i>	62
3.5.2 Redimientos y caracterización final de las biomasas para <i>L. acidophilus</i> ..	63
3.5 Análisis de varianza	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
ANEXOS	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.1	Concentraciones de las cervezas artesanales por estado 2017 González- Velázquez (2022)	7
1.2	Curva de crecimiento del ciclo bacteriano (Romero-Mota., 2018).	24
2.1	Diagrama general de la metodología para el proceso de obtención de biomasas a partir de residuos de cerveza artesanal mediante la acción fermentativa de <i>Lactobacillus casei shirota</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	33
2.2	a) residuo de cerveza artesanal, b) residuo de cerveza artesanal tamizado	34
2.3	Medicamento comercial con <i>L. acidophilus</i>	39
3.1	a) aislamiento de <i>L. casei</i> , b) aislamiento de <i>L. acidophilus</i>	46
3.2	a) propagación <i>L. casei</i> , b) propagación <i>L. acidophilus</i>	47
3.3	Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con <i>L. casei</i> a 4 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.	48
3.4	Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con <i>L. casei</i> con 6 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.	49
3.5	Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con <i>L. casei</i> con 8 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.	51
3.6	Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con <i>L. acidophilus</i> con 4 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.	53
3.7	Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con <i>L. acidophilus</i> con 6 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.	55
3.8	Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con <i>L. acidophilus</i> con 6 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.	57
3.9	Caracterización de la biomasa obtenida para <i>L. Casei</i> a diferentes concentraciones de sustrato e inóculo a) 4, b) 6 y c) 8 %.	60
3.10	Caracterización de la biomasa obtenida para <i>L. acidophilus</i> a diferentes concentraciones de sustrato e inóculo a) 4, b) 6 y c) 8 %	61
3.11	a) Diagrama de Pareto, b) Grafica de efectos principales.	65
3.12	Diagrama de Pareto para <i>L. acidophilus</i>	66

LISTA DE TABLAS

Tabla		pág
1.1	Clasificación de los residuos sólidos orgánicos	4
1.2	Composición BSG	9
1.3	Diferentes ejemplos de tipos de probióticos encontrados en productos (Corrales Benedetti y Arias Palacios, 2020).	15
1.4	Bacterias Acido-Lácticas y sus distintas aplicaciones (Insuasti et al.,2023)	17
1.5	Productos obtenidos a partir de la fermentación probiótica	22
1.6	<i>U_{max}</i> y en <i>t_D</i> diferentes células y microorganismos	27
2.1	Parámetros fisicoquímicos del residuo	35
2.2	Diseño experimental	40
2.3	Caracterización fisicoquímica de la biomasa	43
3.1	Caracterización fisicoquímica del residuo	46
3.2	Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>L. casei</i> en diferentes concentraciones	52
3.3	Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>L. acidophilus</i> a diferentes concentraciones de inóculo	58
3.4	Rendimientos y caracterización final de las biomásas para <i>L. casei</i>	63
3.5	Rendimientos y caracterización final de las biomásas para <i>L. acidophilus</i>	65

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado	Unidades
AL	Ácido láctico	[-]
AN	Agar nutritivo	[-]
BAL	Bacterias ácido-lácticas	[-]
BSG	Brewers spent grain	[-]
<i>LcS</i>	Lactobacilos casei shirota	[-]
pH	Potencial de hidrógeno	[-]
S	Sustrato	[-]
ST	Sólidos totales	% m/m
STV	Sólidos totales volátiles	% m/m
V	Volumen	m ³
UFC	Unidades formadoras de colonias	[-]
<i>Y_{P/s}</i>	Coefficiente de biomasa	[g/g]
<i>k_s</i>	Afinidad del proceso	[-]
<i>U_{max}</i>	Tasa máxima de crecimiento	[h ⁻¹]
λ	Fase de latencia	[h]

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria cervecera a nivel artesanal se encuentra en constante crecimiento, debido a que los productores tienen la versatilidad de modificar los ingredientes y las materias primas con sus características propias. Sin embargo, esto conlleva a la generación de cantidades importantes de residuos que no se disponen adecuadamente, dado que presentan un alto contenido de humedad superando un 80 % p/p, lo que dificulta su procesamiento (Medina-Saavedra *et al.*, 2018).

Esta industria utiliza cebada malteada como materia prima principal, que se somete a un proceso de cocción y maceración del que resulta el mosto cervecero, que luego se lleva a la fase de fermentación para producir cerveza. Este proceso da lugar a cantidades significativas de residuos insolubles, a veces conocidos localmente como bagazo de cerveza e internacionalmente como "grano gastado de cerveza" (BSG) por sus siglas en inglés. Este subproducto representa el 31% del peso total de la malta original utilizada en el proceso y el 85 % de los residuos (Jackowski *et al.*, 2018).

Las emisiones de gases de efecto invernadero del sector industrial se encuentran entre los factores más responsables del cambio climático mundial; sin embargo, el aumento de los daños al medio ambiente se debe a la mala gestión y eliminación de los excedentes generados (Shakoor *et al.*, 2021). Por esta razón la importancia de aplicar alternativas que gestionen el manejo y aprovechamiento de los residuos para disminuir los efectos negativos en el ambiente, además pueden convertirse en productos de gran valor añadido si se incorporan con otros productos que contengan altos nutrientes, obteniendo un producto enriquecido en nutrientes y con potencial benéfico para la salud.

Además de los beneficios que los microorganismos probióticos tienen en la salud, existen varios estudios que demuestran su capacidad para mejorar la salud intestinal y mantener el equilibrio inmunológico, así como su capacidad para metabolizar determinados hidratos de carbono para crear compuestos de moléculas más pequeñas, como el ácido láctico. Los dos géneros más utilizados son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

El presente trabajo propone realizar un proceso de bioconversión de los residuos generados de la industria de cerveza artesanal mediante la fermentación probiótica de *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei shirota* y *Lactobacillus acidophilus*) para la obtención de biomasa con potencial en consumo humano.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICO

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Residuos orgánicos

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones para comprender que los residuos orgánicos procedentes de diversas superficies, incluidas las comerciales, residenciales e industriales, son materiales primarios con proporciones variables de lignina, celulosa y hemicelulosa que se utilizan en la producción de biocombustibles para el desarrollo de nuevas fuentes de energía. Además, son materiales resultantes de actividades de fabricación y consumo que no han supuesto ningún coste financiero (Chávez *et al.*, 2021). En la Tabla 1.1 se muestran los residuos sólidos orgánicos clasificados según (Fiallos., 2022).

Tabla 1.1 Clasificación de los residuos sólidos orgánicos (Fiallos, 2022).

Tipo de clasificación	Análisis
Según su fuente de generación	Resultante del barrido de calles De mercados Domiciliarios Institucionales Industriales y agrícolas
Según su naturaleza y/o características físicas	Residuos de alimentos Estiércol Restos vegetales Papel, cartón y cuero.

Aumentar la producción de bioenergía a partir de biofuentes sostenibles es preocupante, ya que el sustrato utilizado es más caro que el coste de producción. Los residuos orgánicos se consumen para la producción de bioenergía y, a su vez, generan residuos secundarios que se utilizan como insumo para el siguiente proceso de reciclado (Atabani *et al.*, 2019; Vieira y Matheus, 2019).

La mayoría de los residuos orgánicos que se generan en el sector agroindustrial se eliminan de manera inadecuada, ya que se vierten directamente en el medio ambiente, son quemados de forma incontrolada o dejados en terrenos, que, al paso de tiempo, se pueden introducir a los sistemas de alcantarillado llegando a los mantos acuíferos o produciendo malos olores contribuyendo así al incremento de la contaminación ambiental como consecuencia a esta mala disposición (Fiallos, 2022).

1.1.2 Residuos orgánicos en México

En México se producen anualmente alrededor de 76 millones de toneladas de residuos orgánicos, de los cuales 79 % son residuos primarios (producidos durante el proceso de cosecha), como son hojas y tallos de maíz, trigo, pajas cebada y frijol, entre otros. El 21 % restante se compone de residuos secundarios obtenidos del procesamiento que se realizó después de la cosecha, como pulpa de café, bagazo de maguey o agave, bagazo de caña de azúcar, mazorcas de maíz. Estos datos demuestran la necesidad de acelerar los estudios para disminuir la contaminación producida por estos residuos y adquirir nuevos productos que aporten beneficios económicos (Caltzontzin-Rabell *et al.*, 2022).

1.2 Panorama de la cerveza Artesanal

El término de cerveza artesanal apareció por primera vez a finales de la época de los 70 en el Reino Unido, y se utilizaba para describir a las pequeñas fábricas de cerveza que estaban enfocadas en producir tradicionalmente cervezas de alta fermentación, en donde el agua, malta y lúpulo forman parte de los principales ingredientes que la constituyen. En la actualidad la industria cervecera artesanal ha logrado obtener grandes estrategias

de mercadotecnia para su crecimiento, en comparación con las empresas cerveceras industriales, debido a que sus productos compiten en calidad y variedad, más que en precios bajos y publicidad (Leach, 2017).

Con una cuota del 21 % de los envíos internacionales, México se ha convertido en un importante productor y exportador de cerveza. Holanda ocupa el segundo lugar, con el 14.4 % de los envíos, Bélgica el primero, con el 11 %, y Alemania el tercero, con el 9.9 %. Cada año, México exporta 33 millones de hectolitros a mercados extranjeros. (Leach, 2017). A diferencia de la elaboración de las cervezas industriales, las de tipo artesanal constituyen un alto nivel de calidad respecto al proceso productivo y a los insumos, ya que este proceso es más delicado por lo cual se tienen mayores cuidados. De acuerdo con Acermex (Asociación de Cerveceros de la República Mexicana), la industria artesanal incrementó sus ventas en 2017 en 59 %, al alcanzar 166,069 hectolitros. (Monrroy, 2019).

Aunque las cervecerías industriales mexicanas han comenzado a participar en la producción de cerveza artesanal, la mayor parte de la oferta nacional sigue siendo producida por las cervecerías artesanales en el país, mediante lo reportado por González-Velázquez (2022). El número de cervecerías artesanales ha ido aumentando anualmente; en los últimos años, se han duplicado en comparación con épocas anteriores. En la Figura 1.1 se muestran los porcentajes de concentración de cervecerías artesanales por estados.

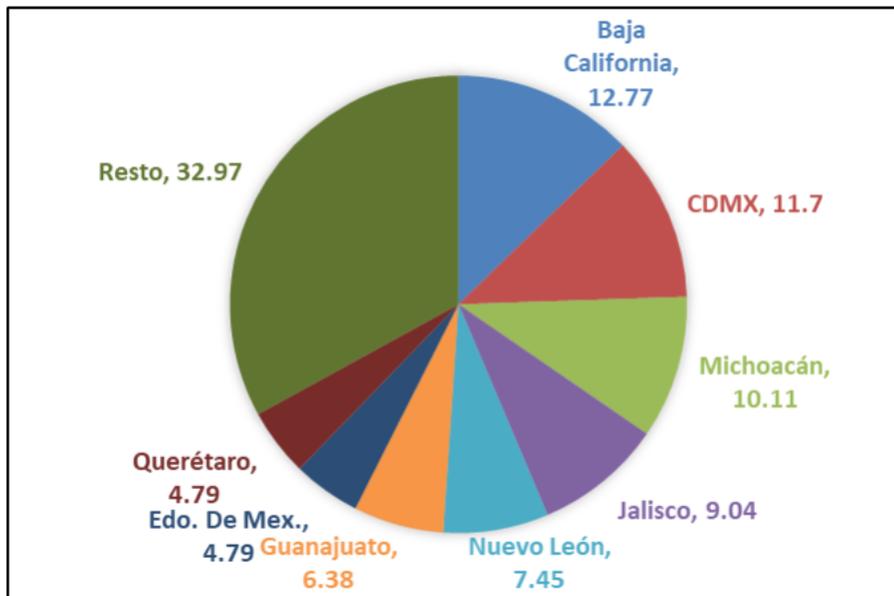


Figura.1.1 Concentraciones de las cervezas artesanales por estado (González- Velázquez, 2022).

Para explicar lo ilustrado anteriormente en la Figura 1.1 Baja California cuenta con 12.77% de las 630 cervecerías artesanales del país especializadas en la producción de esta bebida, seguido de Michoacán con 10.11 %, el Distrito Federal con 11.70 % y Jalisco con 9.04 %. 39 fabricantes conforman el 75 % del total de productores a nivel estatal concentrados en Tijuana.

1.2.1 Producción de cerveza artesanal

Respecto a la producción de cerveza reportado por Sánchez *et al.*, (2021) un porcentaje del 100 % pertenece a las agroindustrias que generan un volumen promedio de 34,434.55 hectolitros anuales. Conforme a lo reportado se producen dos tipos de cerveza principalmente, estilo *Ale* y *Lager* que al mismo tiempo se pueden dividir en diferentes sub-estilos; como lo son *IPA*, *Stout* y *Ale pale*, por esta versatilidad en cuanto a diferentes estilos y formulaciones es que los cerveceros artesanales ascienden cada vez más a liderar el camino en el mercado premium de esta bebida.

Pese a lo reportado anteriormente muchos usuarios aún desconocen la información necesaria que sustente como diferenciar una cerveza artesanal de una comercial, limitados a percatarse de la calidad e innovación que contiene una cerveza artesanal.

1.2.2 Generación de residuos de cerveza (BSG)

Durante el proceso de elaboración de la cerveza se llevan a cabo distintas etapas, particularmente la maceración de la malta, en la cual se producen cambios enzimáticos que hacen que alrededor del 60-70 % de la masa seca pase a la malta cocida (mosto) mientras que la parte restante permanece en el BSG, se continúa con el mosto cervecero filtrado y los BSG se remojan en agua caliente (unos 78 °C). Finalmente, el grano consumido se extrae del filtro cuba o filtro prensa, se transporta al almacén mediante continuación, se envía al tanque de distribución situado fuera de la fábrica de cerveza y la mayoría de las veces estos tienen una mala disposición (Glowacki *et al.*, 2022).

Lo reportado por Chetrariu y Dabija, (2020) afirman que el residuo más abundante del proceso de elaboración de cerveza con un porcentaje del 85 % total BSG, donde 100 kg de malta fresca se alcanzan entre 100 y 130 kg de BSG, del mismo modo equivalente a 21 y 22 kg de BSG por hectolitro de cerveza elaborada. En torno a un porcentaje del 70% de la producción del BSG se emplea como alimento para animales, 10 % es utilizado en la producción de biogás y el 20 % remanente se maneja con mala disposición. La levadura y los BSG obtenidos en este proceso se clasifican como subproductos, ya que el término "residuos sólidos" en este sector se refiere a todo tipo de vidrio, plástico, papel etiquetado y otros residuos industriales que se generen (Arana-Sojo, 2022).

1.2.3 Propiedades de los BSG

Este subproducto abarca las glumas, el pericarpio y los tegumentos de las capas externas que tienen y de los demás cereales, los cuales comprenden distintos nutrientes que no se sustraen a lo largo de las etapas de malteado y macerado (Bianco *et al.*, 2020). Los BSG son sustancias lignocelulósicas ricas en proteínas (20 %), fibra alimentaria (70 %) y

vitaminas y minerales. Su composición química puede variar en función de diversos factores, como la calidad de la cebada o de otros cereales utilizados para elaborar la cerveza (Lalić *et al.*, 2023). Otros de sus componentes químicos importantes son, almidón, lípidos, cenizas y compuestos fenólicos. En la Tabla 1.2 se presentan los porcentajes en los que varían estos componentes de acuerdo con lo reportado por Chetrariu y Dabija (2020).

Tabla 1.2 Composición BSG (Chetrariu y Dabija,2020).

Componente	%
Proteína	25-30
celulosa	12—5
Hemicelulosa	20-25
Lignina	12--25
Lípidos	5—10
Cenizas	2—5

Debido a su composición, rica en compuestos orgánicos con un importante valor nutritivo, los residuos cerveceros deben tratarse antes de verterse al medio ambiente para evitar alteraciones del equilibrio ecológico. Por ello, existe una fuerte motivación para reducir la producción de residuos y fomentar su utilización en otros procesos. Los bioprocesos industriales se han presentado como un medio potencial de direccionamiento de estos residuos, además de sus potenciales aplicaciones en la nutrición animal y humana, con vistas a producir bienes con mayores valores agregados y direccionar los residuos generados para fines más nobles (Onofre *et al.*, 2022).

1.2.4 Rendimiento de BSG

En la actualidad se está buscando una vía diferente de valorización a través del procesamiento biotecnológico para superar los problemas asociados a la adición de BSG y minimizar los daños y la contaminación que se derivan de la industria cervecera. Además del valor nutritivo del BSG, su disponibilidad durante todo el año a un coste muy bajo los convierte en una materia prima adecuada para una gran variedad de aplicaciones potenciales (Teixeira *et al.*, 2020). En particular, la fermentación microbológica es un método prometedor de biovalorización de este importante subproducto industrial (Patel *et al.*, 2018).

San Marín *et al.*, (2022), reportan que el 70 % de los BSG se utilizan en la alimentación de animales como pollos, patos y pavos, mientras que el 10 % se emplea para fabricar biogás y el 20 % restante es desechado en vertederos. El BSG se ha evaluado para su inclusión en dietas humanas por su bajo costo y alto valor nutritivo, especialmente cuando es necesario aumentar el contenido en fibra, disminuir el contenido calórico y aumentar el contenido en proteínas de los productos alimenticios. Otro producto que puede obtenerse utilizando BSG son biocombustibles como el hidrógeno, el etanol y el butanol mediante procesos de fermentación. (Aguado-García, 2020).

Debido a la cristalinidad de la celulosa, al grado de polimerización, a la porosidad del material y al contenido de lignina, que oscila entre el 12 y el 18 %, los materiales lignocelulósicos, como los BSG, presentan algunos problemas durante la hidratación enzimática, necesitando una etapa de pretratamiento para alterar la estructura lignocelulósica (Plaza *et al.*, 2017).

1.2.5 BSG en proceso de fermentación

En el proceso de fermentación, los procariontes (bacterias) y eucariontes (microalgas, levaduras y hongos) transforman sustancias líquidas o sólidas en productos de gran valor y beneficio para el ser humano. Con el fin de producir compuestos industriales bioactivos, la fermentación puede tener lugar en estado líquido o sólido. El término "fermentación sólida" se refiere a los procesos en los que el crecimiento del microbio depende de materiales insolubles en agua (la cantidad de agua añadida no debe ser superior a la capacidad del sólido para saturar la bacteria en crecimiento). Los sustitutos que pueden utilizarse son la pasta de papel, el bagazo de caña (un subproducto de la fabricación de azúcar) y el trigo (Hernández-Melchor *et al.*, 2019).

El subproducto BSG puede obtener mediante la fermentación diversos productos de valor añadido, como ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos volátiles, enzimas, vitaminas y biocombustibles de segunda generación (Davila *et al.*, 2016 ., Guarda *et al.*, 2021). Por ejemplo, un estudio realizado por (Marcus y Fox, 2021), revelaron que el BSG puede transformarse en una serie de enzimas, como amilasa, celulasas, glucanasas, hemicelulasas, etc., así como en otros productos como xilitol, bioetanol y ácido cítricos a través de la fermentación del BSG.

Como ya se ha mencionado, la composición de la BSG permite la formación de productos con valor añadido. Sin embargo, debido a los complejos componentes de las paredes celulares que incluyen la celulosa, hemicelulosa y lignina que se combinan para formar una estructura refractaria, el uso de materiales lignocelulósicos necesita un pretratamiento que rompa su estructura cristalina y permita su fragmentación. Un paso de pretratamiento (por ejemplo, químico, físico, biológico, híbrido, etc.) debe venir antes de la fermentación para superar la inhibición natural del material de fibra lignocelulósica del BSG, exponiendo los polisacáridos y haciendo que estos sean aptos a la hidrólisis enzimática que tiene como objetivo la descomposición de las fibras en azúcares fermentables para así finalmente, el BSG puede ser procesado en biocombustibles de

segunda generación, tales como, ácido cítrico, ácido láctico, etanol, -amilasa, celulasa (Mitri *et al.*, 2022).

1.3 Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que asignan beneficios a la salud del huésped cuando se ingieren en las cantidades apropiadas, lo que se traduce en una acción protectora contra los agentes patógenos y en beneficios nutricionales. La mayoría de las veces, el uso de agentes probióticos está relacionado con alimentos funcionales o suplementos dietéticos que mejoran la salud de las personas en general. Con el fin de disminuir el impacto negativo que los medicamentos antibacterianos tienen sobre la microbiota de los pacientes, el uso de probióticos se ha convertido en una alternativa viable para el tratamiento de enfermedades infecciosas. (Corrales Benedetti y Arias Palacios, 2020).

