



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de
harina procedente de distintos bagazos de cerveza artesanal**

Chávez Robalino, Esteban Alejandro y Meneses Aguilar, Emilia Alejandra

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Ing. Sánchez LLaguno, Sungey Naynee. Ph.D.

01 de Marzo del 2022

Reporte de verificación de contenido



CHÁVEZ ESTEBAN Y MENESES EMILIA .pdf
Scanned on: 12:54 February 23, 2022 UTC



5.7%

Overall Similarity Score



6

Results Found



12744

Total Words in Text

Identical Words	383
Words with Minor Changes	59
Paraphrased Words	285
Omitted Words	0

COPYLEAKS Website | Education | Businesses



CHÁVEZ ESTEBAN Y MENESES EMILIA .pdf Scanned on: 12:54 February 23, 2022 UTC

Results

The results contain any sources we have found that include words with identical, minor changes, and paraphrased text in your submitted document.

 <p>BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO https://repositorio.unsabona.edu.co/bitstream/handle/10818/33440/Tesi...</p>	4%	<p>IDENTICAL</p> <p>Identical matches are one to one exact wording in the text.</p>
 <p>Tesis Maestría - Denia Alejandra Velasco B.pdf https://repositorio.unsabona.edu.co/bitstream/handle/10818/33440/Tesi...</p>	0%	<p>MINOR CHANGES</p> <p>Nearly identical with different form, is "low" becomes "slowly".</p>
 <p>Bacteriocinas - Nota: 13 - BACTERIOCINAS Las bacteriocinas r... https://www.studocu.com/pe/document/universidad-nacional-de-ingenier...</p>	0%	<p>PARAPHRASED</p> <p>Close meaning but different words used to convey the same message.</p>
 <p>PDF superior Determinación de hemólisis en cepas de Staph... https://library.oxfelo/determinacion-de-hemolisis-en-cepas-de-staphyloc...</p>	0%	<p>PARAPHRASED</p> <p>Close meaning but different words used to convey the same message.</p>
 <p>Tendencia@agazo.pdf http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/Docum...</p>	0%	<p>PARAPHRASED</p> <p>Close meaning but different words used to convey the same message.</p>
 <p>UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE - PDF Free Download https://docplayer.es/22469288-Universidad-austral-de-chile.html</p>	0%	<p>PARAPHRASED</p> <p>Close meaning but different words used to convey the same message.</p>

Unsure about your report?
 The results have been found after comparing your submitted text to online sources, open databases and the CopyLeaks internal database. For any questions about the report contact us on support@copyleaks.com
[Learn more about different kinds of plagiarism here](#)

Firma:



Firmado electrónicamente por:
SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO

.....

PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee
C.C: 1205348673
Directora del Proyecto de Investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, "**Estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de harina procedente de distintos bagazos de cerveza artesanal**" fue realizado por el señor **Chávez Robalino, Esteban Alejandro** y la señorita **Meneses Aguilar, Emilia Alejandra**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 01 de Marzo del 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO**

.....
Sánchez Llaguno, Sungey Naynee Ph.D
C.C: 1103235808



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotros, **Chávez Robalino, Esteban Alejandro y Meneses Aguilar, Emilia Alejandra**, con cédulas de ciudadanía N° 1803620101 y N° 2350083750, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de harina procedente distintos bagazos de cerveza artesanal**, es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 01 de Marzo del 2022

Firma

Chávez Robalino, Esteban Alejandro

C.C.: 1803620101

Meneses Aguilar, Emilia Alejandra

C.C.:2350083750



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotros **Chávez Robalino, Esteban Alejandro y Meneses Aguilar, Emilia Alejandra**, con cédulas de ciudadanía N° 1803620101 y N° 2350083750, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de harina procedente de distintos bagazos de cerveza artesanal** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 01 de Marzo del 2022

Firma

.....
Chávez Robalino, Esteban Alejandro
C.C.: 1803620101

.....
Meneses Aguilar, Emilia Alejandra
C.C.: 2350083750

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación a Dios por haberme dado la vida, salud, fortaleza y guía para culminar mi carrera profesional, y alcanzar mis objetivos planteados.