Un microorganismo debe cumplir ciertos requisitos para ser clasificado como probiótico (Gutiérrez y Salas, 2018) como:

- No debe ser patógeno u oxigénico.
- Debe adaptarse al microbiota intestinal sin desplazar al microbiota ya existente.
- Capacidad de sobrevivir al tránsito gastrointestinal para después mantenerse viable durante un tiempo en el intestino.
- Deber ser capaz de adherirse a las células epiteliales.
- Generar sustancias antimicrobianas.
- Debe mejorar las funciones inmunes al igual que las actividades metabólicas.

Las principales funciones de los probióticos son mantener el equilibrio de la microbiota intestinal y regular el sistema inmunitario, lo que puede aliviar la inflamación y las enfermedades crónicas (Gu *et al.*, 2022).

El uso de probióticos como suplementos dietéticos para humanos y animales está ampliamente aceptado. También se utilizan en acuicultura para inhibir el crecimiento de patógenos y reducir la presencia de virus. Pueden mejorar la calidad del agua y la cantidad de nutrientes, así como la actividad enzimática y la respuesta inmunitaria (Ding *et al.*,2021).

1.3.1 Especies de probióticos

Existe un número considerable de especies microbianas que pueden tener efectos probióticos. Estos organismos pertenecen principalmente al grupo BAL, que constituye una parte de la microbiota intestinal. Actualmente, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los dos géneros bacterianos que incluyen una cantidad significativa de bacterias probióticas Molina, (2019), explica que estos géneros sintetizan ácidos orgánicos que reducen a su vez el pH intracelular a niveles letales para el conjunto de bacterias patógenas. Estos géneros son clasificados por diferentes factores como; propiedades morfológicas, crecimiento a diferentes temperaturas, capacidad de fermentar la glucosa y la configuración de ácido láctico. Las levaduras (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*) y las bacterias de diversos géneros (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*) figuran entre los microorganismos comercializados como probióticos. (Álvarez *et al.*, 2021).

1.3.2 Acción probiótica en humanos

En la actualidad diversos estudios resaltan la importancia de implementar tecnologías que permitan incluir los probióticos en la dieta humana, tal es el caso de Bernal *et al* (2017), donde examinó la viabilidad de utilizar estas matrices alimentarias como vehículos para incluir microorganismos probióticos en productos de origen vegetal en el desarrollo de bebidas funcionales, los estudios en humanos y modelos animales han demostrado la eficacia clínica de diversas cepas con capacidad probiótica para tratar enfermedades como el cáncer de colon (efecto gen anticancerígeno), la enfermedad inflamatoria intestinal, la diarrea (actividad antimicrobiana), las complicaciones postoperatorias y la intolerancia a la lactosa. Además, es importante mencionar el impacto en la salud humana es único de cada cepa probiótica.

Una de las propiedades de estos microorganismos es la acción en la luz intestinal que podrían ser beneficiosas como reporta Machado (2020). Realizó una investigación sobre los beneficios de las aplicaciones de los probióticos en niños ante un episodio de Enfermedad de diarrea aguda (EDA), numerosos probióticos comparten algunos de estos efectos, y su uso se aconseja desde hace más de 20 años en el tratamiento y la prevención de la diarrea grave.

El uso clínico más conocido de los probióticos es la prevención de las complicaciones derivadas de la aplicación de antibióticos en pacientes hospitalizados, donde se ha conseguido reducir en un 50 %. El uso de probióticos compuestos por varias especies en una concentración de al menos 10¹¹ unidades formadoras de colonias (UFC) durante más de ocho semanas demostró una disminución de la presión arterial (Gómez-López, 2019). Alimentos y suplementos beneficiosos para la salud humana, así como su capacidad para aumentar la seguridad, Por ello, los probióticos actuales y su aplicabilidad en el ámbito de investigación clínico y biomédico, de los probióticos para mejorar la salud humana, en la Tabla 1.3 Se presentan diferentes ejemplos de tipos de productos en donde se pueden encontrar los probióticos en el mercado mediante lo reportado por Corrales Benedetti y Arias Palacios, (2020).

Tabla 1.3 Diferentes ejemplos de tipos de probióticos encontrados en productos (Corrales Benedetti y Arias Palacios, 2020).

Cepa probiótica	Formulación	Nombre comercial
<i>Bifidobacterium animalis subsp Lactis</i> DN-173010	Yogurt	Activia (Danone)
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Bebida, capsula	Align (procter & Gamble)
<i>Clostridium butyricum</i> 588	Tabletas, bebidas	MIYA-BM (Miyarisan Pharm)
<i>Enterococcus faecium</i> SF 68	Polvo, Sachets	Bioflorin(Cerbios Pharma)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Lb	Capsulas, Sachets	Lacteol (PUMC Pharm)
<i>Lactobacillus casei</i> Subsp shirota	Leche fermentada	Yakult (Yakult)
<i>L. casei</i> DN-114001	Leche fermentada, Yogurt	Actimen, DanActive
<i>L.rhamnosus</i> Lcr35	Capsulas vaginales	Gynophilus
<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745 (1yo)	Capsulas	Florastor, Codex
<i>L. acidophilus</i> CL1285 + <i>L. casei</i> Lbc80r + <i>L. rhamnosus</i> CLR2	Bebidas fermentadas, capsulas	UltraLevure (Biocodex) Bio K + (BioK +Intl)

1.3.3 Bacterias ácido lácticas

Las BAL son bien conocidas en la actualidad por su variedad en cuanto a vínculos con la salud y su potencial papel como probiótico en alimentos fermentados Insuasti *et al.*, (2023). Por sus características morfológicas, las BAL son bacterias positivas en la prueba de Gram pero negativas en las pruebas de la oxidasa y la catalasa. También son anaerobias, microaerófilos y productoras de ácido láctico, que es su principal producto metabólico procedente de la fermentación de la lactosa. El margen de pH en el que crecen las BAL oscila entre 3.2 y 9.6, y persisten en entornos en los que otras bacterias no podrían crecer debido a la actividad del ácido orgánico. Como resultado, desarrollan la capacidad de inhibir microorganismos patógenos o alterantes (Martínez-Vázquez *et al.*, 2020). La generación de ácidos orgánicos como el láctico y el acético, que provocan la disminución del pH, así como la competencia con el contenido salino del medio son las causas principales de la capacidad de las BAL para inhibir el crecimiento. Además, las BAL también producen compuestos no proteicos como los ácidos proteicos ribosomales conocidos como bacteriocinas.

Son varios los informes científicos que constatan los beneficios de los probióticos en términos de salud, lo que ha despertado el interés de los investigadores por la función de algunos tipos de bacterias lácticas y otros microorganismos como probióticos Insuasti *et al.*, (2023). El estudio de Petkova *et al.*, (2022) que menciona los posibles responsables del efecto antifúngico en compuestos como el ácido láctico, el ácido acético, el etanol, el Co₂ y las bacteriocinas, en la bioconservación de uvas de mesa contaminadas con *Botrytis cinerea*, cuando se utiliza un procedimiento con cultivo de BAL del género *Lactiplantibacillus*. Numerosas aplicaciones en las que se utilizan las BAL según informan (Insuasti *et al.*,2023), se muestran en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4 Bacterias Acido-Lácticas y sus distintas aplicaciones (Insuasti *et al.*,2023).

BAL	Aplicación	Referencia
Géneros de <i>Bacillus</i>	Antifúngico	(Badia <i>et al.</i> ,2017)
Cepas de <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Antifúngico	(Olivares tenorio y Klotz Caberio, 2020)
Biosilo: <i>Lactococcus lactis Tw34</i> y <i>L. plantarum</i>	Inoculación de microorganismos para la fermentación de residuos de merluza y harina de cebada	(Marguet <i>et al.</i> , 2017)

1.3.4 *Lactobacillus acidophilus*

Una de las especies de *Lactobacillus* que se utiliza con más frecuencia es el *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), muy conocido por sus efectos positivos sobre la microbiota del tracto gastrointestinal. Se sabe que *L. acidophilus* reduce el riesgo de colesterol en sangre, la intolerancia a la lactosa, las náuseas y la diarrea. Esta bacteria también se considera un antagonista contra los patógenos intestinales y es capaz de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ecologías digestivas complejas. Este microorganismo tiene un metabolismo homofermentativo, es una bacteria anaerobia aerotolerante, y sus condiciones ideales de crecimiento son de 30 a 45 °C y un pH de 4 a 5 (Fina-Martín, 2019).

Los microorganismos que acompañan al *L. acidophilus* comparten con él el uso de los mismos nutrientes, por lo que compiten con ellos. También regula el crecimiento incontrolado de estos microorganismos reduciendo la disponibilidad de nutrientes durante la digestión. (Fina-Martín, 2019). Esta bacteria Posee un tamaño de partícula alrededor de 0,6 a 0-9 micrómetros de diámetro y de 1.5 a 6.0 micrómetros de longitud 61 (Burgos-montañas, 2019).

Esta bacteria probiótica ha sido estudiada en procesos de biotransformación como lo presenta Romero-Mota (2017), examinó la acción fermentativa de *Lactobacillus* (*acidophilus*, *reuteri* y *fermentum*) en la bioconversión de sustratos orgánicos en productos con potencial alimenticio, realizó una caracterización fisicoquímica y microbiológica del residuo porcícola, reportó los nutrientes que se generan al emplear *Lactobacillus*, las condiciones óptimas para la producción de ácido láctico y para la supervivencia estable de los *Lactobacilos*, la concentración que se obtuvo fue de 8.2 g/L de carbohidratos, mientras que para el pH en el intervalo de 5.5 a 6.7, el cual resultó no ser un factor significativo en el estudio. El tiempo de residencia para que los *Lactobacillus* produjeran la mayor cantidad de ácido láctico, fue entre las 48 y 72 horas., señalando que la investigación desarrollada se realizó con residuo porcícola al cual no se le realizó un pretratamiento, por lo cual es evidente que se puede obtener mayor cantidad de biomasa, así como mayor grado de inactivación de microorganismos patógenos.

1.3.5 *Lactobacillus casei shirota*

Lactobacillus casei shirota (*LcS*) es una cepa probiótica muy conocida, ha sido aprobada "generalmente reconocida como segura" proporciona muchos beneficios para la salud, ya que equilibra la microbiota intestinal, mejora la disfunción gastrointestinal, previene las infecciones y el cáncer, y modula las respuestas inflamatorias e inmunitarias (Katao-Kataoka *et al.*, 2016). Esta cepa probiótica tiene un registro en donde se extiende que es utilizada en los productos lácteos fermentados de Yakult Honsha Co.

Diversas investigaciones se han llevado a cabo para evaluar el efecto beneficioso de *LcS*, la introducción de *LcS* en el intestino para prevenir la recurrencia del cáncer de vejiga La especie *Lactobacillus casei* está ampliamente distribuida en los intestinos de los mamíferos e incluye un amplio grupo de cepas utilizadas en la fermentación de productos alimentarios.

1.3.6 Mecanismo de acción de los probióticos

Los probióticos ejercen grandes beneficios en el hospedador a través de diversos mecanismos de acción, su mecanismo general en el huésped consiste en un aumento de producción respecto a las enzimas que conducen a la digestión y absorción de nutrientes. La capacidad de adhesión es una de las principales características para definir si un microorganismo es viable para ser aplicado como probiótico, de manera que las posibilidades de que el microorganismo tenga actividad inmunomodulador o metabólica incrementan (Saarela, 2007; Ding *et al.*, 2021).

Los probióticos pueden afectar el ecosistema intestinal actuando sobre el sistema inmunológico de la mucosa, uno de los mecanismos de acción más significativos es la resistencia a la colonización de patógenos, que previene las infecciones oportunistas y puede modificar el entorno local mediante la producción de ácidos grasos (Boggio Marzet *et al.*, 2022).

En el estudio de Rappaccioli *et al.* (2021) se mencionó que los probióticos permiten ayudar a controlar la respuesta inmunológica del huésped, alterando los procesos enzimáticos implicados en la metabolización de ciertos carcinógenos y reduciendo la inflamación crónica. Mediante la síntesis de sustancias químicas que pueden estimular las células inmunitarias, la flora intestinal controla el sistema inmunitario. La interacción de las bacterias probióticas y las células epiteliales con los monocitos, macrófagos y linfocitos da lugar a la producción de células t-reguladoras, que tienen efectos inmunomoduladores.

1.4 Productos obtenidos a partir de la fermentación probiótica

Para las industrias alimentaria, química, de biorrefinería, biotecnológica y de bioprocesamiento, la fermentación como proceso de biotransformación ha permitido obtener productos de alto valor (Boulay *et al.*, 2020; Girelli *et al.*, 2020).

Los componentes de mayor interés son los antioxidantes orgánicos, los colorantes, los aditivos funcionales, las bacteriocinas y el etanol celulósico antioxidantes, colorantes, péptidos funcionales, bacteriocinas y biomasa celular (Arrijoja *et al.*, 2020; Girelli *et al.*, 2020). La producción eficiente de estos compuestos requiere sustratos que proporcionen los nutrientes necesarios para la reproducción del microorganismo y la producción de sus metabolitos. Las condiciones adecuadas del proceso (pH, temperatura, control de O₂, aireación, sistemas de agitación) también son necesarias para optimizar el rendimiento de la biomasa microbiana o sus metabolitos (Boulay *et al.*, 2020).

Específicamente, en la fermentación probiótica se utilizan microorganismos nutricionalmente exigentes, que con frecuencia dependen de sustratos comerciales para su reproducción. No obstante, el elevado coste de los sustratos comerciales repercute significativamente en el precio del producto obtenido por fermentación. Entre el 60 y el 70 % de los costes globales de producción de biomasa son atribuibles a los soportes de fermentación (Khedkar *et al.*, 2017). Esto ha llevado a los investigadores a buscar otras fuentes, como los residuos orgánicos, que pueden proporcionar los macro y micronutrientes necesarios para la reproducción microbiana.

La idea de utilizar residuos orgánicos como sustratos para el crecimiento microbiano busca valorizar los residuos al tiempo que se abordan los problemas medioambientales que causan, centrándose en el avance de la investigación en el contexto de la economía circular (Margallo *et al.*, 2019). Recientemente se ha investigado el uso de residuos agroindustriales para producir ácido láctico (LA) y biocombustible (Cizeikiene *et al.*, 2018; Rolim *et al.*, 2018). Debido a que los residuos orgánicos agroindustriales son materiales ricos en compuestos lignocelulósicos que pueden ser fuentes importantes de biomasa tienen la posibilidad siendo fuentes significativas de micro y macronutrientes, así como fuentes directas de carbono y nitrógeno durante los procesos de fermentación.

La información sobre el uso de bacterias lácticas como agentes probióticos en la fermentación de ingredientes alimentarios y la generación de productos dietéticos está ampliamente disponible. En esta situación, una amplia variedad de sustratos artificiales y naturales serían adecuados para el cultivo de bacterias lácticas, ya que, además de sus propiedades probióticas, también podrían utilizarse como agentes antibacterianos y antifúngicos, lo que les conferiría la cualidad de cultivadores prometedores. En la Tabla 1.5 se presentan algunas especies probióticas utilizando diferentes fuentes en el proceso de fermentación probiótica y sus respectivos bioproductos.

Tabla 1.5 Productos obtenidos a partir de la fermentación probiótica

Especie	Fuente	Producto	Referencia
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Chlorella vulgaris	Investigación de la biomasa de <i>C. vulgaris</i> como sustrato para el desarrollo y la fermentación de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en bebidas de soja vegetal.	Casatlos (2023)
<i>Lactococcus lactis LA5</i>	piña	se investigaron el perfil de metabolitos y la dinámica de la comunidad microbiana. Los resultados mostraron que los contenidos de ácidos orgánicos obteniendo péptidos en los productos finales	Luo <i>et al</i> (2023)
<i>Lactobacillus rudii</i>	Almidón del maíz chulpi (Zea mays sacchara)	producción de ácido láctico a partir del almidón del maíz chulpi (<i>Zea mays sacchara</i>) con fermentación de <i>L.rudii</i> para su posterior uso en la industria cosmética.	Guamán Pinto y Adriana Michelle. (2022).
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Bagazo de caña de azúcar	crecimiento de cinéticas de fermentación para la obtención biotecnológica de ácido láctico a partir de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar, concentrados y no concentrados con <i>L. pentosus</i> para la obtención de ácido láctico.	González – leos <i>et al</i> (2019)
<i>Lactobacillus casei</i>	lentejas y frijoles	<i>Lactobacillus casei</i> impiden el crecimiento de microorganismos patógenos y dan como resultado productos con seguridad para producir una bebida fermentada.	Swieca <i>et al.</i> (2019)
<i>Lactobacillus ramosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus. Delbrueckii</i>	Jugo de remolacha	Se produjo bebida probiótica a partir de jugo de remolacha utilizando los probióticos <i>Lb. ramosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> y <i>Lb. Delbrueckii</i> , elevaban los niveles de fenólicos, flavonoides totales y la actividad antioxidante.	Panghal <i>et al.</i> (2017)

1.5 Crecimiento bacteriano

El crecimiento de cada sistema biológico se define como el que se produce en respuesta a un aumento de la masa de la célula, lo que implica su multiplicación por 2. Se produce un aumento de la población en los organismos unicelulares que se dividen en fisiones o gematrías. Existen dos perspectivas desde las que contemplar el crecimiento bacteriano: la individual y la poblacional Caycedo *et al* (2021). La característica física más significativa que distingue a las bacterias es probablemente su velocidad de crecimiento. La velocidad de crecimiento de un cultivo bacteriano será dependiente a la conformación del genotipo específico de la cepa y del medio de cultivo (Phinal *et al.*, 2019).

Caycedo *et al* (2021) describen el ciclo de crecimiento constituido por las siguientes fases, en la primera, correspondiente a la adaptación, al iniciar un crecimiento exponencial, las bacterias modifican su metabolismo para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales y nutricionales. La fase exponencial: en esta fase las bacterias tienen un tiempo de generación corto y se correlacionan con la fase de infección y proliferación del agente infeccioso en el organismo, cuando tanto la tasa de crecimiento como el consumo de nutrientes son máximos. En la fase estacionaria no aumenta el número de bacterias, y las que ya están tienen un metabolismo diferente al de la fase cinética. En su lugar, se observa una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que es significativa en la progresión de las infecciones o intoxicaciones. Esta fase se produce cuando uno o más nutrientes esenciales empiezan a escasear en el entorno, quizá como consecuencia de los productos nocivos liberados durante la fase de retardo del crecimiento microbiano o como resultado de la presencia de especies competitivas que limitan el crecimiento microbiano y finalmente la fase de muerte donde se produce una disminución de microorganismos cultivables.

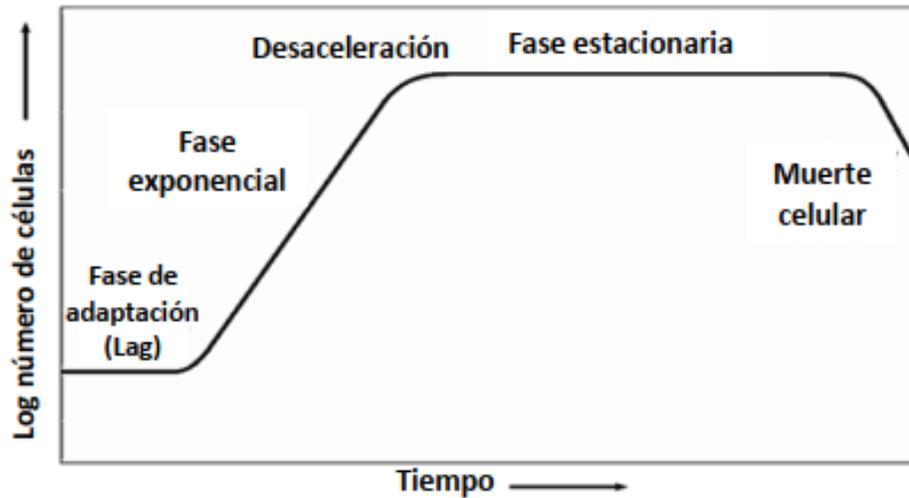


Figura 1.2 Curva de crecimiento del ciclo bacteriano (Romero-Mota, 2018).

Los microorganismos tienen una tasa de consumo de sustrato y generación de producto que está dada por la velocidad específica que le corresponde a esta, así mismo, brindan información sobre el proceso y estado físico de los microorganismos.

1.5.1 Ecuación de Monod

En el año 1940, Jacques Monod propuso una ecuación que se relaciona la velocidad específica (μ) con el límite de sustrato (S), que ahora se conoce como la ecuación de Monod.

Esta ecuación describe que a concentraciones de sustrato pequeñas μ tiene una variación, sin embargo, con mayores concentraciones de sustrato μ es asilado de la concentración de sustrato, lo anterior está representado matemáticamente como lo indica la Ecuación 1.1

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_s + [S]} \quad (1.1)$$

Donde μ es la velocidad específica (h^{-1}), K_s es la constante de saturación media (g/L), μ_{max} la velocidad máxima que puede crecer un microorganismo (h^{-1}), y $[S]$ es la concentración de sustrato (g/L).

μ_{max} tiene que ver con el tiempo que conlleva un organismo en replicarse. Este periodo de tiempo se conoce como periodo de replicación (t_D) y está relacionado con μ cómo se representa en la Ecuación 1.2.

$$t_D = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (1.2)$$

Para la modelación de cinética de consumo de sustrato se relaciona con el crecimiento del microorganismo, de esta manera se aplica el coeficiente de rendimiento $Y_{x/s}$ que se define como la cantidad de microorganismos que se desarrollan por unidad de sustrato consumido (Ecuación 1.4).

$$Y_{x/s} = \frac{x-x_0}{S_0-S} \quad (1.4)$$

Donde X_0 y S_0 corresponden a las concentraciones iniciales de biomasa y sustrato. $Y_{x/s}$ puede aplicarse para relacionar la tasa de consumo de sustrato con la tasa de crecimiento del microorganismo utilizando la Ecuación 1.5

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} * \frac{dX}{dt} \quad (1.5)$$

En la Tabla 1.6 se observan algunos ejemplos de valores de microorganismos para μ y t_D en comparación con células animales y vegetales.

Tabla 1.6 μ_{max} y en t_D diferentes células y microorganismos.

Microrganismos/células	μ_{max}	t_D
Bacterias	0.6-1.4	0.5-1.15
Levaduras y hongos filamentosos	0.2-0.6	1.15-3
Células animales	0.01---0.04	17-70
Celulas vegetales	0.007-0.03	23-100

1.6 Modelos cinéticos

Según Ferrando *et al.* (2017), un modelo es un conjunto de ecuaciones que describe como varios sucesos que están relacionados con un proceso actúan conjuntamente para regular el rendimiento.

La definición de un modelo cinético por Pérez–Arencibia (2022), sostiene que están surgiendo teorías para explicar cómo factores ambientales tales como, la temperatura, el pH y la actividad del agua afectan al crecimiento de los microorganismos. Otros factores que pueden tenerse en cuenta son la atmósfera gaseosa o el potencial redox, la humedad relativa, el contenido de nutrientes y las propiedades antibacterianas. Los modelos que se desarrollan para explicar cómo varía el crecimiento de los microorganismos en función

de factores ambientales como la temperatura, el pH y la actividad del agua se conocen como modelos cinéticos. Lo mismo ocurre con otras variables como la atmósfera gaseosa o el potencial redox, la humedad relativa, el contenido en nutrientes y las propiedades antibacterianas.

Estos modelos son útiles para describir cómo cambia el comportamiento de los microbios durante el procesado o el almacenamiento, pero son difíciles de construir, ya que requieren una cantidad significativa de datos de muestras del microorganismo. En la literatura científica existen diversos modelos cinéticos que explican el desarrollo microbiano entre los cuales resaltan, Gompertz y logístico. De acuerdo a lo indicado por (Estrada-García *et al.*, 2023), el modelo logístico con tres parámetros es representado a continuación por la Ecuación 1.3

$$y_A = \frac{a}{1 + \exp(-K_s(t - T_i))} \quad (1.3)$$

La modelización con la ecuación de Gompertz se realizó de acuerdo a la Ecuación 1.4

$$y_A = a \times \exp(-\exp(-K_s(t - T_i))) \quad (1.4)$$

Donde y_A es $\log N_t/N_0$, es la mayor concentración celular (\log_{cel}/mL), K_s es el coeficiente de velocidad de crecimiento, t es el tiempo transcurrido, y T_i representa el tiempo máximo de crecimiento microbiano.

Estos modelos han sido aplicados dentro de la investigación (Estrada-García *et al* 2023), donde estudió la influencia del proceso de biotransformación anaerobia de residuos agroindustriales con *Lactobacillus acidophilus* sobre los parámetros reológicos utilizando estiércol de cerdo, realizó un estudio y comparación de 3 modelos para determinar sus parámetros cinéticos.

1.7 Estudios previos

Kwan *et al.*, (2017), evaluaron el rendimiento de la fermentación del ácido láctico y las características de *Streptococcus thermophilus* YI-B1 y *L. casei shirota* mediante modelos no estructurados que incluyen inhibiciones del sustrato y producto en un medio semi definido. Reportaron que el crecimiento celular se detuvo a 300 g/L de glucosa, 320 g/L de fructosa y 101.1 g/L de ácido láctico por *L. casei Shirota*, mientras que en el caso de *S. thermophilus* YI-B1 fueron 180 g/L para glucosa y 49.9 g/L para ácido láctico. Utilizaron la expresión de Monod modificada no estructurada para predecir el proceso de fermentación. Los valores obtenidos para los modelos ajustados fueron 0.95 para *L. casei Shirota* y 0.80 para *S. thermophilus* YI-B1. Dado que *L. casei Shirota* era más tolerante que *S. thermophilus* YI-B1.

Honorio-Briones (2019), realizó un estudio para determinar el impacto de diversas concentraciones de partida de enzimas reductoras de azoles y extracto de levadura en la producción de polihidroxitirato por *Bacillus sp.* B23 a partir de residuos de cervecera. El medio de cultivo se desarrolló a partir de BSG y levadura cervecera sobrante del proceso cervecero, y se utilizó un diseño experimental central rotatorio para estudiar los efectos de las variables sobre la producción de PHB y maximizar el contenido volumétrico y de PHB del microorganismo mientras se utilizaba la levadura cervecera sobrante como única fuente de nutrientes.

Bianco *et al.* (2020), describen en su investigación la importancia de los microorganismos en la explotación de BSG para producir enzimas de interés y metabolitos, con un enfoque en humanos, dietas para animales, y mejoramiento de la fertilidad del suelo, demuestra que el potencial de los microorganismos empleados como biocatalizadores es esencial para su reciclaje y aprovechamiento, en su examen bibliográfico plantea el uso de BSG como sustrato para el crecimiento microbiano en la producción de proteínas unicelulares con la finalidad de mejorar sus propiedades tecno-funcionales, y para aumentar su valor comercial, con estas alternativas se obtiene como consecuencia positiva la reducción de huella de carbono bajo el concepto de economía circular.

Díaz-Gutiérrez (2020), utilizó un proceso de pretratamiento e hidrólisis alcalina de la raíz de yuca para producir un sustrato apto para *Lactobacillus casei*. El pretratamiento se realizó a 40 °C con NaOH a 0.0, 0.03 y 0.05 N durante 1 h; los resultados se evaluaron por la producción de azoles reductasas durante la hidratación alcalina; el mejor pretratamiento se realizó a 0.03 N a 40 °C durante 1 h; la hidratación de la fracción sólida se realizó con 200 mL de NaOH a (0.0, 0.1 y 0.05 N)., en un periodo de 75 minutos para la fase sólida, obteniéndose una suspensión que contenía 343 mg/L de azoles reductasas (DNS) con una conversión del 50.01% de la biomasa, lo que demuestra la viabilidad de las suspensiones obtenidas tras el pretratamiento y la hidrólisis de alanina para *L. casei*.

Barampouti *et al.* (2021) emplearon una investigación sobre la producción de biodiésel y bioetanol a partir del tratamiento combinado de dos tipos de residuos agrícolas (residuos de la fabricación de cerveza, BSG, y posos de café, SCG), paliando al mismo tiempo los efectos de la contaminación atmosférica y sus problemas de tratamiento y gestión. Optimizando la viabilidad técnica de la extracción de aceite y la producción de etanol a escala de laboratorio. Se llevó a cabo un tratamiento que implica la alcalinización de SCG y BSG, la dilución de sus ácidos, la neutralización de las soluciones mixtas, el barrido enzimático y la fermentación etanólica que da lugar a la producción de bioetanol.

Una investigación realizada por Estrada-García *et al.* (2023) reportaron el monitoreo de los parámetros reocinéticos en la bioconversión de porcinoza y RAC como sustratos, con el fin de analizar el efecto de la velocidad de agitación y la configuración del reactor en la conversión de ácido láctico y cultivo de *L. acidophilus*, para una cinética de 100 rpm el consumo de carbohidratos a las primeras 24 h fue de 21.09 % y continuó hasta las 72 h, respecto a la producción de AL incrementó de manera acelerada alcanzado al final de la prueba una cantidad de 54.16 g/L, consumiéndose para este punto un 94.16 % del sustrato. Por otro lado, la máxima cantidad de microorganismos presentes fue de 8.1279 Log (cel/mL) o bien 1.33×10^8 cel/mL.

Se cuenta con una investigación por Rocafuerte-Peña (2022) donde desarrolló un proceso de bioconversión de los residuos provenientes de café mediante la acción anaerobia fermentativa de lactobacilo (*Bacillus subtilis*) a partir de cinéticas en las cuales se evaluaron: la remoción de carbohidratos, la producción de ácido láctico, el crecimiento bacteriano y la generación de biomasa. Se logró la producción de 8.4 g/L de ácido láctico y se removieron hasta 23.27 g/L de carbohidratos. Se consiguió la propagación de *Bacillus subtilis* de hasta 2.83×10^8 UFC/mL utilizando residuos de café logrando generar hasta 7.223 g/L de biomasa. Se concluyó que el pergamino de café es un material susceptible para la propagación de *Bacillus subtilis*. Además, la fermentación anaerobia probó ser una alternativa para tratar este residuo de café y así mismo se puede evitar la disposición descontrolada de residuos sólidos.

Sánchez-Valeriano *et al.*, (2022) evaluaron el proceso de biotransformación de residuos de maíz blanco mediante fermentación anaeróbica utilizando la bacteria *Bacillus subtilis* a distintas concentraciones de inóculo (5, 10 y 15%), utilizando el modelo de Hom para obtener parámetros cinéticos. Los parámetros evaluados fueron la concentración de carbohidratos y la producción de biomasa durante el transcurso de las cinéticas. Los resultados obtenidos mediante esta investigación demostraron que la utilización de un inóculo del 5% mejora la aglomeración bacteriana y aumenta la tasa de consumo de sustrato. El valor de m y k^* fueron de 0.5330 y 0.05928 respectivamente, lo que sugiere un mejor acondicionamiento de la bacteria *Bacillus subtilis* en el sustrato y una velocidad de consumo más rápida que las demás concentraciones de inóculo (10 y 15 %). Sin embargo, hubo un mayor consumo de carbohidratos al usar el inóculo de 15 %, donde también se presentó la mayor velocidad de crecimiento de la bacteria de acuerdo con el parámetro cinético μ obtenido por la ecuación de Monod.

Baiano *et al.*, (2023) investigaron el uso de BSG como componente funcional en la preparación de pan. Se distinguieron por su composición y origen (dos lugares de cultivo de cereales) las tres mezclas de malteada cebada y durum no blanqueado, blando o emmer (Da, Ri y Em) que componen la BSG. Para evaluar los efectos de las sustituciones

sobre la calidad global y las características funcionales del pan, se añadieron dos proporciones diferentes de cada harina, BSG y gluten. El análisis de componentes principales agrupó la BSG por tipo y origen y los panes en tres grupos: el pan de control, con valores altos de desarrollo de miga, volumen específico, altura mínima y máxima, y cohesividad; y los panes Em, con valores altos de IDF, TPC, crujiente, porosidad, fibrosidad y olor. Y el grupo de panes Ri y Da, que presenta valores más altos de intensidad de sabor global, tamaño de los poros, grosor de la corteza, calidad global y TPC medio. De acuerdo con estos resultados, los panes Em presentaron las mayores concentraciones de nutraceuticos, pero la menor calidad global. La mejor opción fue utilizar los panes Ri y Da (contenido intermedio de fenoles y fibras y calidad global comparable a la del pan de control), calidad global comparable a la del pan de control. Las aplicaciones prácticas incluyen la conversión de las fábricas de cerveza en instalaciones de biorrefinería que pueden convertir los BSG en ingredientes de alto valor y mínimamente nocivos. La utilización de la BSG en un sentido amplio en aumentar la producción de productos alimentarios básicos y la investigación de fórmulas alimentarias que puedan venderse con declaraciones de propiedades saludables.

Romero-Mota *et al.*, (2023) realizaron un estudio para determinar la cinética de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* durante la bioconversión anaerobia de ASW, que se llevó a cabo en un reactor de metal inerte a escala de laboratorio con una capacidad de 5 L a diferentes velocidades de agitación de 100, 150 y 200 rpm durante 72 h. Los parámetros cinéticos de crecimiento se obtuvieron utilizando los modelos de Gompertz, Gompertz generalizado y logístico. Se calculó un máximo de 0.22 h^{-1} utilizando una concentración inicial de carbohidratos de 58.46 g L^{-1} a 100 rpm. Esto resultó en la producción de $54.16 \text{ g LA L}^{-1}$ ($0.87 \text{ g LA g carbohidrato}$) y $154.65 \text{ g biomasa L}^{-1}$. Demostraron que los valores de los parámetros cinéticos para la biotransformación anaerobia de residuos de caña de azúcar permiten sugerir condiciones de operación para maximizar la producción de LA y biomasa y representan un método atractivo para obtener productos de alto valor agregado en ambas fases del producto final, lo cual se logra sin la producción de gases de efecto invernadero.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología experimental

En esta sección se presenta la metodología realizada para el proceso de obtención de biomásas empleando microorganismos probióticos para cumplir con los objetivos establecidos para esta investigación. En la Figura 2 se puede observar las etapas del proceso a lo largo de esta investigación.

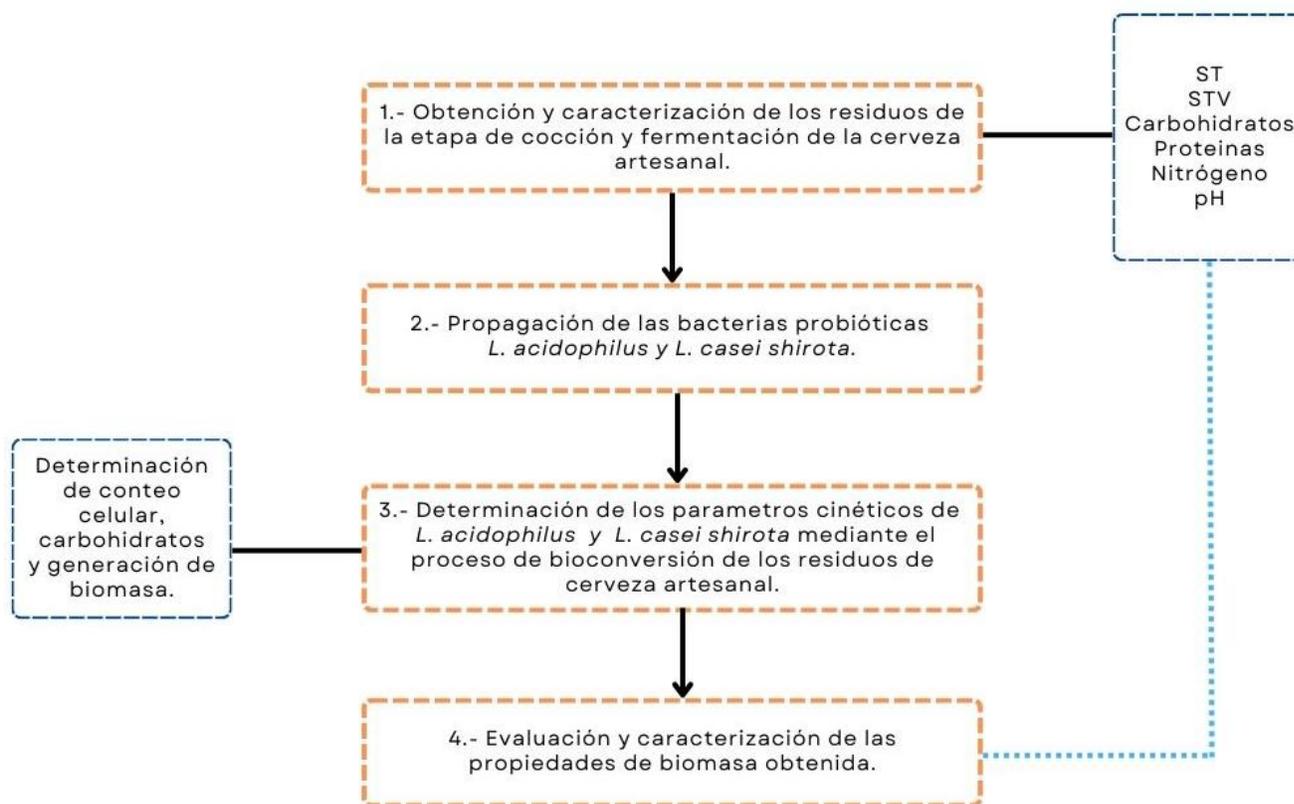


Figura 2.1 Diagrama general de la metodología para el proceso de obtención de biomásas a partir de residuos de cerveza artesanal mediante la acción fermentativa de *Lactobacillus casei shirota* y *Lactobacillus acidophilus*.

2.2 Obtención y caracterización del sustrato

Los residuos de cerveza artesanal fueron proporcionados por la cervecería Altas Cervezas Brewing Co., ubicada en la ciudad de Orizaba, Veracruz. Posterior a su recolección se realizó un proceso de secado en un periodo de tiempo de 24 h utilizando una estufa de secado a una temperatura de 105 °C. realizado el secado se continua con la molienda del residuo con la finalidad de disminuir el tamaño de partícula y obtener una consistencia de polvo, para esto fue necesario aplicar un proceso de tamizado utilizando una malla 50.

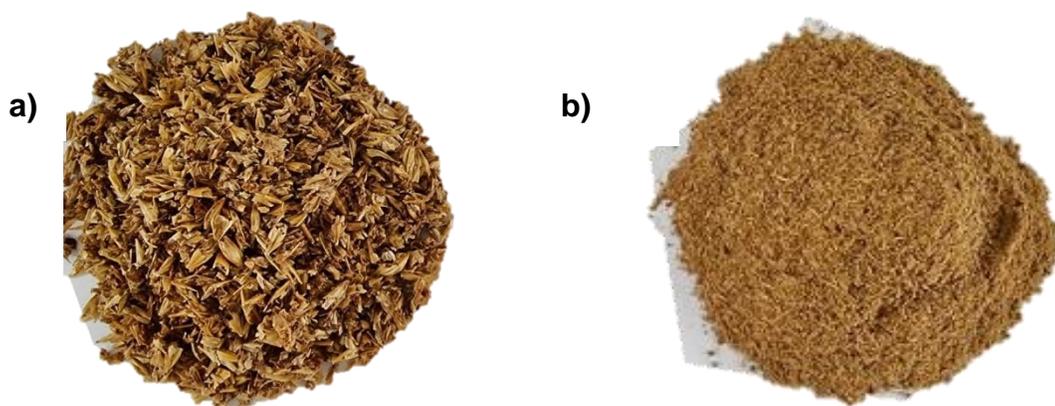


Figura 2.2 a) residuo de cerveza artesanal, b) residuo de cerveza artesanal tamizado.

2.3 Caracterización fisicoquímica del residuo.

Se realizó la caracterización fisicoquímica a los residuos de cerveza artesanal, con la intención de conocer su composición, propiedades y los niveles de contaminantes de este. En la Tabla 2.1 se presentan los parámetros evaluados, así como también el método utilizado en el cual se realizó cada análisis. Además, se realizó la lectura de los grupos funcionales presentes para analizar la degradación de compuestos lignocelulósicos,

mediante espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum Two.

Tabla 2.1 Parámetros fisicoquímicos del residuo.

Parámetro	Unidad	Método
Sólidos totales	%m/m	2540 B Standard Methods
Sólidos totales volátiles	% m/m	2540 B Standard Methods
Carbohidratos	g/L	Antrona-Sulfúrico
Proteínas*	%	Micro Kjeldahl
Nitrógeno*	mg/kg ST	4500-NTK C SM
pH	----	Potenciómetro

* Base seca

2.3.1 Determinación de pH

Para cada muestra obtenida se realizó la determinación de pH, utilizando un potenciómetro de la marca Orión (modelo 250). Esta prueba se realiza para determinar las concentraciones de iones de hidrogeno presentes en una disolución, además, es importante el monitoreo de este parámetro para ajustar el medio y mantener el pH según sea necesario.