A mis padres, por ser el pilar fundamental en mi formación, por siempre estar a mi lado apoyándome y aconsejándome para hacer de mí una persona de bien.

A mi hermana, por estar siempre a mi lado apoyándome, dándome fuerzas para culminar esta meta.

Esteban

Dedico este trabajo a la persona más especial en mi vida, mi Papito Carlos (†), por ser mi compañero en mis noches de desvelo, por enseñarme que con determinación y sacrificio, se logra alcanzar las metas, por brindarme su amor incondicional, su protección durante mis años de vida y en especial mis estudios universitarios.

A mi padre Pedro, por enseñarme que por más fuertes y difíciles que sean las batallas que la vida nos coloca en el camino, no me debo rendir.

A mi madre Rocío, por ser mi motor que día a día me impulso a continuar con mis estudios.

Emilia Alejandra

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mis padres Rocío y Carlos, por su apoyo, confianza y sabios consejos brindados, corrigiendo mis errores y celebrando mis éxitos.

A mi hermana Lissette, por su apoyo y consejos día a día, para seguir adelante.

A la Familia Andrade – Chávez, en especial a mis tíos Leito y Marcelito (†) quienes me abrieron las puertas de su hogar mientras cursaba mis estudios.

A la Cervecería “Byggvir”, por donarnos la materia prima para la realización de esta investigación.

A la Ing. Yolanda Carrillo, docente del Instituto Calazacón, por su colaboración en el laboratorio de Agroindustrias.

A mi tutora Ph.D. Sungey Sánchez y al Ph.D. Juan Neira por su colaboración y asesoría en la realización de esta investigación.

A la Ing. Katty Medina por su buena predisposición, contribución y paciencia que nos brindó en cada etapa de laboratorio de nuestro trabajo de investigación

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por haberme abierto las puertas y poder estudiar mi carrera, así como también sus docentes que aportaron sus conocimientos para formarme día a día.

Esteban

Agradezco a Dios por guiarme y ser mi fortaleza en los momentos más difíciles de mi vida.

Agradezco a mis padres Rocío y Pedro por ser mi motivación para continuar con mis estudios.

Agradezco a mis hermanos Fernando y Simone por sus consejos y apoyo durante mis estudios.

Agradezco a mi Tutora Ph.D. Sungey Sánchez y Ph.D. Juan Neira, por brindarme su conocimiento durante toda mi etapa universitaria y asesoría en mi proyecto de investigación.

Agradezco a Ing. Katty Medina por su ayuda y colaboración durante la etapa de investigación en los laboratorios.

Agradezco a mis amigos Belén y Esteban por ser mis compañeros ideales de trabajo, hicieron esta etapa universitaria muy agradable.

Emilia Alejandra

Índice de Contenido

Carátula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de tablas	12
Índice de figuras	13
Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I	16
Introducción	16
Objetivos	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
Hipótesis	18
Hipótesis para el Factor A (Tipo de harina)	18
Hipótesis para el Factor B (Concentraciones de nisina)	18
Capítulo II	19
Revisión de literatura	19
Bagazo de Cerveza	19
El bagazo de cerveza y su impacto al medio ambiente	20
Enfoque y valorización biotecnológica del bagazo de cerveza para la generación de nuevos productos	20
Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	21
Bacteriocinas	21
Clasificación de las bacteriocinas	22
Nisina	23
Composición química y física de la Nisina	24
Estructura de la Nisina	25
Propiedades fisicoquímicas de la Nisina	25
Propiedades antimicrobianas y modo acción	25
Bacteriocinas de origen láctico en la industria de alimentos	26
Métodos de aplicación de bacteriocinas en alimentos	26
Inoculación del alimento con cultivos iniciadores	26