2.3.2 Determinación de ST

Las muestras se sometieron a evaporación en estufa calorífica para determinar los Sólidos Totales (ST), según el método estándar 2540 G de la APHA-AWWA-WPFC (2017). Las muestras se evaporaron en un crisol que previamente había mantenido un peso constante durante 24 horas a 103 – 105 °C. Finalmente, se completó el cálculo con la Ecuación 2.1.

$$\%ST = \frac{P_3 - P_1}{P_2} * 100 \quad (2.1)$$

Donde:

P_1 = Peso del crisol a peso constante

P_2 = Peso de la muestra antes de evaporarse (sin considerar el peso del crisol)

P_3 = Peso del crisol a peso constante + peso del residuo seco

2.3.3 Determinación de STV

Los sólidos totales volátiles (STV) se calcularon utilizando la misma metodología estándar 2540 G. La muestra seca obtenida previamente (Sólidos totales) se sometió a un cálculo termoquímico a 550 °C durante 2 h, y el porcentaje de STV se calculó mediante la ecuación 2.2.

$$\%STV = \frac{P_3 - P_4}{P_3 - P_1} * 100 \quad (2.2)$$

Donde:

P_1 = Peso del crisol a peso constante

P_3 = Peso del crisol a peso constante + peso del residuo seco

P_4 = Peso del crisol a peso constante + peso de la muestra calcinada

2.3.4 Determinación de Nitrógeno total

Para la determinación del nitrógeno total se empleó el método micro Kjeldahl el cual consiste en tomar una muestra que contenga entre 0.02-0.05 mg, añadiendo una pizca catalizadora de selenio en polvo, 0.5 g de sulfato de potasio, 0.2 g de sulfato de cobalto y 3 ó 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, tras dejar digerir la muestra hasta que adquiría una tonalidad verde o azul turquesa, en ese momento se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente para después ser sometida a destilación (en un destilador micro-Kjeldahl), a la que se añadían aproximadamente 15 mL de peróxido de hidrógeno a una concentración del 40%. A continuación, el destilado se recogió en un

recipiente para precipitados que contenía 10 mL de ácido bórico a una concentración del 4% y una gota de indicador rojo-azul de metileno (el cual presentaba una tonalidad lila).

La destilación finaliza cuando hay 40 mL en el recipiente receptor o cuando el color cambia a verde claro. Por último, se titularon las muestras con ácido sulfúrico al 0.1 N y se registró la cantidad de ácido utilizada para aplicar la ecuación 2.3.

$$\%N = \frac{G * N * 0.014}{M} * 100 \quad (2.3)$$

Donde:

G = Volumen gastado del ácido sulfúrico

N = Normalidad de la solución en la titulación

M = Peso de la muestra

2.3.5 Determinación de proteínas

Las macromoléculas conocidas como proteínas son moléculas orgánicas extremadamente pesadas que están compuestas principalmente de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Son cruciales para el desarrollo de muchos procesos clave. Para determinar la cantidad de proteínas de la muestra se utilizó el método Kjeldahl, con el % N y el factor de conversión 6.25 mediante la Ecuación 2.4

$$\%P = \%N * F \quad (2.4)$$

Donde:

$\%N$ = Porcentaje de nitrógeno

F = Factor de conversión (6.25)

2.3.6 Determinación de carbohidratos

Para determinar la cantidad de carbohidratos presentes se utilizó el método Antrona-Sulfrico. Este método implicó la dilución de la muestra a una proporción de 1:25, posterior a este momento se añadieron 0,5 mL de la muestra y 2 mL de la solución antrona-sulfrico. La solución se prepara justo antes de su uso disolviendo 1 g de antrona en polvo en 760 mL de ácido sulfúrico concentrado y aforada a 1 L haciendo uso del agua destilada, esto debe hacerse en un baño con hielo ya que el tipo de reacción que se presenta en el transcurso de este proceso es exotérmico.

Las muestras se sometieron a calentamiento a 98 °C durante 12 minutos tras la adición de la solución. Por último, se dejaron enfriar para poder leer la absorbancia con un espectrofotómetro de la marca Thermo Scientific modelo Genesys 20 a una longitud de onda de 620 nm. Para poder determinar la absorbancia en el espectrofotómetro fue necesario preparar un blanco mediante 0.5 mL de agua destilada y 2 mL de antrona.

2.4 Obtención y propagación de *Lactobacillus*

2.4.1 Propagación de la bacteria probiótica *Lactobacillus casei*

La bacteria *L. casei* se obtuvo del producto comercial el cual es una bebida probiótica que contiene este microorganismo permitiendo la inhibición de patógenos en el intestino entre otros beneficios para la salud.

Se usó medio de cultivo agar MRS el cual es un medio de cultivo que permite el aislamiento y recuento de Lactobacilos entre otras BAL. Se preparó 250 mL de agar MRS previamente esterilizado a 121 °C en autoclave en un periodo de 20 minutos. El medio se vertió en una caja Petri previamente esterilizada, todo esto en un espacio estéril dentro de una campana de flujo laminar, posterior a esto la caja Petri fue almacenada en una estufa de cultivo, los parámetros para la incubación fueron un periodo de 24-72 h a un rango de temperatura de 35-37 °C.

2.4.2 Propagación de la bacteria probiótica *Lactobacillus acidophilus*

La bacteria *L. acidophilus* se obtuvo de un medicamento comercial (ver figura 2.4) elaborado por la empresa Gelphamarma S.A de C.V. Este producto es un medicamento el cual contiene *L. acidophilus* en una alta concentración en presentación de capsulas, además de aceite de soya, lectinina de soya, vitamina E y aceite vegetal hidrogenado.



Figura 2.3 Medicamento comercial con *L. acidophilus*

Para la propagación de esta cepa se utilizó como medio de cultivo caldo MRS el cual es un medio apropiado para el enriquecimiento de *L. acidophilus*. Se preparó 1 L de caldo MRS, posterior a esto se esterilizó en autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121 °C este medio es útil para el crecimiento de esta bacteria debido a que proporciona los nutrientes necesarios para su desarrollo.

2.5 Determinación de los parámetros cinéticos de *L. casei* y *L. acidophilus*

A continuación, se presenta el monitoreo que se realizó a lo largo de las cinéticas de fermentación obteniendo los parámetros cinéticos a partir del proceso de bioconversión de residuo de cerveza artesanal.

2.5.1 Proceso de fermentación

Realizada la propagación de las especies probióticas correspondientes a *L. case* y *L. acidophilus* se inició con el proceso cinético de fermentación, para esto, se utilizaron 6 biorreactores con una capacidad de 250 mL, el volumen útil que se ocupó fue de 190, 180 y 170 mL relacionado a las concentraciones (4, 6 y 8 % p/p) de sustrato. A continuación, se adicionó el inoculo de las bacterias probióticas a diferentes concentraciones (5, 10 y 15 % v/v). Para dar inicio con el proceso fermentativo los biorreactores se colocaron en una incubadora de modelo ZHWY-100B a una temperatura constante (36 °C) la cual estuvo en agitación a 110 rpm durante un periodo de 72 h, este fue monitoreado tomando una muestra cada 8 h.

Tabla 2.2 diseño experimental

Experimento	Bacteria	%sustrato	%inoculo
1	1	4	5
2	1	4	10
3	1	4	15
4	1	6	5
5	1	6	10
6	1	6	15
7	1	8	5
8	1	8	10
9	1	8	15
10	2	4	5
11	2	4	10
12	2	4	15
13	2	6	5
14	2	6	10
15	2	6	15
16	2	8	5
17	2	8	10
18	2	8	15

Se aplicó un diseño experimental 3^2 con 1 replica, considerando como variables independientes las especies probióticas (*L. casei* y *L. acidophilus*) variando el porcentaje de sustrato (4, 6 y 8 % p/p) así como el porcentaje de inóculo (5, 10 y 15 % v/v). Los carbohidratos, producción de biomasa y conteo celular son las variables de respuesta establecidas para este diseño experimental. Por medio de este diseño de experimentos se puede realizar un análisis sobre la relación existente entre la especie probiótica y el sustrato a lo largo del proceso de bioconversión. En la Tabla 2.2 se presenta el diseño experimental utilizado mediante el software minitab 18.

2.5.2 Determinación de biomasa

La producción de biomasa se llevó a cabo por el método de peso seco, el cual se fundamenta en centrifugar 10 mL de muestra en un periodo de tiempo de 10 minutos a una velocidad de 10,000 rpm utilizando una centrifuga marca HERMLE-Lubnet modelo Z323. Con posterioridad se colocaron crisoles a peso constante y se dejó secar la muestra durante 4 h a 95 °C. El resultado se obtuvo en g/L.

2.5.3 Conteo celular

El proceso de conteo se realizó mediante la técnica de placa vertida, esto con el fin de poder contabilizar el crecimiento bacteriano en unidades formadoras de colonia (UFC). Se realizaron diluciones en serie base 10 de cada muestra para facilitar el conteo, utilizando 4.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de la muestra. El medio de cultivo que se empleó fue agar MRS, con las cajas Petri previamente esterilizadas se vertió 1 mL de la dilución y 10 mL del medio agar colocándolas en la estufa de cultivo en un periodo de 24 h. Se utilizó la ecuación 2.5 para la determinación del cálculo de concentración de bacterias.

$$\frac{UFC}{mL} = \text{colonias contadas} * \text{factor de dilución} * \text{volumen de inóculo} \quad (2.5)$$

2.6 Determinación de parámetros cinéticos

Considerando los datos obtenidos mediante el conteo celular, se ajustaron al modelo de Gompertz (Ecuación 2.6).

$$y_A = a \times \exp(-\exp(-K_s(t - T_i))) \quad (2.6)$$

Donde:

y_A : es $\log N_t/N_0$, es la mayor concentración celular (\log_{cel}/mL),

K_s : es el coeficiente de velocidad de crecimiento,

t : tiempo transcurrido (h)

T_i : representa el tiempo máximo de crecimiento microbiano.

2.7 Consumo de sustrato

Para obtener los parámetros cinéticos k^* y m , se utilizó el modelo Hom. Dado que el consumo de carbohidratos es un buen indicador de cómo se comportarán las bacterias. Para ello se utilizó la ecuación 2.7. Es importante señalar que se utilizó la herramienta GraphPad para obtener los parámetros cinemétricos.

$$\text{Log} \frac{C}{C_0} = -k^* \cdot t^m \quad (2.8)$$

C = Concentración de carbohidratos en el tiempo (g/L)

C_0 =Concentración inicial de carbohidratos (g/L)

k^* = velocidad de consumo de sustrato

m = constante de Hom

2.8 Caracterización de la biomasa obtenida

Al término de las cinéticas, se realizó la caracterización de la biomasa obtenida durante el proceso de fermentación, esto con el fin de conocer la calidad y su potencialidad, para ello se determinaron los parámetros descritos en la tabla 2.3 con su respectivo método aplicado durante este trabajo.

Tabla 2.3 Caracterización fisicoquímica de la biomasa

Parámetro	Unidad	Método
Sólidos totales	%m/m	2540 B Standard Methods
Carbohidratos	g/L	Antrona-Sulfúrico
Proteínas*	%	Micro Kjeldahl
Nitrógeno*	mg/kg ST	4500-NTK C SM
Conteo celular	UFC	Placa vertida

*Base seca

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de las etapas que conforman la metodología experimental de esta investigación, los resultados son presentados en la misma secuencia que el capítulo anterior.

3.1 Caracterización fisicoquímica del residuo

En la Tabla 3.1 se presentan los resultados obtenidos en la caracterización del residuo de cerveza artesanal obtenida de una cervecera de la región de Orizaba, cada parámetro presente en la tabla se realizó a partir de la muestra y su réplica. Se puede observar el valor de los ST y STV de 94.43 y 92.83 respectivamente, similares a lo reportado por Glowacki *et al.*, (2022) quienes obtuvieron ST de 91.02 y STV de 77.70 según el caso estudiado.

Tabla 3.1 caracterización fisicoquímica del residuo.

Parámetro	Unidad	Residuo BSG
Sólidos totales	%m/m	91.43
Sólidos totales volátiles	% m/m	84.87
Carbohidratos	g/L	14.801
Proteínas*	%	11.29
Nitrógeno*	mg/kg ST	1.80
pH	----	5

*Base seca

Se observó que el pH que se obtuvo fue 5, este valor se encuentra dentro del rango óptimo para el desarrollo de *L. casei* y es un valor similar a lo reportado por (Wang *et al.*, 2021) el cual reporta un valor de 4.5 - 6. Además, algo que caracteriza a este género es el amplio rango de tolerancia al pH ya que se ha reportado que algunas cepas son capaces de crecer a un pH de 3.2 y hasta 9.6 (Romero-Mota 2019).

La presencia de los tres principales componentes de la materia orgánica, carbohidratos, proteínas y nitrógeno también se midieron como parte de la caracterización química. Se

contabilizaron carbohidratos con un valor de 14.801 g/L, seguidos de proteínas con un 11.29 % el cual se encuentra dentro del rango para este sustrato de acuerdo con lo reportado por (Milew *et al.*, 2022) y nitrógeno con 1.80 mg/kg ST.

De acuerdo a lo obtenido en la caracterización del residuo es importante destacar que cumplen con los requerimientos para el crecimiento de estas cepas probióticas, ya que se requiere una mezcla equilibrada de nutrientes (fuentes de carbono, nitrógeno y factores de crecimiento) que en porcentajes de concentraciones adecuadas y condiciones físicas optimas permitan el adecuado crecimiento de los microorganismos (De la Rosa *et al.*, 2023).

3.2 obtención y propagación de bacterias probióticas *L. casei* y *L. acidophilus*

Las bacterias probióticas se obtuvieron de productos comerciales, por lo que se realizó un aislamiento de cepa en cajas Petri aplicando la técnica de placa vertida con agar MRS como medio de cultivo, el cual es viable para el enriquecimiento y desarrollo de las bacterias probióticas que se utilizaron en este trabajo de investigación.

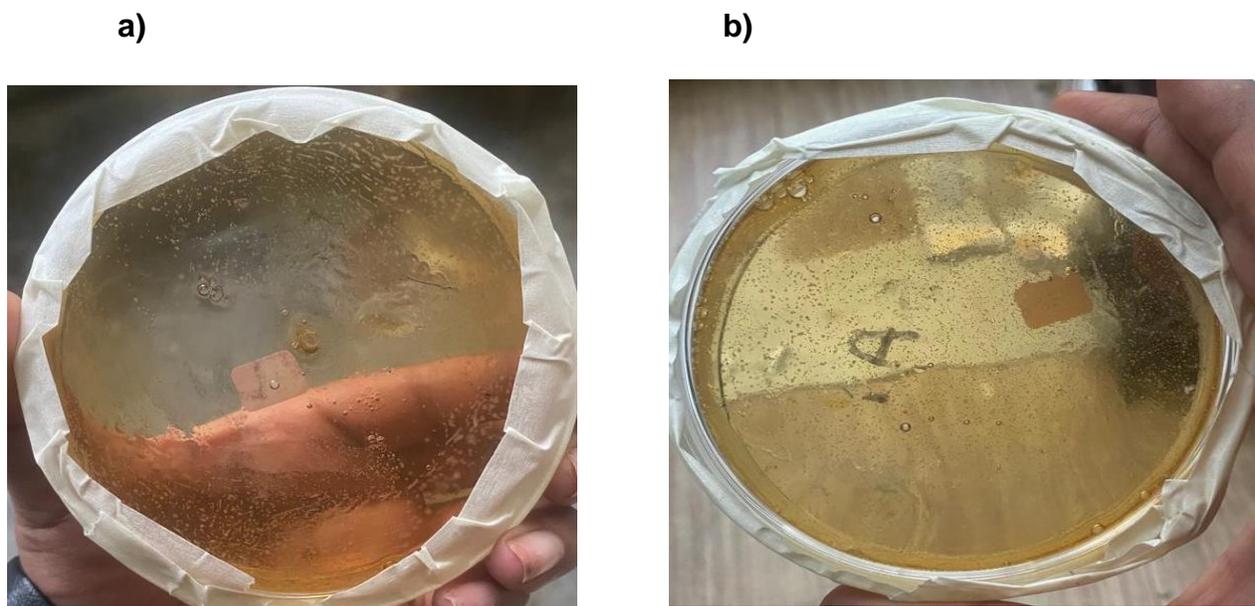


Figura 3.1 a) aislamiento de *L. casei*, b) aislamiento de *L. acidophilus*

Concluido el aislamiento de la cepa, se realizó la propagación en medio liquido utilizando caldo MRS, se utilizaron tubos de ensayo previamente esterilizados para la propagación

de ambas bacterias. En la Figura 3.1 se puede observar el resultado de la propagación en medio líquido para *L. casei* y *L. acidophilus*.

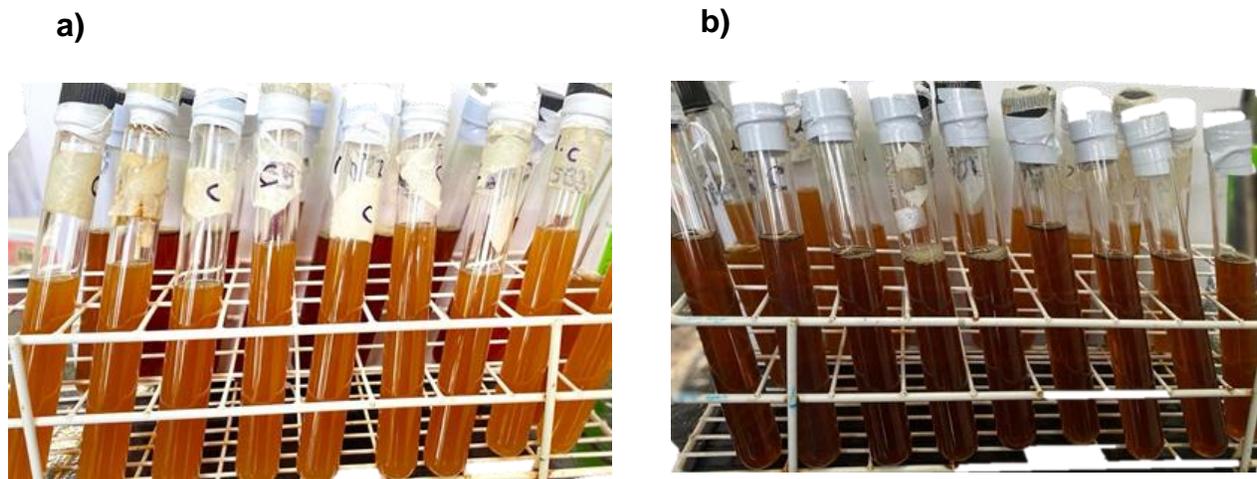


Figura 3.2 a) propagación *L. casei*, b) propagación *L. acidophilus*

3.3 Cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus casei* mediante la conversión de BSG

En las siguientes secciones se presentan los resultados de las cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato correspondiente a *L. casei*, utilizando el modelo cinético de Gompertz con la intención de comprender el comportamiento microbiano en un entorno determinado y así mismo prever su desarrollo en función del sustrato disponible.

3.3.1 Cinéticas de crecimiento de la especie *L. casei*

En la Figura 3.3 se muestran las cinéticas de crecimiento de *L. casei* correspondientes a 4 % p/p de sustrato a diferentes concentraciones de inóculo de 5,10 y 15 % v/v. Se observa que se inició con una concentración de carbohidratos de 14.80 g/L, 16.26 g/L y 16.49 g/L respectivamente, logrando consumir en su totalidad el sustrato a partir de la hora 52, a actividad de degradación de carbohidratos presente en este caso de estudio refuerza la idea de (De Oliveira *et al.*, 2021) demostrando que la principal característica de las BAL es la capacidad de fermentar los carbohidratos para formar ácidos orgánicos,

entre otros compuestos, siendo esta, su fuente preferida de carbono que incluye a los compuestos lignocelulósicos presentes en el sustrato utilizado. Por otra parte, las concentraciones iniciales de microorganismos fueron de 7.39, 7.65 y 7.75 LogCel/mL correspondientes a cada concentración de inóculo evaluado en este caso de estudio, logrando una máxima concentración de 8.02, 7.89 y 8.01 Log Cel/mL respectivamente.