Adicción de bacteriocinas purificadas o semipurificadas	27
Cultivo productor de bacteriocina como ingrediente	27
Capítulo III	28
Metodología	28
Ubicación del área de investigación	28
Ubicación política	28
Ubicación geográfica	28
Ubicación Ecológica	28
Materiales	29
Adición de las distintas concentraciones de nisina a la harina proveniente del bagazo cervecero	29
Determinación de pH	29
Determinación de Acidez titulable	30
Determinación de Ceniza	30
Determinación de Humedad	31
Determinación de Grasas	31
Determinación de Fibra	31
Determinación de Proteína	32
Determinación de presencia de microorganismos	32
Métodos	32
Recolección de muestras de bagazo de cerveza artesanal	33
Elaboración de harina procedente de bagazo de cerveza artesanal	33
Tratamiento de harina procedente de bagazo de cerveza artesanal con bioconservante (nisina)	33
Diseño experimental	34
Factores del experimento	34
Tratamientos a comparar	35
Tipo de diseño	35
Repeticiones	35
Características de las unidades experimentales	35
Análisis estadístico	36
Esquema del análisis de varianza	36
Análisis funcional	36
Determinación de las características nutricionales, microbiológicas y organolépticas de la harina de bagazo.	36
Análisis organoléptico	36
Análisis fisicoquímicos y microbiológicos	37
Manejo específico del Experimento	38
Variables evaluadas	38
pH	38
Acidez titulable	39
Ceniza	40
Grasa	41
Proteína	42
Fibra bruta	42
Humedad	46
Recuento de UFC (Ensayo para aeróbios mesófilos, para Mohos – levaduras y Enterobacteriaceae)	47
Procedimiento	47

Capítulo IV	49
Resultados	49
Caracterización de la harina de bagazo de cerveza mediante análisis físicoquímicos.	49
Análisis de varianza para la variable Acidez titulable	50
Análisis de varianza para la variable Ceniza	51
Análisis de varianza para la variable Humedad	51
Análisis de varianza para la variable Grasa	52
Análisis de varianza para la variable Fibra	53
Análisis de varianza para la variable Proteína	53
Análisis microbiológicos	54
Análisis Organolépticas	63
Resultados de análisis de conglomerados en harina proveniente de bagazo de cerveza	64
Balance de materia	66
Rendimiento	67
Capítulo V	68
Discusión	68
Pruebas físicoquímicas a la harina proveniente de bagazo de cerveza	68
PH	68
Acidez	68
Ceniza	68
Grasa	69
Proteína	69
Fibra	70
Humedad	70
Pruebas microbiológicas	71
Capítulo VI	72
Conclusiones y recomendaciones	72
Conclusiones.	72
Factor A (Tipo de harina)	72
Factor B (Concentración de nisina)	72
Interacción A*B	72
Recomendaciones.	73
Capítulo VII	74
Bibliografía	74