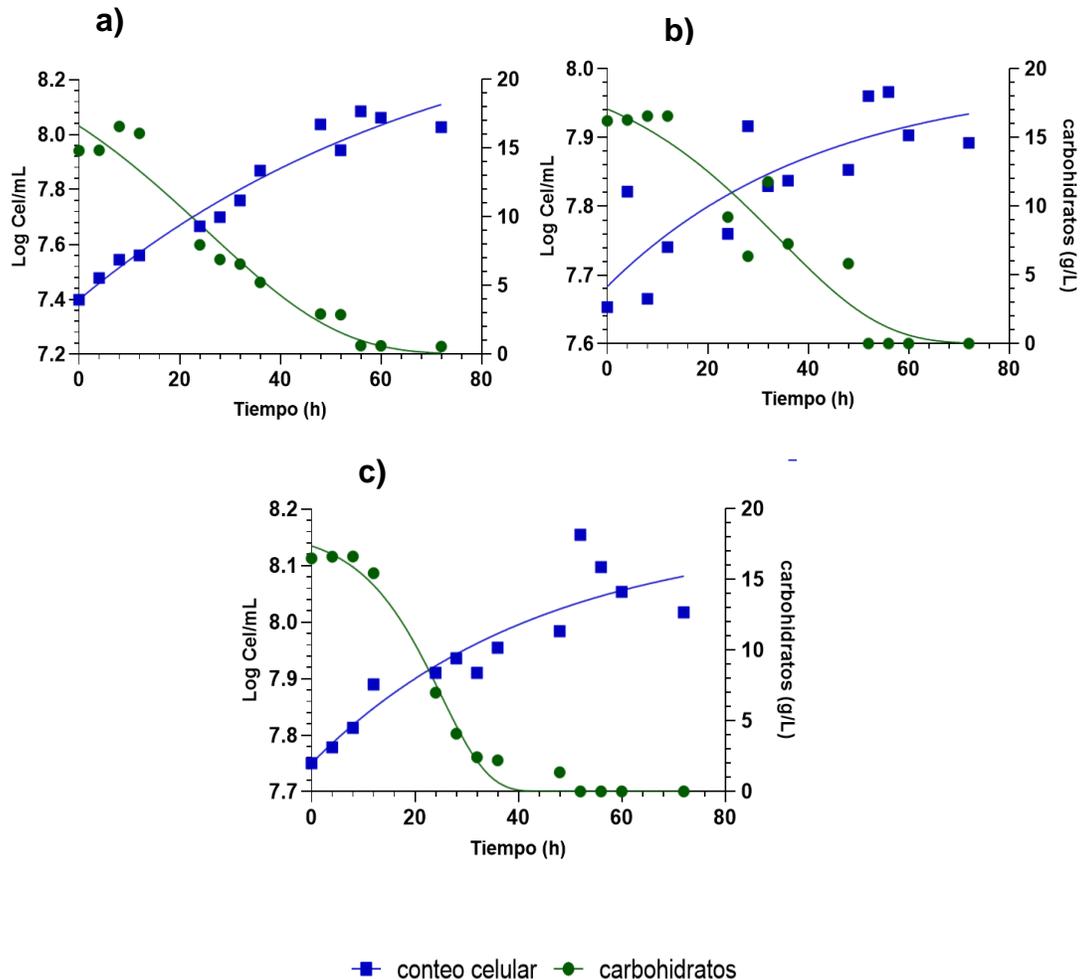


Figura 3.3 Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con *L. casei* a 4 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.

En la Tabla 3.2 se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento para *L. casei* a lo largo del proceso fermentativo en sus tres concentraciones de sustrato e inóculo, se puede observar que respecto al 4 % p/p de sustrato, los valores de la velocidad máxima de crecimiento fueron similares para las tres concentraciones de inóculo, obteniendo un valor de 0.01 h^{-1} respectivamente. El menor tiempo de adaptación del microorganismo durante el proceso fermentativo se encontró en el experimento de 5 % de inóculo, obteniendo un valor de $\lambda = 2.97 \text{ h}$, el tiempo de latencia que se obtuvo en este caso de estudio, fue menor en comparación a lo reportado por (Sharma *et al.*,2022) quienes realizaron un monitoreo de adaptación de la cepa *Lactobacillus plantarum* CRA52 en medio de cultivo MRS. De esta manera se puede observar, que *L. casei* tiene un menor tiempo de adaptación utilizando el residuo de cerveza artesanal como sustrato.

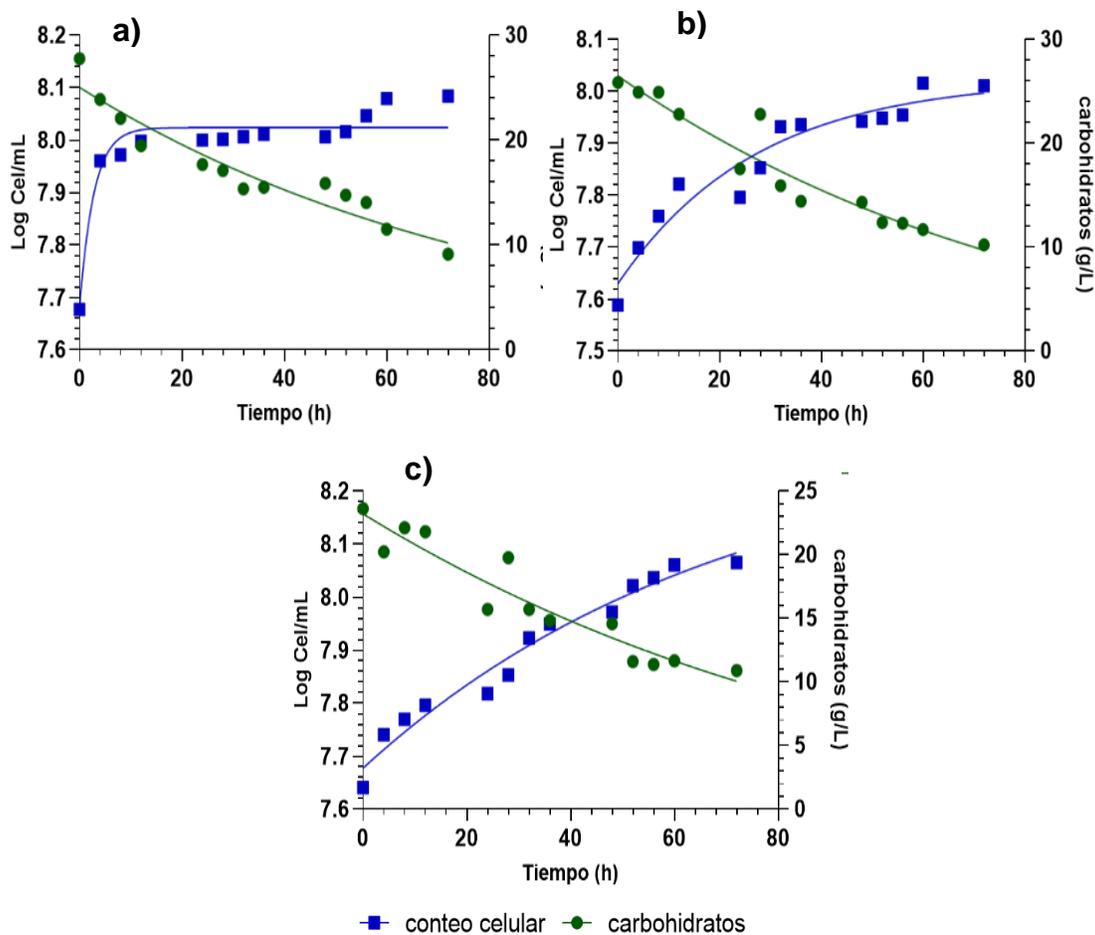


Figura 3.4 Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con *L. casei* con 6 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.

Las cinéticas de crecimiento de *L. casei* correspondientes a un porcentaje del 6 % p/p de sustrato, se muestran en la Figura 3.4. Se observa que el consumo de carbohidratos fue similar a los tres experimentos, ya que, a las 24 h se había consumido 17.66, 17.53 y 15.70 g/L en las pruebas con 5, 10 y 15 % respectivamente, sin embargo, en ninguno de los tres experimentos el sustrato llega a consumirse por completo. En cuanto al crecimiento celular, los valores máximos de concentración fueron de 8.08, 8.01 y 8.06 Log Cel/mL.

En cuanto a los parámetros cinéticos correspondientes a 6 % de sustrato p/p con una concentración de inóculo 5 % v/v esta prueba se obtuvo una $\mu_{max} = 0.1330 \text{ h}^{-1}$ siendo este un valor más alto a lo reportado por (Mar *et al.*, 2019) 0.11 h^{-1} quienes desarrollaron modelos para el crecimiento de *L. acidophilus* en un tiempo de fermentación de 168 h, el cual les permitió obtener los parámetros de tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) así como también el tiempo de latencia $\lambda = 10.10$ aplicando el modelo cinético de Gompertz, el tiempo de adaptación del sustrato obtenido en esta investigación resulta menor a lo reportado por otros autores, *L. casei* obtiene un $\lambda = 3.68 \text{ h}$, esta adaptación es un indicador de que *L. casei* está utilizando los componentes orgánicos del sustrato como fuente de energía para su desarrollo a lo largo del proceso de bioconversión. Por otro lado, la mayor afinidad para *L. casei* con respecto a los diferentes casos de estudio fue con 6 % p/p de sustrato y 5 % de concentración de inóculo ($k_s = 0.3617$).

En la Figura 3.5 se presentan las cinéticas de crecimiento de *L. casei* correspondientes a 8 % p/p de sustrato a diferentes concentraciones de inóculo. Se observa que en los tres experimentos el consumo de carbohidratos es lento, sin embargo, en el periodo de la hora 32 correspondiente a la concentración del 15 % de inóculo, se observa un consumo mayor hasta el término de las 72 h. Por otro lado, los valores obtenidos de la tasa máxima de crecimiento son similares a lo reportado en la literatura, es importante mencionar que la mayoría de estudios realizados para determinar el desarrollo celular de *L. casei* son en sustratos con altos niveles de lactosa, por ejemplo, un estudio elaborado por RoseroChasoy *et al.*, (2020) reportó un valor de $\mu_{max} = 0.26 \text{ h}^{-1}$ utilizando como medio el suero de leche, no obstante, en este estudio se logra obtener una tasa máxima de

crecimiento similar en los diferentes niveles de concentración de sustrato e inóculo tomando en cuenta la naturaleza del sustrato en su composición lignocelulósica.

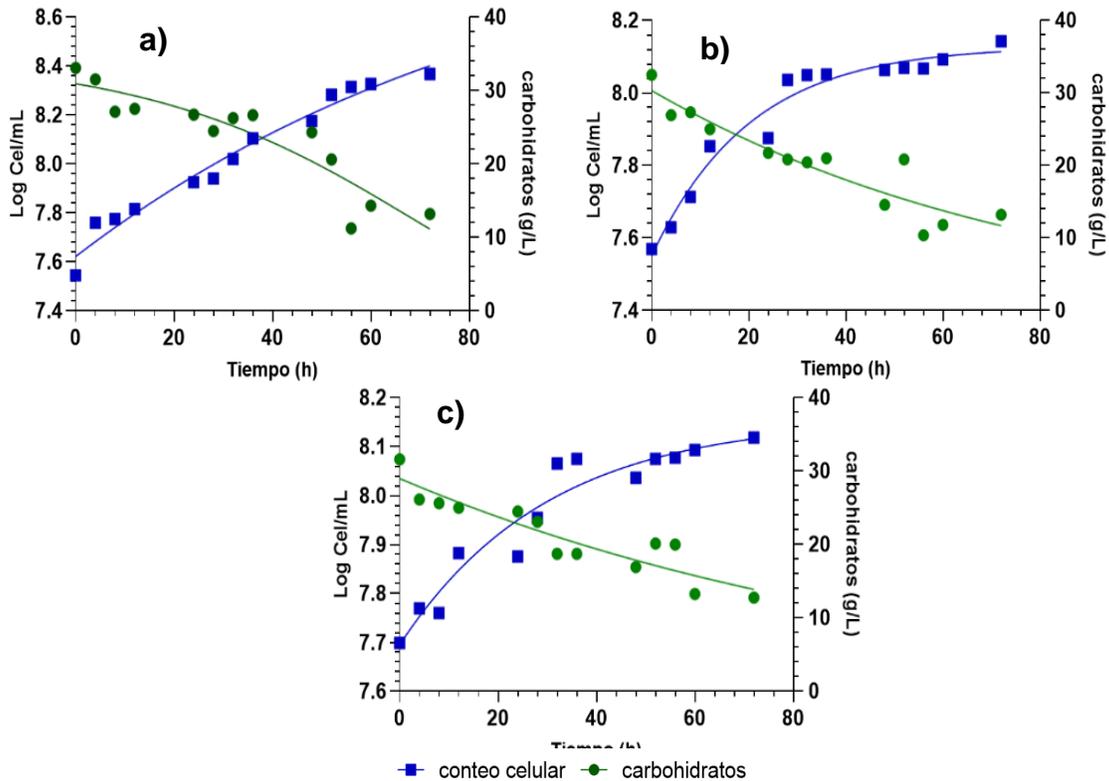


Figura 3.5 Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con *L. casei* con 8 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.

Con respecto a los parámetros cinéticos del crecimiento de *L. casei* para 8 % p/p de sustrato (ver Tabla 3.2) se observa que los valores de μ_{max} y k_s , son similares para los tres casos de estudio, sin embargo, para los resultados con 10 % de inóculo son ligeramente mayores ($\mu_{max} = 0.0192h^{-1}$ y $k_s = 0.0509$). no obstante, el tiempo de la fase de latencia más bajo se obtuvo en la cinética con 10 % de inóculo. En general los resultados demuestran que el modelo de Gompertz permite ajustar los datos experimentales, con valores de los coeficientes de correlación calculados (R^2) superiores a 0.90, en su mayoría.

Los parámetros cinéticos obtenidos en el caso de estudio anterior (8 % de sustrato y 10 % de inóculo) fueron similares a lo reportado en el trabajo de investigación de (GonzálezFigueredo *et al.*, 2020) donde estudiaron la formulación de mezclas de betabel para demostrar el crecimiento de *L. plantarum*, desarrollaron un modelo cinético para este microorganismo en donde obtuvieron un valor de $\mu_{max} = 0.0191h^{-1}$, además de su efecto en el crecimiento de biomasa celular.

Tabla 3.2 Parámetros cinéticos de crecimiento de *L. casei* en diferentes concentraciones.

% sustrato	% Inoculación	k_s	$U_{max}[h^{-1}]$	$\lambda[h]$	$a [LogCel/mL]$	R^2
	Modelo Gompertz					
4%	5%	0.0148	0.0054	6.53	8.51	0.95
	10%	0.0243	0.0089	5.60	7.99	0.68
	15%	0.0232	0.0085	2.97	8.16	0.84
6%	5%	0.3617	0.1330	3.68	8.02	0.91
	10%	0.0375	0.0138	4.17	8.02	0.93
	15%	0.0149	0.0057	7.24	8.30	0.97
8%	5%	0.0121	0.0049	4.42	9.01	0.97
	10%	0.0509	0.0192	2.86	8.13	0.96
	15%	0.0341	0.0128	4.76	8.16	0.93

3.3.2 Cinéticas con *L. acidophilus*

En la Figura 3.6 se presenta la cinética de crecimiento correspondiente a *L. acidophilus* con 4 % de sustrato p/p a diferentes concentraciones de inóculo. El consumo de carbohidratos dentro de las primeras 24 h fue similar con valores de 12.34, 13.72 y 12.77 g/L para los inóculos 5, 10 y 15 % respectivamente. Por otro lado, el valor máximo de la concentración celular fue de 8.56 LogCel/mL correspondiente a la concentración del 5 %

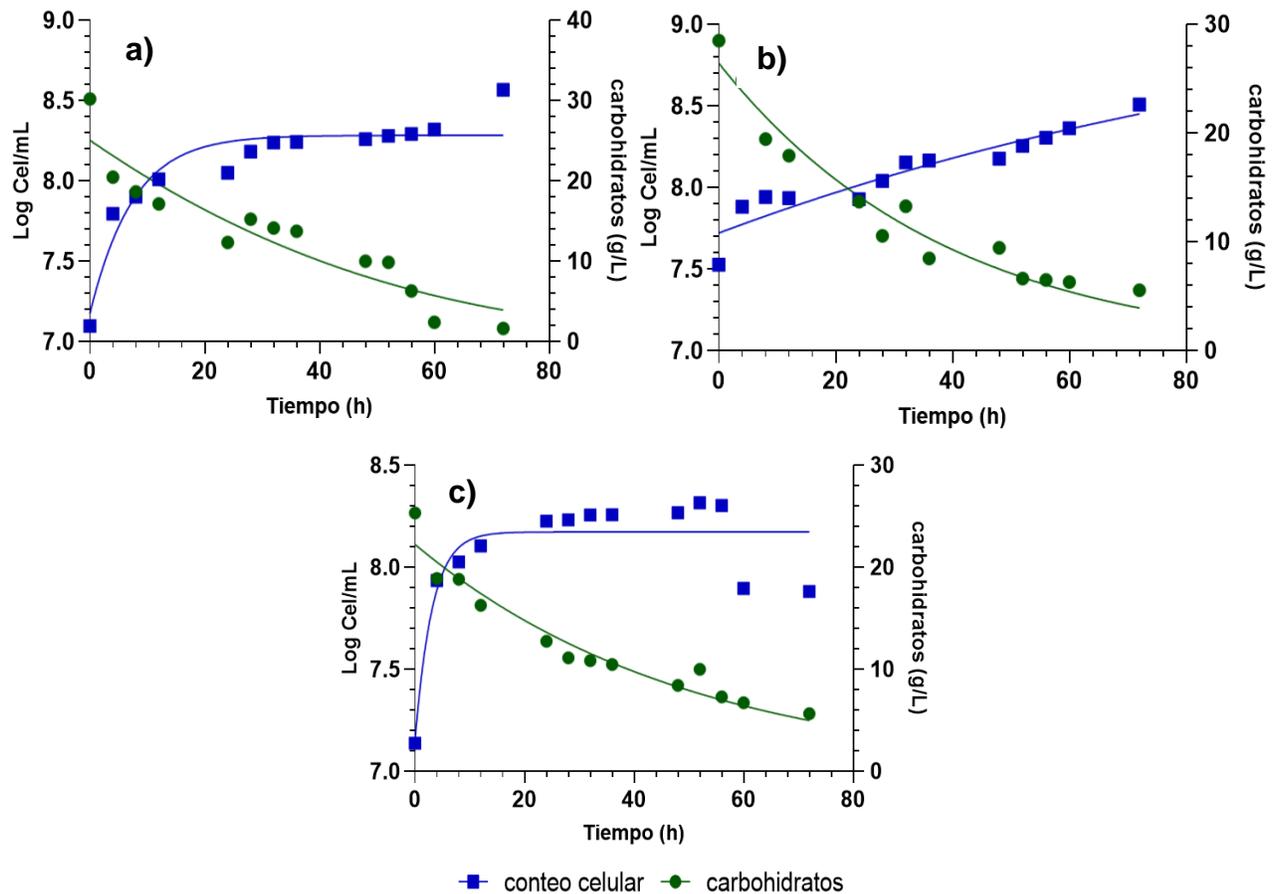


Figura 3.6 Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con *L. acidophilus* con 4 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.

En la Tabla 3.3 se presentan los parámetros cinéticos de *L. acidophilus* con una concentración de sustrato de 4 % p/p a diferentes concentraciones de inóculo. Los resultados que favorecieron el crecimiento celular se obtuvieron en el experimento con 15 % de inóculo, reportando un valor de $k_s = 0.3316$, sin embargo, para el caso de estudio con *L. casei* y 6 % p/p de sustrato, es ligeramente mayor su afinidad, ya que se reportó un valor de $k_s = 0.36170$ a una concentración del 5%, esto infiere que a un porcentaje mayor de sustrato *L. casei* demuestra mayor afinidad. En cuanto a la tasa máxima de crecimiento $\mu_{max} = 0.1330 \text{ h}^{-1}$ es mayor a lo reportado por (Romero -Mota *et al.*, 2023) quien obtuvo un valor de 0.04 h^{-1} y un tiempo de adaptación de $\lambda = 10.83$ para *L. acidophilus* utilizando residuos de caña de azúcar como sustrato, en este estudio *L.*

acidophilus mostró un menor tiempo de adaptación utilizando los granos gastados de cerveza como sustrato, obteniendo un valor de $\lambda = 3.03$ y finalmente logrando una concentración celular de 8.17 LogCel/mL al final de las 72 h.

En la Figura 3.7 se presentan los experimentos realizados con *L. acidophilus* con un 6% p/p de sustrato a diferentes concentraciones. Se observa que la remoción de carbohidratos fue mayor con *L. acidophilus* en comparación con el caso de estudio utilizando *L. casei*, sin embargo, el consumo de carbohidratos utilizando *L. acidophilus* fue lento durante las primeras 24 horas, obteniendo un valor de 17.66, 17.53 y 15.70 g/L hasta el término de las 72 h del proceso fermentativo.

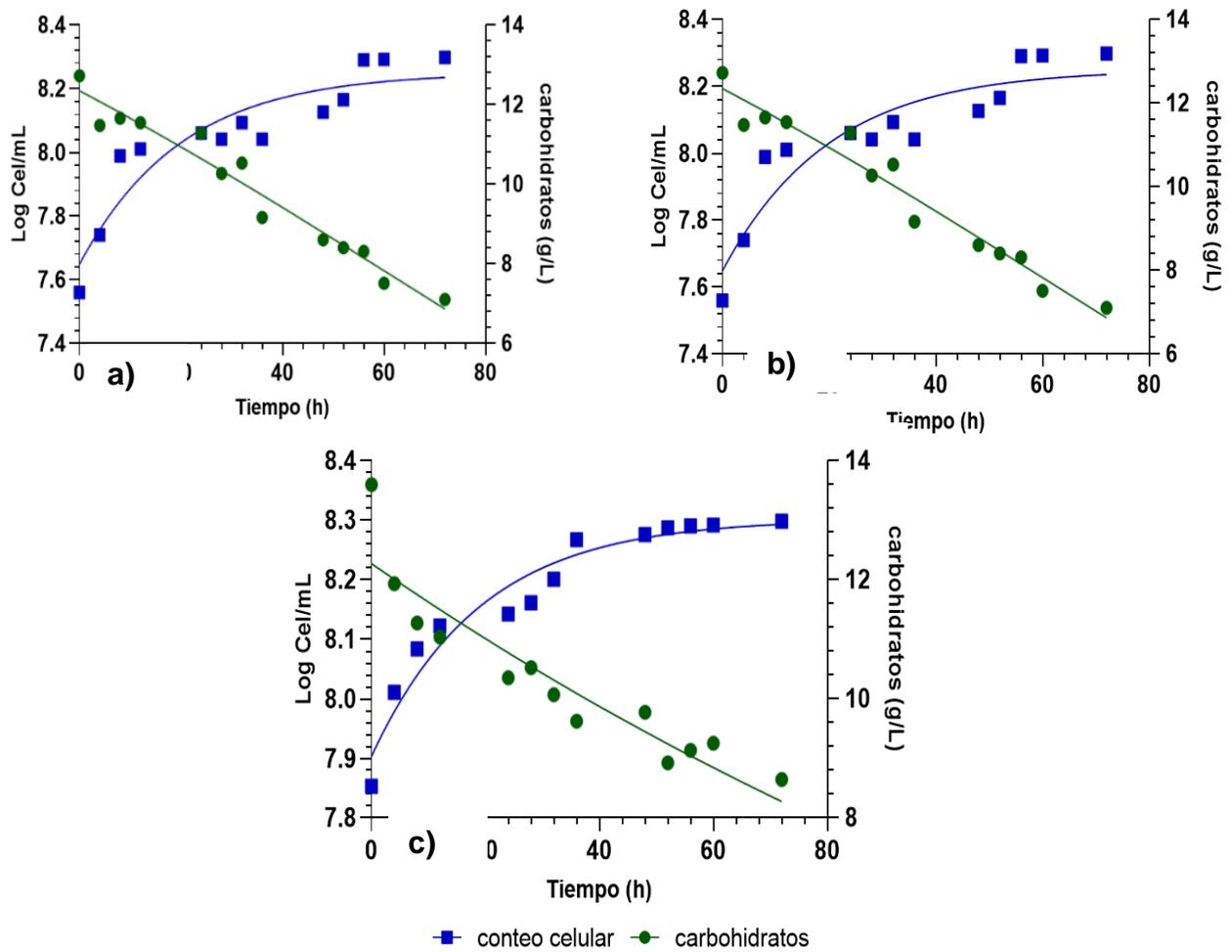


Figura 3.7 Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con *L. acidophilus* con 6 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.

La Figura 3.8 corresponde a las cinéticas de 8 % de sustrato y tres diferentes niveles de inoculación (5,10 y 15 %) podemos observar que en estas relaciones no hubo una remoción de carbohidratos significativa, es decir, al inicio del proceso el valor de carbohidratos para la relación de 5 % de inóculo (ver figura 3.8a) tiene un valor de 11.55 g/L, y al alcanza un valor de 11.53 a la hora 32, finalmente, al término del proceso fermentativo (72 horas) se obtiene una disminución final de carbohidratos con un valor de 11.41 g/L. Esto quiere decir, que durante el proceso fermentativo el microorganismo no degrado los compuestos orgánicos como en los niveles de sustrato estudiados anteriormente para *L. acidophilus* (4 y 6 % p/p), de la misma manera, el desarrollo del microorganismo no fue tan notorio, esto debido a que fue afectado el proceso principalmente por factores como el alimento, por ende, ocurre una disminución en la velocidad de crecimiento del microorganismo (Quispe-Vilchez,2023).

Por otro lado, respecto a la concentración celular para este caso de estudio (8 % de sustrato) en el nivel de inoculación del 5 % (ver Figura 3.8a) se puede observar que se tiene una concentración inicial de microorganismo de 7.41 LogCel/mL, al alcanzar la hora 32, incrementa ligeramente a un valor de 7.61, obteniendo una concentración final de 7.65 al término del proceso a la hora 72.

Respecto a la concentración de inóculo del 10 % se observa que hubo una disminución ligeramente mayor en cuanto al consumo de carbohidratos, al inicio del proceso se tenía una concentración de 11.40 y se alcanzó un valor final de 9.92, en cuanto a la concentración celular, el desarrollo del microorganismo fue menor en comparación a los anteriores casos de estudios, en este nivel de inoculación y sustrato (ver figura 3.8b) se alcanzó una concentración final de 7.66 LogCel/mL, en el caso del nivel de concentración del 15 % al término del proceso se obtuvo una concentración final de carbohidratos de 11.41 g/l y 7.68 LogCel/mL para la concentración celular, aunque es importante mencionar, que en la hora 60 se alcanzó la concentración celular más alta con un valor de 8.29 LogCel/mL.

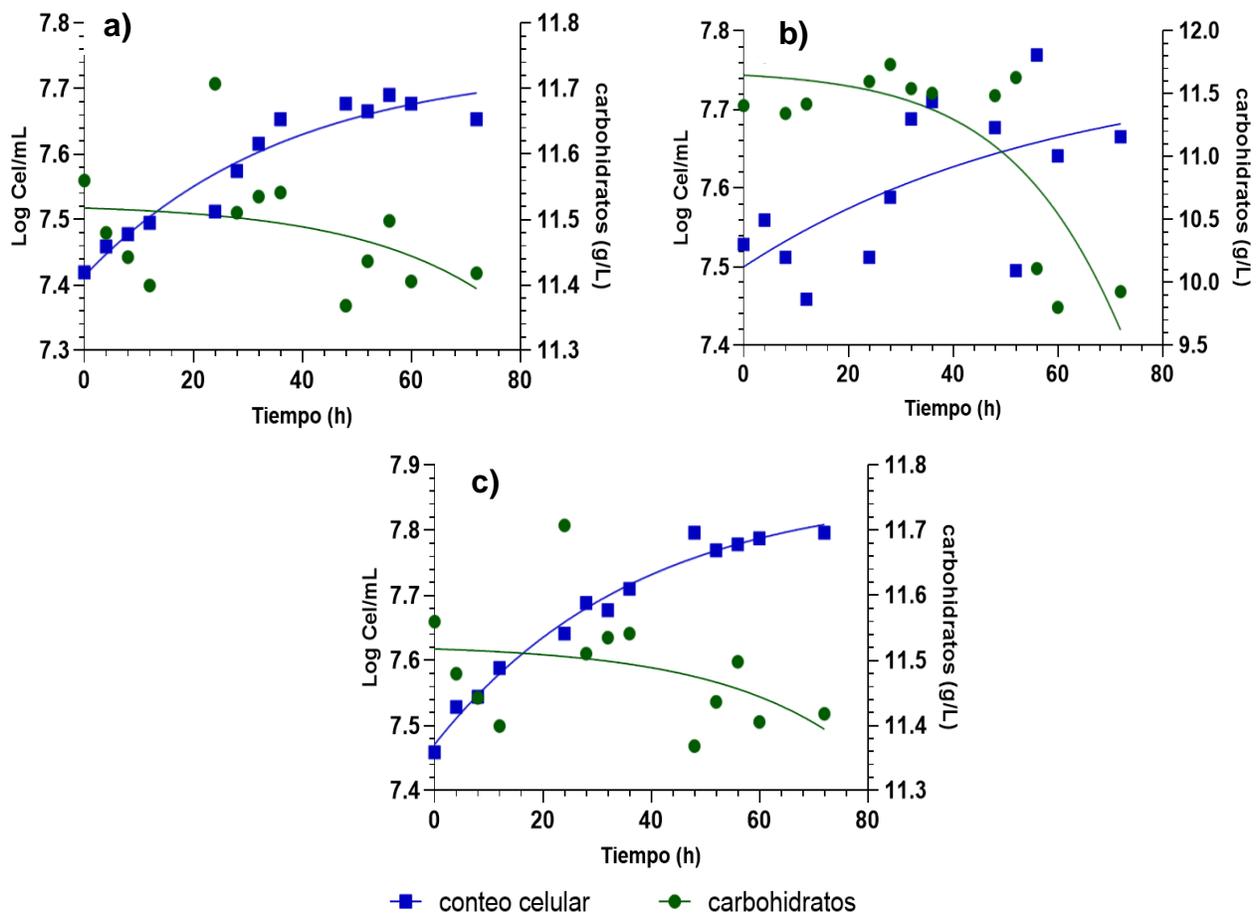


Figura 3.8 Crecimiento celular y consumo de carbohidratos con *L. acidophilus* con 6 % p/p de sustrato: a) 5, b) 10 y c) 15 % de inóculo.

El comportamiento presente en las diferentes concentraciones de inóculo demuestra la adaptación de *L. acidophilus* al sustrato correspondiente a los granos gastados de cerveza. En un estudio realizado por Sánchez-Valeriano *et al.*, (2022) reportaron parámetros cinéticos para *L. acidophilus* a un nivel de concentración de inóculo del 10 y 15 % utilizando maíz blanco como sustrato en el proceso fermentativo, donde obtuvieron como resultado un tiempo prolongado de adaptación del microorganismo al sustrato a lo largo del proceso reportando un valor de $\lambda = 21.87$ h y $\lambda = 18.25$ h respectivamente, de igual forma consideraron que el consumo de carbohidratos por parte de *L. acidophilus* es

similar en ambos niveles de concentración de inóculo ya que se obtuvieron una efectiva remoción de los carbohidratos presentes en el sustrato empleado en dicha investigación. En cuanto a los parámetros cinéticos para este caso de estudio (8 % p/p de sustrato) mostraron una mayor afinidad al proceso, así como también la mayor tasa máxima de crecimiento en las diferentes concentraciones de inóculo (5, 10 y 15 % v/v) obteniendo un valor de $\mu_{max} = 1.3818, 0.3232$ y $0.3850 h^{-1}$ y un valor de $k_s = 7.7380, 7.7560$ y 10.01 respectivamente, los valores de la tasa máxima de crecimiento son similares a lo reportado por (González del Rosario *et al.*,2023) quienes aplicaron un modelo cinético para determinar los parámetros del proceso de fermentación láctica a partir de residuos de caña de azúcar utilizando *L. acidophilus*, obteniendo valores de $\mu_{max} = 1.2420$.

Tabla 3.3 parámetros cinéticos de crecimiento de *L. acidophilus* a diferentes concentraciones de inóculo

% Sustrato	% Inoculación	k_s	$U_{max}[h^{-1}]$	$\lambda[h]$	$a [LogCel/mL]$	R^2
	Modelo Gompertz					
4%	5%	0.1405	0.0210	6.68	8.28	0.90
	10%	0.0096	0.0013	7.30	9.25	0.89
	15%	0.3316	0.1092	3.04	8.17	0.81
6%	5%	0.0515	0.0105	4.90	8.25	0.86
	10%	0.0247	0.0021	11.90	8.40	0.95
	15%	0.0533	0.0110	4.85	8.30	0.94
8%	5%	7.7380	1.3818	5.60	7.74	0.86
	10%	7.7560	0.3232	24.00	7.76	0.85
	15%	10.0100	0.3850	26.00	10.01	0.94

3.4 Caracterización de la Biomasa

A la biomasa obtenida al final del proceso de fermentación se le caracterizó fisicoquímicamente para evaluar su calidad, ya que se pretende determinar su potencialidad para el consumo humano y agregar valor a los residuos de cerveza artesanal. Esta caracterización se realizó para los tres niveles de porcentaje de sustrato y concentraciones de inóculo.

3.4.1 Biomasa *L. casei*

En la Figura 3.9 Se muestran los resultados de la caracterización de la biomasa en las tres concentraciones de sustrato e inóculo, en la Figura 3.9a podemos observar que los valores son similares para el nitrógeno en la concentración de inóculo del 5 y 10 %, mientras que el porcentaje más bajo corresponde a la biomasa que utilizó el 15 % de inóculo. El porcentaje de proteínas coincide con similitud en la concentración de inóculo del 5 y 10 %, pero la que aumenta el porcentaje proteico se estudia utilizando el 4 % de sustrato en 10 %. De acuerdo con los resultados de la Figura 3.9b Se puede notar que en comparación con el 4 % p/p de sustrato (ver Figura 3.9a) en esta relación de sustrato (6 % p/p) se incrementa el porcentaje de nitrógeno y derivado de este mismo las proteínas, sin embargo, es en la concentración del 10 % de inóculo que se encuentra el mayor porcentaje proteico de la biomasa obtenida en esta segunda caracterización. Con respecto a la última caracterización en relación a *L. casei* utilizando el 8 % p/p de sustrato (ver Figura 3.9c) se observa que, el porcentaje de nitrógeno y proteínas correspondientes al nivel del 5 % v/v de inóculo fue de 2.10 % 13.14 % respectivamente, este valor mayor a lo obtenido al utilizar esta relación con el 4 % de sustrato (ver Figura 3.9a) sin embargo, en el nivel de 10 y 15 % v/v de inóculo con un porcentaje de nitrógeno y proteínas de 1.81 % y 11.31 % para 10 % y 2.25 % y 14.08 % para 15 %, respectivamente, son menores a lo obtenido en la caracterización que se presenta con 6 % p/p de sustrato (ver Figura 3.9b).

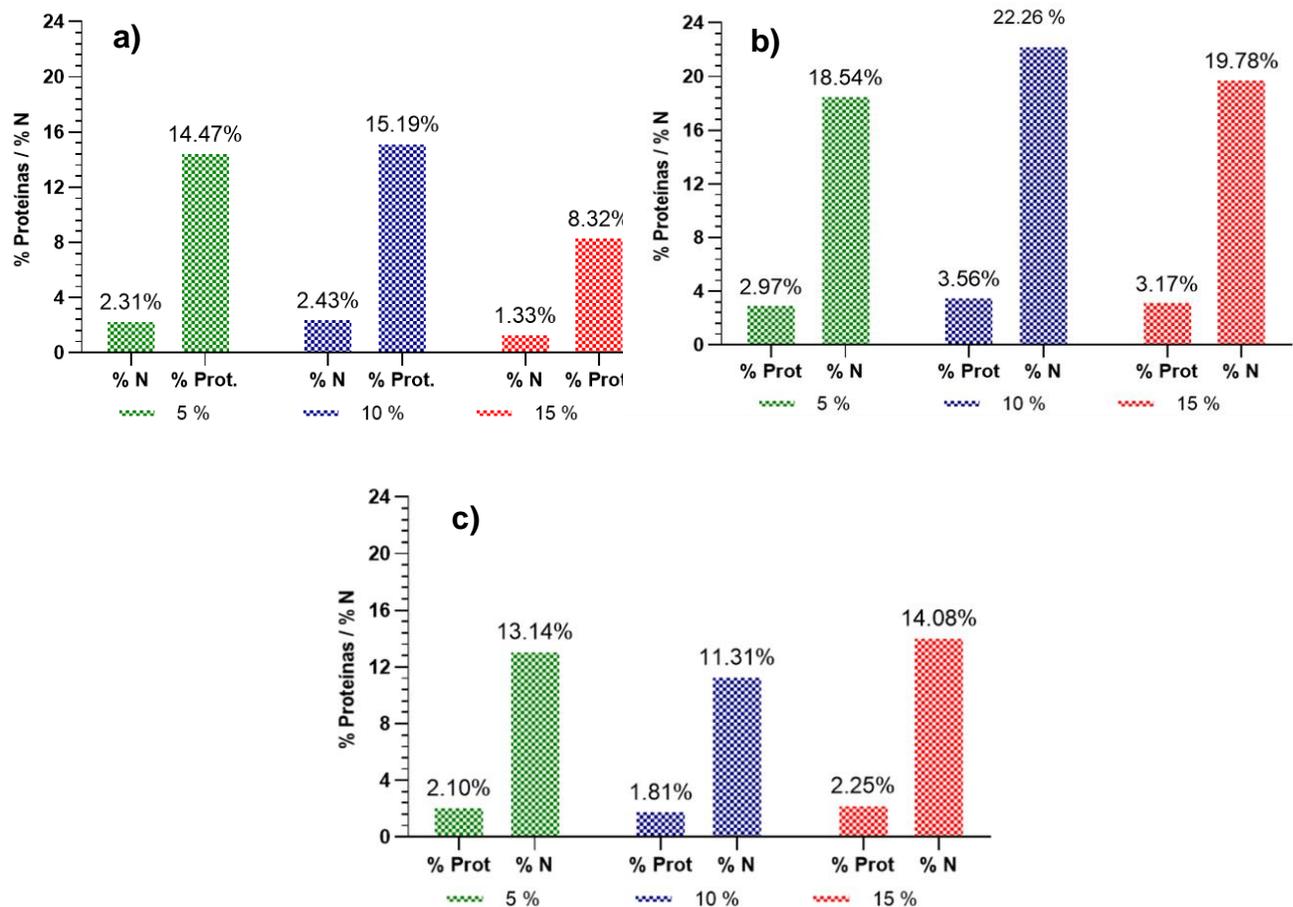


Figura 3.9. Caracterización de la biomasa obtenida para *L. Casei* a diferentes concentraciones de sustrato e inóculo a) 4, b) 6 y c) 8 %.

Los resultados de los porcentajes de proteínas obtenidos de la caracterización de biomazas con *L. casei* en este estudio, son mayores a lo reportado por (GomezBlanco.,2022) quien obtuvo porcentajes de 2.29, 2.87, 2.78 y 2.57 % de proteínas de una especie de *Lactobacillus* evaluando su proceso fermentativo en suero de leche.

3.4.2 Biomasa *L. acidophilus*

En la Figura 3.10 se presentan las caracterizaciones de la biomasa correspondiente a *L. acidophilus* a diferentes concentraciones de sustrato e inóculo. El porcentaje de nitrógeno

correspondiente al primer caso de estudio de esta cepa (ver Figura 3.9 a) presenta valores similares para el nitrógeno y proteínas de 2.56 %, 15.99 %, 2.45 % y 15.34 % para las concentraciones de 10 y 15 % de inóculo respectivamente. En la Figura 3.9b se observa que el porcentaje de nitrógeno y proteínas fue mayor a un 5 % de inoculación, pero la relación sustrato microorganismo con mayor valor proteico en ambos casos es de 4 % p/p de sustrato y 10 % de inóculo.

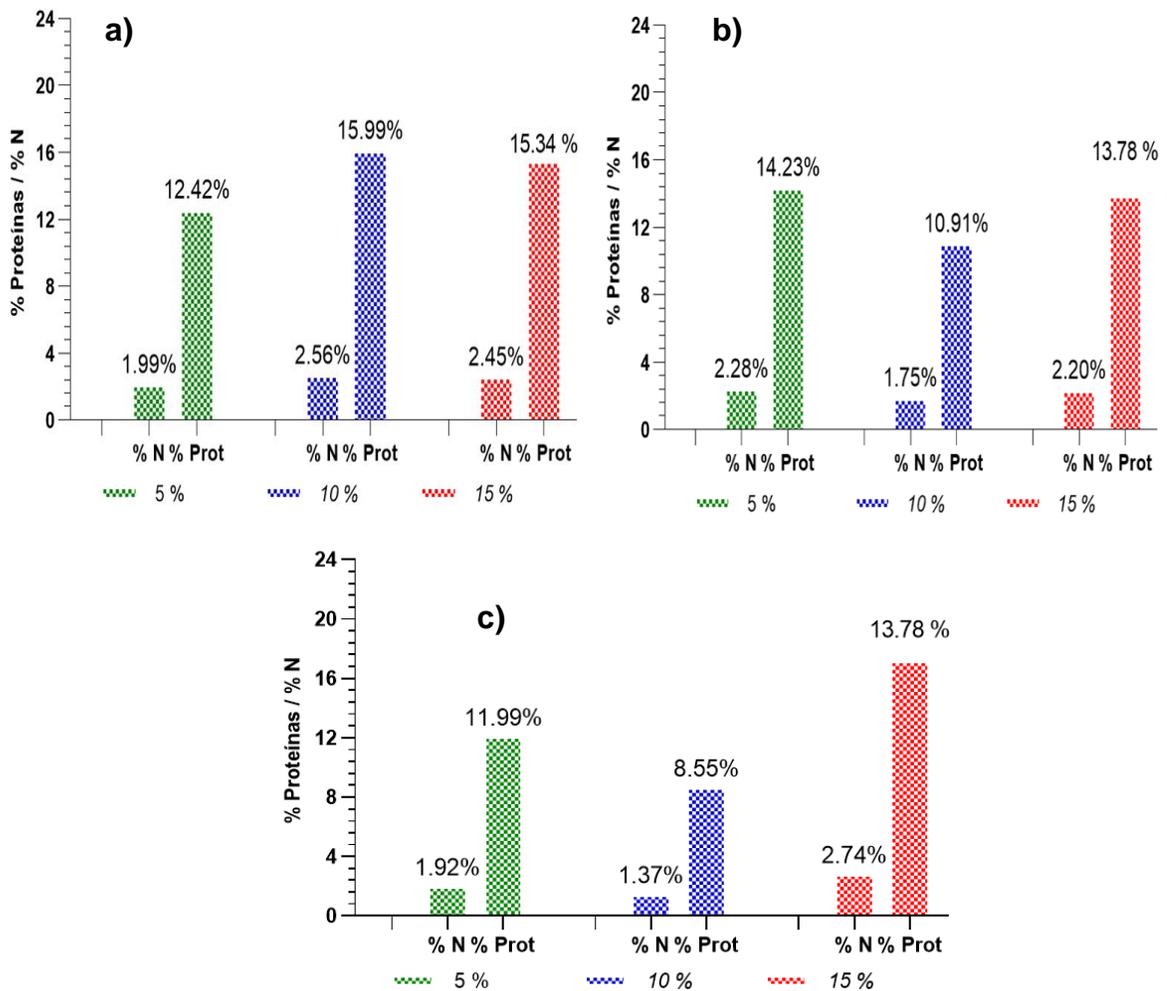


Figura 3.10 Caracterización de la biomasa obtenida para *L. acidophilus* a diferentes concentraciones de sustrato e inóculo a) 4, b) 6 y c) 8.