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Nuevos productos a partir de bagazo de cerveza</i>	20
Tabla 2 <i>Bacteriocinas representativas producidas por BAL</i>	22
Tabla 3 <i>Composición física y química de la Nisina</i>	24
Tabla 4 <i>Recursos empleados para la aplicación de las distintas concentraciones de Nisina a la harina proveniente del bagazo cervecero</i>	29
Tabla 5 <i>Recursos utilizados para la determinación de pH en las muestras de harina.</i>	29
Tabla 6 <i>Recursos empleados para la determinación de acidez titulable en las muestras de harina.</i>	30
Tabla 7 <i>Recursos empleados para la determinación de ceniza en las muestras de harina.</i>	30
Tabla 8 <i>Recursos empleados para la determinación de humedad en las muestras de harina.</i>	31
Tabla 9 <i>Recursos empleados para la determinación de grasas en las muestras de harina.</i>	31
Tabla 10 <i>Recursos empleados para la determinación de grasas en las muestras de harina.</i>	31
Tabla 11 <i>Recursos empleados para la determinación de proteínas en las muestras de harina.</i>	32
Tabla 12 <i>Recursos empleados para la determinación de la presencia de microorganismos.</i>	32
Tabla 13 <i>Datos para tratamiento de harina procedente de bagazo de cerveza artesanal con el bioconservante</i>	34
Tabla 14 <i>Factores y niveles a probar en el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de harina proveniente de bagazo de cerveza artesanal.</i>	34
Tabla 15 <i>Tratamientos a comparar en el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de harina procedente de distintos bagazos de cerveza artesanal.</i>	35
Tabla 16 <i>Esquema del análisis de varianza del estudio del efecto de distintas concentraciones de Nisina como bioconservante de harina procedente de distintos bagazos de cerveza artesanal.</i>	36
Tabla 17 <i>Análisis fisicoquímicos</i>	37
Tabla 18 <i>Análisis microbiológicos</i>	37
Tabla 19 <i>Caracterización fisicoquímica de las harinas</i>	49
Tabla 20 <i>Resultados de análisis de varianza de pH de la harina.</i>	49
Tabla 21 <i>Resultados de análisis de varianza de acidez titulable de la harina.</i>	50
Tabla 22 <i>Resultados de análisis de varianza de ceniza de la harina.</i>	51
Tabla 23 <i>Resultados de análisis de varianza de Humedad de harina.</i>	51
Tabla 24 <i>Resultados de análisis de varianza de grasa de harina de bagazo</i>	52
Tabla 25 <i>Resultados de análisis de varianza de fibra de harina de bagazo</i>	53
Tabla 26 <i>Resultados de análisis de varianza de proteína de harina</i>	53
Tabla 27 <i>Parámetros microbiológicos</i>	54

Índice de figuras

Figura 1	Estructura molecular de la Nisina	25
Figura 2	Mecanismo de acción de lantibióticos (Clase I), no lantibióticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III).	26
Figura 3	Factor A (Tipo de harina)	55
Figura 4	Factor B (Concentración de Nisina)	57
Figura 5	Interacción A*B (Tipo de harina * Concentración)	59
Figura 6	Análisis Microbiológicos de Aerobios Mesófilos	61
Figura 7	Análisis Microbiológicos de Mohos y Levaduras	62
Figura 8	Análisis Microbiológicos de Enterobacteriaceae	63
Figura 9	Análisis organolépticas	64
Figura 10	Gráfico del análisis de componentes principales en harina	64
Figura 11	Sedimentación de componentes principales en harina	65

Resumen

La presente investigación tiene la finalidad de estudiar el efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de dos tipos de harina (tostada y sin tostar) procedente de diferentes bagazos de cerveza rubia artesanal. Dicha investigación se realizó en la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE extensión Santo Domingo de los Tsáchilas. Se planteó tres fases sucesivas para la ejecución de este estudio. La primera fase: Se recolectó dos tipos de bagazo de cerveza, la segunda fase: se elaboró la harina de forma artesanal, donde el primer paso fue pesar el bagazo, luego se procedió a deshidratarlo en un deshidratador industrial a una temperatura constante de 55 °C durante un tiempo de 5 horas, posteriormente se molió el bagazo seco en un molino artesanal, se tamizó la harina empleando un tamiz de 212 micras N° 70, y finalmente se almacenó la harina en fundas de polietileno herméticas con cierre. La tercera fase: se aplicó las distintas concentraciones de nisina (100, 200 y 300 ppm) en la harina con la ayuda de un atomizador estéril para posterior análisis fisicoquímico y microbiológico de las muestras aplicadas el bioconservante en laboratorio. Se planteó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (D.B.C.A.) con 8 tratamientos y 3 repeticiones, conformando 24 unidades experimentales, en donde se obtuvo como resultado que los mejores tratamientos fueron: Harina A (tostada) + 300 ppm y Harina B (sin tostar) +100 ppm, esto basado en los parámetros pH y acidez ya que son los factores que afectan la conservación en su almacenamiento. Una vez obtenido el producto final y realizados los respectivos análisis se procedió a un análisis sensorial aplicando un Diseño de Bloques Incompletos donde los resultados reflejaron la aceptación del producto por parte de los panelistas, tomando en cuenta que la aplicación de la nisina no influye en los parámetros analizados (color, olor, sabor y textura).