3.5 Rendimiento y producción de Biomasa

El término de biomasa hace referencia al número de células presentes en una superficie, en un organismo, en una colonia o en un cultivo. A partir de esto, se examinaron los rendimientos y la concentración inicial y final de la producción de biomasa.

3.5.1 Rendimientos y caracterización final de las biomásas para *L. casei*

En la Tabla 3.4 se presentan los rendimientos obtenidos de las biomásas de *L. casei* al término del proceso de bioconversión con el residuo BSG, del mismo modo, se presentan algunos parámetros que son de principal interés para su posterior aplicación. Se observa que el mayor rendimiento en cuanto a biomasa, se encuentra en la concentración de 6 % de sustrato y 10% de inóculo ($0.99 \ y_{p/s}$), de igual manera, el mayor porcentaje de proteínas se encuentra en esta relación sustrato/microorganismo con un porcentaje final de 22.26 %. Por otra parte, la caracterización de las biomásas muestra en la mayoría de los casos una remoción de carbohidratos, es decir, inicialmente se tenía un residuo constituido por distintos componentes que forman la materia orgánica (Sorensen *et al.*,2022), sin embargo, durante el proceso de bioconversión fermentativa estos compuestos fueron degradados y biotrasformados en metabolitos secundarios, las concentraciones de carbohidratos en las biomásas finales en los niveles de sustrato de 6 y 8 % podrían ser adecuadas para que el proceso de bioconversión pueda continuar.

Por otro lado, a través del proceso fermentativo se ha alcanzado un notable incremento en el contenido de proteínas de las biomásas resultantes. Al inicio del proceso, la concentración de proteínas en el sustrato (BSG) era de 11.29 %, posterior a la aplicación de este bioproceso, se logró elevarla significativamente hasta un porcentaje de 22.26 % en el caso estudiado de 6 % de sustrato y 10 % de inóculo. Se estima que este aumento sea debido a la síntesis de proteínas que se lleva a cabo durante el proceso fermentativo (Ayivi *et al.*,2020) en este sentido, no solo se logra un aumento significativo, sino que también se ha optimizado la calidad de las proteínas resultantes de las biomásas al ser biotrasformadas, dando lugar a un producto final rico en nutrientes y beneficioso para la salud.

Los principales parámetros cinéticos obtenidos en este caso de estudio fueron similares a lo reportado por (Guo *et al.*, 2019) quienes obtuvieron valores de $\mu_{max} = 0.13$ y $0.12 h^{-1}$ utilizando el modelo cinético Gompertz y logístico respectivamente, así como también el tiempo de latencia fue similar, se reportaron valores de $\lambda = 5.10$ y 3.90 h en el desarrollo fermentativo de un microorganismo probiótico desarrollado en un medio de nano burbujas.

Tabla 3.4 rendimientos y caracterización final de las biomazas para *L. casei*

Probiótico	sustrato	Concentración de inóculo	$y_{p/s}$	Carbohidratos (g/L)	Proteínas (%)	Concentración celular
<i>L. casei</i>	4 %	5	0.40	0.56	14.47	8.02
		10	0.38	0	15.19	7.89
		15	0.37	0	8.32	8.01
	6 %	5	0.87	9.10	18.54	8.08
		10	0.99	10.22	22.26	8.02
		15	0.96	10.87	19.78	8.07
	8 %	5	0.33	13.17	13.14	8.36
		10	0.40	13.19	11.31	8.14
		15	0.25	12.75	14.08	8.11

3.5.2 Rendimientos y caracterización final de las biomazas para *L. acidophilus*

En la Tabla 3.5 se presentan los rendimientos de biomazas para *L. acidophilus* a partir del proceso de bioconversión fermentativa. Se observa que el mayor rendimiento de biomasa es en el porcentaje de sustrato de 8 %, pero es importante mencionar que en los distintos casos de estudios sobre la concentración de sustrato e inóculo también hubo un rendimiento considerable de biomasa, sin embargo, el rendimiento mayor es de 8 % de sustrato y 5 % de inóculo con un valor de 2.37, estos valores son mayores a lo reportado por (Alfano *et al.*, 2020) quienes obtuvieron un rendimiento de $y_{p/s} = 0.17$ en el proceso fermentativo de *L. brevis*.

En cuanto al parámetro de carbohidratos determinados en la caracterización final de la biomasa, se observa que hubo mayor remoción en la concentración de sustrato del 4 % en los diferentes niveles de inoculación, la remoción de carbohidratos obtenida en la concentración del 8 % de sustrato mostró ser menor (13.19 g/L), comparada con la mayor remoción de carbohidratos de 0 g/L obtenida en los distintos niveles de inóculo (10 y 15 %). Por último, la especie *L. acidophilus* mostró un mayor porcentaje de proteínas en la concentración de sustrato de 4 % en los tres niveles de inóculo (5, 10 y 15 %), sin embargo, el valor más alto (15.99 %) de proteínas corresponde al nivel de 10 %, caso contrario al nivel de 15 % donde se obtuvo el porcentaje menor de proteínas (8.32 %).

Tabla 3.5 rendimientos y caracterización final de las biomasas para *L. acidophilus*

Probiótico	sustrato	Concentración de inóculo	$y_{p/s}$	Carbohidratos (g/L)	Proteínas (%)	Concentración celular [LogCel/mL]
	4 %	5	0.26	1.65	12.42	8.50
		10	0.80	5.56	15.99	8.56
		15	0.39	5.67	15.34	7.88
	6 %	5	0.43	7.10	14.23	8.30
		10	0.06	5.58	10.91	8.30
		15	0.62	8.64	13.78	8.29
	8 %	5	2.37	11.41	19.10	7.65
		10	1.94	9.92	9.14	7.66
		15	1.97	11.42	16.27	7.67

En base a la información reportada en las Tablas 3.4 y 3.5 se observa que los rendimientos de biomasas para *L. case* y *L. acidophilus* fueron similares, a excepción de la última concentración de sustrato (8 %) donde *L. acidophilus* mostró un mayor rendimiento. Esto puede deberse a que en este porcentaje de sustrato la remoción de carbohidratos fue muy lenta, lo cual podría influir en el metabolismo de los probióticos al inhibir el crecimiento del microorganismo, viéndose reflejado en la concentración celular,

la cual en este mismo nivel de sustrato es menor (7.65, 7.66 y 7.67 LogCel/mL) en comparación a los anteriores casos de estudio.

Los rendimientos de biomasa obtenidos en este caso de estudio para *L. acidophilus* son mayores a lo reportado por (Cangussu *et al.*, 2020) dónde obtuvieron rendimientos para un género *Lactobacillus* valores de $y_{p/s} = 0.11$ y 0.027 y similares a lo reportado por (Berisvill *et al.*, 2020) respecto a *L. Salvarius* donde se obtuvieron valores de $y_{p/s} = 0.30$ y 0.83 respectivamente.

3.5 Análisis de varianza

De acuerdo con el análisis de varianza, se determinó que el factor del sustrato tiene un efecto significativo sobre la generación de biomasa probiótica obtenida a partir del proceso de bioconversión anaerobia al utilizar como sustrato los granos gastados de cervecería artesanal utilizando *L. casei*, ya que el valor de p es menor a 0.05 , siendo este $p=0.003$. Esto se comprueba con el diagrama de Pareto, mostrado en la Figura 3.10a en la cual se observa que la interacción entre el sustrato e inóculo no son estadísticamente significativos, ya que la concentración de inóculo no es un factor que influya en la producción de proteínas de las biomasas, esto puede comprobarse con el valor de $p = 0.575$ superando el 0.05 .

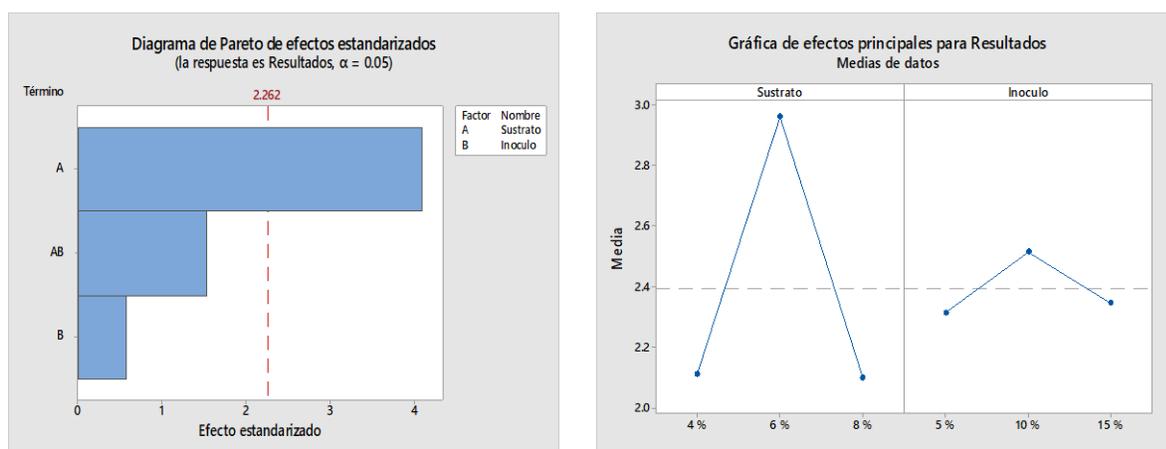


Figura 3.11 Análisis de varianza siendo la variable de respuesta la producción de proteínas. a) Diagrama de Pareto, b) Grafica de efectos principales.

En la Figura 3.11b se presenta la gráfica de efectos principales, la cual demuestra que la concentración de sustrato correspondiente al 6 % p/p potencializa el contenido de proteínas en comparación con los dos niveles restantes. En cuanto al porcentaje de inóculo, la concentración del 10 % también demuestra una relación con las altas cantidades de proteínas presentes en la biomasa obtenida, esto concuerda con los resultados obtenidos de la caracterización de la biomasa en este proceso de biotransformación (ver Figura 3.8) ya que con esta relación sustrato/microorganismo se obtiene un mayor porcentaje de proteínas.

Con respecto a la cepa probiótica *L. acidophilus*, el análisis de varianza permitió determinar que los factores sustrato ($p=0.035$) e inóculo ($p=0.000$) tienen un efecto significativo sobre la producción de nitrógeno y derivado de este las proteínas a partir del proceso de bioconversión fermentativa al utilizar como sustrato los granos gastados de la industria cerveza artesanal. En la Figura 3.12 se muestra el diagrama de Pareto de efectos estandarizados, teniendo como variable de respuesta las proteínas, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. en este análisis se concluye que para obtener mayor porcentaje de proteínas a partir del BSG, se debe utilizar 5 % de inóculo de la especie *L. acidophilus*, lo cual coincide con el mayor rendimiento reportado en la Tabla 3.5.

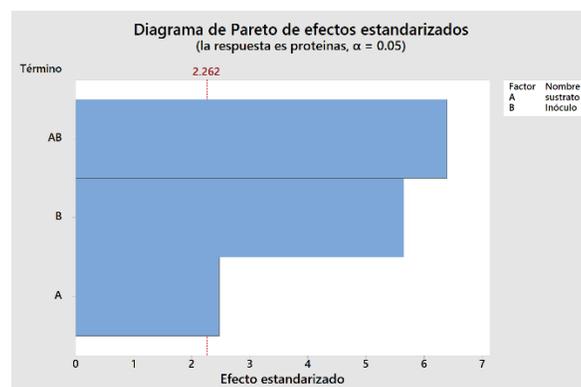


Figura 3.12 Análisis de varianza siendo la variable de respuesta la producción de proteínas diagrama de Pareto.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

La caracterización fisicoquímica de los granos gastados de cerveza demostró ser adecuada para su implementación como sustrato en el desarrollo de *L.casei* y *L. acidophilus* debido al contenido de sus componentes como 14.89 g/L de carbohidratos, proteínas 11.29 %, además, el pH (5) fue viable para una adaptación de las cepas probióticas en todos los casos de estudio desarrollados con diferentes niveles de concentración de sustrato e inóculo, los componentes mencionados anteriormente conforman las principales fuentes de materia orgánica aptas para el desarrollo de estos microorganismos probióticos, de manera que se demuestra la funcionalidad del residuo de cerveza artesanal para ser implementado como sustrato en el proceso de fermentación probiótica, obteniendo una concentración celular para *L. casei* y *L. acidophilus* de(8.36 y 8.56LogCel/mL) respectivamente.

En cuanto a la propagación de especies probióticas, *Lactobacillus casei shirota* y *Lactobacillus acidophilus* fueron obtenidas de productos comerciales, por tal motivo, se realizó un aislamiento para cada cepa respectivamente, posteriormente se realizó la propagación de dichas cepas probióticas en un medio de cultivo indicado para este tipo de bacterias, se cumplió con el objetivo de la propagación ya que ambas bacterias demostraron funcionalidad y desarrollo en los medios de inoculación aplicados, teniendo una concentración celular inicial de 7.39 y 7.13 LogCel/mL respectivamente al inicio del proceso de biotransformación de los residuos de cerveza artesanal.

La principal aportación científica del presente proyecto de tesis consiste en la determinación cuantitativa de los parámetros cinéticos de ambos modelos, los resultados obtenidos son inéditos, ya que representan el comportamiento de biotransformación del bagazo de cerveza artesanal obtenido de esta zona. Los parámetros cinéticos obtenidos sugieren que al utilizar una concentración de 6 % p/p de sustrato y una concentración de 10 % v/v de inóculo para la bacteria *Lactobacillus casei*, el contenido de proteínas del a biomasa obtenida al igual que su rendimiento, son mayores en comparación con las otras concentraciones estudiadas, cumpliendo con el objetivo de determinar los parámetros de

la afinidad del proceso de esta investigación, se obtuvo un valor de $k_s=0.0375$, así mismo la tasa máxima de crecimiento presentó un valor de $u_{max}= 0.318 h^{-1}$, con un tiempo de adaptación del microorganismo de 4.17, estos parámetros. De la misma manera, los parámetros cinéticos obtenidos para *L. acidophilus* determinaron un valor de afinidad del proceso de $k_s= 7.73$, una tasa máxima de crecimiento de $u_{max}= 1.3818 h^{-1}$ y un tiempo de adaptación de $\lambda= 5.60$, logrando conjeturar la relación sustrato/microorganismo que maximiza el porcentaje de proteínas en las biomásas resultantes al final del proceso correspondiente a 8 % p/p de sustrato y 5 % v/v de inóculo.

Las cinéticas de consumo de sustrato demostraron la viabilidad de *L.casei* y *L. acidophilus* en la remoción de compuestos orgánicos lignocelulósicos presentes en el residuo de la industria cervecera artesanal de la región de Orizaba, Veracruz, a lo largo del proceso fermentativo, obteniendo un consumo total de sustrato a la hora 52 respecto a *L. casei* y valores de 1.65 hasta 5.65 g/L de carbohidratos para *L. acidophilus*. Mediante la caracterización de la biomasa obtenida al finalizar el proceso de bioconversión presenta un porcentaje de proteínas de 22.26 % en la relación de 6 % p/p de sustrato y 10 % v/v de inóculo correspondiente a *L. casei* cual muestra ser la concentración más alta para el porcentaje de proteínas, seguido de *L. acidophilus*, la cual obtuvo un valor de 19.09 % de proteínas correspondiente a la relación de 8 % p/p sustrato y 5 % v/v inóculo.

De acuerdo con el análisis de varianza con respecto a *L. casei*, el factor de la concentración de sustrato influye en este proceso como significativo ($p=0.003$) sobre los valores de proteínas en la biomasa final, de manera que la relación sustrato/microorganismo al igual que las condiciones de operación del proceso fermentativo, el mayor rendimiento e incremento de proteínas se encuentra en 6 %p/p de sustrato y 10 % v/v de inóculo. Por otro lado, el análisis de varianza para *L. acidophilus*, mostró que los factores de sustrato ($p=0.035$) e inóculo ($p=0.0000$) influyen de manera significativa para el proceso sobre la cantidad de proteínas en la biomasa resultante, sugiriendo la relación de sustrato/microorganismo de 8% p/p y % 5 % v/v respectivamente

RECOMENDACIONES

Realizar una liofilización para determinar la cantidad de microorganismos que se encuentren presente en las biomasas resultantes de ambas cepas probióticas (L. Casey y L. acidophilus) así como también determinar el tiempo de duración del microorganismo presente en la biomasa.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se emplearán como punto de partida para futuras investigaciones enfocadas en aumentar la producción de biomasas nutritivas mediante el uso de microorganismos probióticos. Se realizarán variaciones en los porcentajes de inóculo con la finalidad de determinar la relación alimento/microorganismo para poder lograr maximizar el rendimiento de biomasa, así mismo, se caracterizará la biomasa para conocer sus componentes nutricionales y su idoneidad como un suplemento alimenticio de alto valor nutritivo con potencial de consumo humano.

ANEXOS

Tabla A1. Parámetros cinéticos obtenidos en GraphPad con el modelo de Gompertz correspondientes a 4 % de sustrato y 5 % de inóculo *L. casei*.

Gompertz c	Carbohidratos	Conteo celular
Best-fit values		
a	24.25	8.506
ks	-0.03804	0.01488
Ti	25.60	-132.4
95% CI (profile likelihood)		
a	16.20 to 192.6	8.113 to +infinity
ks	-0.08660 to -0.01119	??? to 0.03186
Ti	-77.38 to 36.94	-284.8 to -71.91
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	10	10
R squared	0.9525	0.9523
Sum of Squares	21.62	0.03305
Sy.x	1.471	0.05749
Number of points		
# of X values	13	13
# Y values analyzed	13	13

Tabla A2. Parámetros cinéticos obtenidos en GraphPad con el modelo de Gompertz correspondientes a 4 % de sustrato y 10 % de inóculo *L. casei*.

Gompertz c	Carbohidratos	Conteo celular
Best-fit values		
a	20.58	7.988
ks	-0.04881	0.02439
Ti	34.38	-133.1
95% CI (profile likelihood)		
a	14.54 to 143.9	7.856 to +infinity
ks	-0.1033 to -0.01202	-infinity to 0.1100
Ti	-58.54 to 44.76	-infinity to -31.61
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	10	10
R squared	0.9168	0.6790
Sum of Squares	46.75	0.03988
Sy.x	2.162	0.06315
Number of points		
# of X values	13	13
# Y values analyzed	13	13

Tabla A3. Parámetros cinéticos obtenidos en GraphPad con el modelo de Gompertz correspondientes a 4 % de sustrato y 10 % de inóculo *L. casei*.

Gompertz c	Carbohidratos	Conteo celular
Best-fit values		
a	18.52	8.159
ks	-0.1097	0.02322
Ti	25.08	-127.7
95% CI (profile likelihood)		
a	16.47 to 22.75	8.015 to +infinity
ks	-0.1747 to -0.06917	??? to 0.06645
Ti	21.66 to 27.08	-773.9 to -47.90
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	10	10
R squared	0.9887	0.8402
Sum of Squares	7.022	0.02779
Sy.x	0.8380	0.05272
Number of points		
# of X values	13	13
# Y values analyzed	13	13

ANEXO B

Análisis estadístico

Tabla B1. Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	3.4604	0.43255	15.15	0.000
Lineal	4	1.3603	0.34008	11.91	0.001
Sustrato	2	0.2412	0.12062	4.22	0.051
Inóculo	2	1.1191	0.55954	19.60	0.001
Interacciones de 2 términos	4	2.1001	0.52503	18.39	0.000
Sustrato*Inóculo	4	2.1001	0.52503	18.39	0.000
Error	9	0.2570	0.02855		
Total	17	3.7174			

Tabla B2. Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.168981	93.09%	86.94%	72.35%

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguado G, J. (2020). *Selección de alternativas de detoxificación de material lignocelulósico para la producción de biocombustibles oxigenados* [Tesis de licenciatura, Universidad de Valladolid escuela de Ingenierías Industriales]. Repositorio documental – UVA.

Alfano, A., Perillo, F., Fusco, A., Savio, V., Corsaro, M. M., Donnarumma, G., Schiraldi Ch., Cimini, D. (2020). *Lactobacillus brevis CD2: Fermentation Strategies and Extracellular Metabolites Characterization. Probiotics and Antimicrobial Proteins*. doi:10.1007/s12602-020-09651-w (<https://doi.org/10.1007/s12602-020-09651-w>)

Álvarez, J., Fernández Real, J. M., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., Saenz de Pipaon, M., & Sanz, Y. (2021). *Microbiota intestinal y salud. Gastroenterología y Hepatología*. 44(7), 519–535. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>.

Arana S, E. (2022). *Energy improvement options for a small-scale brewery: a literature study* [Tesis de maestría, University of Gavle]. Archivo Digital Docencia Investigación – Universidad del País Vasco.

Atabani, A., Al-Muhtaseb, A., Kumar, G., Saratale, G.D., Aslam, M., Khan, H.A., Badía, M., Castro, D., Perdomo, K., & Lugo, D. (2017). Antagonismo de Bacillus frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. 32(2), 9834. <https://doi.org/10.3390/foods12040834>

Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljalouds, S., Worku, M., Tahergorabi, R., Ibrahim, S.A, (2020) *Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications*. Dairy, 1(3),202-232.2022. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>

Baiano, A., La Gatta, B., Rutigliano, M., & Fiore, A. (2023b). *Functional bread produced in a circular economy perspective: the use of brewers' spent grain* Foods, 12(4), 834. <https://doi.org/10.3390/foods12040834>

Berisvil, A. (2021). *Low-cost culture medium for biomass production of lactic acid bacteria with probiotic potential destined to broilers*.<https://www.redalyc.org/journal/6177/617769130001/>

Bernal Castro, C. A., Díaz-Moreno, C., & Gutiérrez-Cortés., C. (2017). *Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: avances en el desarrollo de bebidas de frutas*. Revista Chilena de Nutrición, 44(4), 383–392. doi:10.4067/S0717-75182017000400383 <https://doi.org/10.4067/S0717-75182017000400383>

Bernal, C., Díaz, C. y Gutiérrez, C. (2017). *Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas* probiotics and prebiotics in

vegetable matrices: Advances in the development of fruit drinks. Revista chilena de nutrición, 44(4), 383- 392. <https://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000400383>

Bianco, A., Budroni, M., Zara, S., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, G. (2020). *The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8661-8678. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10843-1>

Boggio, C., Burgos, F., del Campo, M., Gerold, I., Tabacco, O., & Vinderoalf, G. (2022). *Approach to probiotics in pediatrics: the role of lactobacillus.* *Arch argent pediatr*, 120(1), e1-e7.

Boulay, M. Al Haddad, F. Rul, (2020). *Streptococcus thermophilus growth in soya milk: Sucrose consumption, nitrogen metabolism, soya protein hydrolysis and role of the cellwall protease PrtS,* *Int. J. Food Microbiol.* 335, 108903. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108903>.

Bravo, M. (2017). *Caracterización de rutas metabólicas de las bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación del cacao Theobroma cacao.* Universidad de los Andes.

Caltzontzin, V., Gutiérrez, C., García Trejo, J., & Feregino, A. (2022). *Conversion of organic waste through a biorefinery scheme into biofuels and value-added products: overview and perspectives.*

Cangussu, A., Cruz, P., Souza, R., Santos, G., Campos, F., Sobrinho, E., Passos, F. (2020). *Prediction of fermentative parameters from mathematical modeling using thermotolerant probiotic yeast.* *Bioresource Technology Reports*, 11, 100522. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100522>

Lozano, C., Ramírez, L., Constanza, L., & Suárez, Trujillo, D. (2021). *Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química.* *Nova* 19(36), 49-94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>

Chasoy, G. R., Chairez, I., & Durán-Páramo, E. (2020)., 27(10). *Carbon/nitrogen ratio and initial pH effects on the optimization of lactic acid production by Lactobacillus casei subsp casei NRRL-441.* <https://doi.org/10.1016/j.apm.2020.02.021>

Chávez, C., López, F., Palate, X. & Jacome, C. (2021). *Potencialidad de Biocombustibles a partir de Residuos Orgánicos.* *Revista Cientific*, 6(21), 40-57.

Chetrariu, A., y Dabija, A. (2020). *Brewer's Spent Grains: Possibilities of Valorization, a Review.* *Applied Sciences*, MDPI 10(16), 5619. <https://doi.org/10.3390/app10165619>

De La Rosa, A., Vasquez, A., Betancourt, S., Andrade, E., Bermúdez, D., Diaz, K., Ascacio, J., & Londoño, L. (2023). *Evaluación de medios de cultivos para el crecimiento de bacterias ácido lácticas probió-ticas y su potencial uso en alimentación de aves de corral.* *Publicaciones E Investigación*, 17(4). <https://doi.org/10.22490/25394088.7507>

Cizeikiene D, Juodeikiene G, and Damasius J (2018). *Use of wheat straw biomass in production of L-lactic acid applying biocatalysis and combined lactic acid bacteria strains belonging to the genus Lactobacillus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15:185–191. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.015>

Csatlos, N., Simon, E., Teleky, B., Szabo, K., Diaconeasa, Z., Vodnar, D., Ciont (Nagy), C., et al. (2023). *Development of a Fermented Beverage with Chlorella vulgaris Powder on Soybean-Based Fermented Beverage*. *Biomolecules*, 13(2), 245. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom13020245>

Dávila, J., Rosenberg, M., Cardona, C. (2016) *A biorefinery approach for the production of xylitol, ethanol and polyhydroxybutyrate from brewer's spent grain*. *AIMS Agric. Food*, 1, 52–66. <https://www.aimspress.com/fileOther/PDF/agriculture/agrfood-01-00052.pdf>

De Oliveira, P., Santos, L., Coelho, L., Neto, P., Sass, D., & Contiero, (2021). *Production of L (+) lactic acid by Lactobacillus casei KE11: Fed batch fermentation strategies*. *Fermentation*, 7(3), 151. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030151>

Derabli, B., Nancib, A., Nancib, N., Aníbal, J., Raposo, S., Rodrigues, B., & Boudrant, J. (2022). *Opuntia ficus indica waste as a cost effective carbon source for lactic acid production by Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, 370, 131005. doi:10.1016/j.foodchem.2021.131005

Ding, S., Yan, W., Ma, Y., y Fang, J. (2021). *The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals*. *Animal Nutrition*, 7(1), 24–30. doi:10.1016/j.aninu.2020.11.004

Estrada, J., Hernández, E., Romero, D., & Méndez, J. (2023). *Influence of anaerobic biotransformation process of agro- industrial waste with Lactobacillus acidophilus on the rheological parameters: case of study of pig manure*. *Archives of Microbiology*, 205(3). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03437-8>

Fiallos, B. (2022). *Reducción de impactos ambientales, aumento de la eficiencia productiva en la empresa fomm cía. Ltda., y propuesta de gestión de los residuos orgánicos mediante compostaje aerobio: propuesta de alternativa de compostaje aerobio para el aprovechamiento de residuos sólidos orgánicos generados en el proceso de cultivo, producción de aceite y hojas secas de moringa de la empresa fomm cía.ltda*. Repositorio Digital – EPN <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/23007>

Fina, J. (2019). *Caracterización funcional de la proteína de capa S(S-layer) de Lactobacillus acidophilus ATCC4356*. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica. Argentina. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/80080>

Girelli, A., Astolfi M., Romana F., (2020). *Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review*, *Chemosphere*. 244, 125368. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>.

Glowacki, S., Salamón, A., Sojak, M., Tulej, W., Bryś, A., Hutsol, T., Salamón, M., Kukharets, S., JanaszekMańkowska, M., (2022) *El uso del grano gastado de cervecería después de la producción de cerveza con fines energéticos*. *Materiales*,15, 3703. <https://doi.org/10.3390/ma15103703>.

Gomes, M., Rabelo, C., Sakamoto, I.K.; Silva, E.L.; Varesche, (2021). *Methane Production Using Brewery Spent Grain: Optimal Hydrothermolysis, Fermentation of Waste and Role of Microbial Populations*. *Waste Biomass Valorization*. M.B.A.

Gómez, A. (2019). *Microbioma, salud y enfermedad: probióticos, prebióticos y simbióticos*. *Biomédica*, 39(4), 617-621. Epub December 30, 2019. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=

González, S. (2022). *Eficiencia de las estrategias de mercadotecnia en la industria de la cerveza artesanal de Tijuana, Baja California* [Tesis de doctorado de la Universidad Autónoma de Baja California]. <https://doi.org/10.57840/uabc-242>

González, C., Rojas, Ó., Martínez, A., Carranza, A., Estrada, F., & Peña, J. (2020). *Kinetic parameters of lactobacillus plantarum and saccharomyces boulardii growing in a beet molasses Culture media*. Revista Mexicana De Ingeniería Química, 20(1), 467-478. <https://doi.org/10.24275/rmiq/bio2002>

González, A., Bustos, M., Rodríguez, G., Rodríguez, L., & Del Ángel, J. (2019). *Kinetics of lactic acid fermentation from sugarcane bagasse by Lactobacillus pentosus*. Revista Mexicana De Ingeniería Química, 19(1), 377-386. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim618>

Guamán, A. (2022). *Obtención de ácido láctico a partir del almidón del maíz chulpi (Zea mays sacchara) utilizando la fermentación de bacterias ácido lácticas, para su uso en la industria cosmética*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.

Guarda, E., Oliveira, A., Antunes, S., Freitas, F., Castro, P., Duque, A., Reis, M. (2021) *A two-stage process for conversión of brewer's spent grain into volatile fatty acids through acidogenic fermentation*. Appl. Sci., 11, 3222.

Guo, Y., Wang, G., Chen, H., Zhang, S., Li, Y., Guo, M., Liu, J. y Chen, G. (2022). *Fermentación continua por células T15 de Lactobacillus bulgaricus inmovilizadas en hidrogeles F127 reticulados para producir ácido D-láctico*. MDPI, 8(8), 360. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080360>

Guo, Z., Wang, X., Wang, H., Hu, B., Lei, Z., Kobayashi, M., Adachi, Y., Shimizu, K., & Zhang, Z. (2019). *Effects of nanobubble water on the growth of Lactobacillus acidophilus 1028 and its lactic acid production*. RSC Advances, 9(53), 30760-30767. <https://doi.org/10.1039/c9ra05868k>

Gutiérrez, R., y Salas, E. (2018). *Cepas de bacterias probióticas como terapia coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal*. Revisión de la literatura. Revista Odontológica de Los Andes, 13(1), 62–78.

Hernández, D., Ferrera, R., y Alarcón, A. (2019). *Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial*. Chilean journal of agricultural & animal sciences, 35(1), 98-112. <https://doi.org/10.29394/Scientific.issn.2542.2987.2021.6.21.2.40-57>

Hu J, Lin Y, Zhang Z, Xiang T, Mei Y, Zhao S, Liang Y, Peng N (2016). *High-titer lactic acid production by Lactobacillus pentosus FL0421 from corn stover using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation*. Bioresource Technol, 214: 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.034>

Insuasti, G., Pilamunga, C., Gallegos, J., & Pacurucu R., (2023). *Evidence of the antifungal and antimicrobial activity of lactic acid bacteria in various fermented substrates for food use*. Polo del Conocimiento, 8(2). Artículo 79. <https://doi.org/10.23857/pc.v8i2>

Kato, A., Nishida, K., Takada, M., Suda, K., Kawai, M., Shimizu, K., Rokutan, K. (2016). *Fermented milk containing Lactobacillus casei strain Shirota prevents the onset of physical symptoms in medical students under academic examination stress*. *Beneficial Microbes*, 7(2), 153–156. doi:10.3920/bm2015.0100

Khedkar, M., Nimbalkar, P., Gaikwad, S., Chavan, P., and Bankar, S. (2017). *Sustainable biobutanol production from pineapple waste by using Clostridium acetobutylicum B 527: Drying kinetics study*. *Bioresource Technol*, 225:359–366. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.058>

Lalić, A., Karlović, A., & Marić, M. (2023). *Use of Brewers' Spent Grains as a Potential Functional Ingredient for the Production of Traditional Herzegovinian Product Čufter*. *Fermentation*, MDPI 9(2),123. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020123>

Luo, J., Xiao, S., Wang, J., Wang, B., Cai, Y., & Hu, W. (2023). *The Metabolite Profiling and Microbial Community Dynamics during Pineapple By-Product Fermentation Using Co-Inoculation of Lactic Acid Bacteria and Yeast*. *Fermentation*, 9(2), 79. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation9020079>

Machado, K. (2020). *Uso de probióticos en el tratamiento y prevención de la diarrea aguda en niños*. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 91 (1), 35-45. <https://doi.org/10.31134/ap.91.1.6>

Mahmoud, E., (2019). *Valorization of spent coffee grounds into biofuels and value added products: pathway towards integrated bio-refinery*. *Fuel* 254, 115640.

Marcus, A., & Fox, G. (2021). *Fungal Biovalorization of a Brewing Industry Byproduct, Brewer's Spent Grain: A Review*. *MDPI Foods*, 10(9), 2159. <https://doi.org/10.3390/foods10092159>

Margallo, M., Ziegler, K., Vázquez, I., Aldaco, R., Irabien, A., Kahhat, R.(2019) *Enhancing waste management strategies in Latin America under a holistic environmental assessment perspective: A review for policy support*, *Sci. Total Environ.*689, 1255–1275. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.393>.

Marguet, E., Vallejo, M., Schulman, G., Ibañez, C., Ledesma, P., & Parada, R. (2017). *Biosilo de residuos de merluza y harina de cebada fermentados con bacterias ácidolácticas seleccionadas*. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*,15(2),112.[https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)112-120](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)112-120)

- Martínez, D., Narvaéz, B., Robledo, A., Charles, A., Martínez, A., & Rangel, S. 2020. *Inhibición de bacterias patógenas por bacterias ácido lácticas en quesos de cabra*. Investigación y Ciencia, 29(81), 24-31
- Mitri, S., Salameh, S., Khelfa, A., Leonard, E., Maroun, R., Louka, N., Koubaa, M. (2022) *Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review*. Fermentation, 8, 50. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020050>
- Molina, A. (2019). *Probiotics and their mechanism of action in animal feed*. Agronomy Mesoamerican, 30(2), 601–611. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34432>
- Monrroy C, M.(2019). *Evaluacion De Parámetros Fisicoquímicos En Una Cereza Utilizando Triticale Como Adjunto(x. Triticosecale Wittmack)* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Del Estado De México]. Repositorio Institucional. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/104878?show=full>
- Olivares, M., & Klotz, B. (2020). *Evaluación del efecto antifúngico de metabolitos de cultivos bioprotectores: Aplicación en derivados lácteos*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 18(2), 15. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(18\)15-25](https://doi.org/10.18684/BSAA(18)15-25)
- Onofre, S., Bertoldo, I., Abatti, D., & Refosco, D. (2018). *Physiochemical Characterization of the Brewers' Spent Grain from a Brewery Located in the Southwestern Region of Paraná - Brazil*. International Journal of Advanced Engineering Research and Science, 5(9), 18–21. <https://doi.org/10.22161/ijaers.5.9.3>
- Panghal, A.; Virkar, K.; Kumar, V.; Dhull, S.B.; Gat, Y.; Chhikara, N. (2017). Development of probiotic beetroot drink. Curr. Res. Nutr. Food Sci. 2017, 5, 257–262. : <https://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.5.3.10>
- Patel, A., Mikes, F., Bühler, S., Matsakas, L. *Valorization of brewers' spent grain for the production of lipids by oleaginous yeast*. Molecules 2018, 23, 3052. [CrossRef] [PubMed] <https://doi.org/10.3390/molecules23123052>
- Pérez, A. (2022). *Modelación matemática de la cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas para su uso aditivo microbiano en la alimentación animal*. Revista Ciencia Universitaria, 20(1).
- Petkova, M., Gotcheva, V., Dimova, M., Bartkiene, E., Rocha, J. M., & Angelov, A. (2022). *Screening of Lactiplantibacillus plantarum Strains from Sourdoughs for Biosuppression of Pseudomonas syringae pv. syringae and Botrytis cinerea in Table Grapes*. Microorganisms, 10(11), 2094. <https://doi.org/10.3390/microorganisms1012094>
- Pinhal, S., Ropers, D., Geiselmann, J., de Jong, H. (2019). *Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate*. J Bacteriol 201:e00147-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00147-19>

Plaza, P., Gallego, L., Peñuela, M., Lucas, S., García, M., & Coca, M. (2017). *Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by Clostridium beijerinckii*. *Bioresource Technology*, 244, 166–174. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.139

Quispe, M. (2023). *Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de las bacterias aerobias con la concentración de materia orgánica y biomasa*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional del Centro del Perú.

Rappaccioli, R., Zaror, V., & Herrera Jaramillo, S. (2021). *Probióticos: desafíos, revisión y alcance*. *Revista Medica Sinergia*, 6(6), e686. <https://doi.org/10.31434/rms.v6i6.686>

Romero, D, Estrada, J., Alvarado, A. (2023) et al. *Growth kinetics of lactobacillus acidophilus during the anaerobic biotransformation process of agro- sugarcane*. *Waste Biomass Valor*. <https://doi.org/10.1007/s12649-023- 02100-z>

Saarela, M. (2007). Methods to improve the viability and stability of probiotics. *Functional Dairy Products*, 2, 391-400 <https://doi.org/10.1533/9781845693107.3.391>

San Martin, D., Orive, M., Iñarra, B., Castelo, J., Estévez, A., Nazzaro, J., Zufía, J. (2020). *Brewers' Spent Yeast and Grain Protein Hydrolysates as Second-Generation Feedstuff for Aquaculture Feed*. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01145-8>

Sánchez, G., Espejel, A., Aguilar, E., & López, V. (2022). *Mexican Artisanal Beer: A perspective from the different agents of the system*. *Journal of Agroindustry Sciences*, 4(3), 101106. <https://doi.org/10.17268/jais.2022. 012>

Sánchez, N., Romero, D., Rosas, E., Hernández, E., & Méndez, J. (2022). *Determination of kinetic parameters of the anaerobic biotransformation process of corn cob (Zea Mays L.) with Lactobacillus acidophilus*. *Renewable Energy, Biomass & Sustainability*, 4(1), 38–43. <https://doi.org/10.56845/rebs.v4i1.67>

Shaoxiong Liang, Wei Jiang, Yibo Song, and Shu-Feng Zhou*(2020) *Improvement and Metabolomics-Based Analysis of d-Lactic Acid Production from Agro-Industrial Wastes by Lactobacillus delbrueckii Submitted to Adaptive Laboratory Evolution*. *Agric Food Chem*.2020, 68, 29, 7660–7669 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00259>

Sharma, A., Mukherjee, S., Reddy Tadi, S. R., Ramesh, A., & Sivaprakasam, S. (2021). *Kinetics of growth, plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic Lactobacillus plantarum CRA52*. *LWT*, 139, 110744. doi:10.1016/j.lwt.2020.110744 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110744>

Sorensen, H. M., Rochofort, K.D., Maye, S., Macleod, G.H.B., Brabazon, D., Loscher, C. E., and Freeland, B. (2022). *Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: production,*

purification and health benefits towards functional food Nutrients. MDPI 14(14), 2938. <https://doi.org/10.3390/nu14142938>

Swieca, M., Gawlik, U., Jakubczyk, A., Bochnak, J., Sikora, M., Suliburska, J. (2019) *Nutritional quality of fresh and stored legumes sprouts—Effect of Lactobacillus plantarum 299v enrichment*. Food Chem. 2019, 288, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.135>

Teixeira, Mr., Guarda, C., Freitas, E., Galinha, C., Duque, A., Reis, (2020) *Valorización del bagazo crudo de cervecería mediante la producción de ácidos grasos volátiles*. MAM Nueva Biotecnología.2020,57, 4–10. 4.

Triwahyuni, K., Sugiwati, S., y Abimanyu H, (2023) *Lactic acid production from oil palm empty fruit bunch using Lactobacillus delbrueckii* AIP Conference Proceedings 2606, 020017 ; <https://doi.org/10.1063/5.0118356>

Vieira, V., Matheus, D., (2019). *Environmental assessments of biological treatments of biowaste in life cycle perspective: a critical review*. Waste Manag. Res. 37 (12), 1183–1198