Palabras clave:

- **BAGAZO DE CERVEZA**
- **HARINA**
- **CONCENTRACIÓN DE NISINA**

Abstract

The purpose of this research is to study the effect of different concentrations of Nisin as a biopreservative of two types of flour (toasted and untoasted) from different bagasse of craft blonde beer. Said investigation was carried out at the University of the Armed Forces - ESPE extension Santo Domingo de los Tsáchilas. Three successive phases were proposed for the execution of this study. The first phase: Two types of beer bagasse were collected, the second phase: the flour was elaborated in an artisanal way, where the first step was to weigh the bagasse, then it was dehydrated in an industrial dehydrator at a constant temperature of 55 ° C for 5 hours, then the dry bagasse was ground in an artisanal mill, the flour was sifted using a 212 micron No. 70 sieve, and finally the flour was stored in hermetic polyethylene bags with closure. The third phase: the different concentrations of nisin (100, 200 and 300 ppm) were applied to the flour with the help of a sterile atomizer for subsequent physicochemical and microbiological analysis of the samples applied to the biopreservative in the laboratory. A Completely Randomized Block Design (DBCA) with 8 treatments and 3 repetitions was proposed, forming 24 experimental units, where the best treatments were obtained as a result: Flour A (toasted) + 300 ppm and Flour B (untoasted) +100 ppm, this based on the pH and acidity parameters since they are the factors that affect conservation in storage. Once the final product was obtained and the respective analyses were carried out, a sensory analysis was carried out applying an Incomplete Block Design where the results reflected the acceptance of the product by the panelists, taking into account that the application of nisin does not influence the parameters analyzed (color, smell, taste and texture).

Keywords:

- **BEER BAGASSE**
- **FLOUR**
- **NISIN CONCENTRATION**

Capítulo I

Introducción

En los últimos años la industria de cerveza artesanal ha incrementado la producción siendo la quinta industria más importante en el mundo, con una producción de 1,88 billones de hectolitros, generando un gran volumen de residuos que terminan como desecho (Kirin Beer University, 2016).

El bagazo cervecero es obtenido luego de prensar y filtrar el mosto tras la sacarificación del grano de cebada malteado, rico en proteína y fibra. El mismo que representa el 85 % de residuo luego de la maceración para la elaboración de la cerveza, este residuo conlleva grandes problemas de contaminación, mal olor y sobretodo proliferación de animales al no tener un buen tratamiento (Kanauchi et al., 2018).

En el Ecuador se producen aproximadamente 120,000 toneladas anuales de bagazo cervecero, el cual es generalmente utilizado como abono en plantas o principalmente desechado. Por este motivo, esta investigación encamina a la reutilización del bagazo de cerveza como harina, solucionando varios problemas que las cervecerías acarrearán aprovechando el desecho y transformándolo en materia prima, además de aportar en un solo producto varios nutrientes benéficos para el consumidor.

La aplicación de la biotecnología para la elaboración de harina a partir del bagazo cervecero no solo ayuda a la industria cervecera sino también al medio ambiente mediante el manejo de sus residuos industriales, esto le permite tomar un respiro al contribuir con su cuidado al reciclar, reutilizar desechos y en base a esto producir nuevos productos.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar el efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de harina procedente de distintos bagazos de cerveza artesanal.

Objetivos Específicos

- Elaborar harina proveniente de distintos bagazos de cerveza artesanal.
- Evaluar distintas concentraciones de nisina como bioconservante para determinar la vida útil de la harina.
- Determinar mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos las características de la harina antes y después de la aplicación del bioconservante.
- Determinar el rendimiento mediante balance de materia.

Hipótesis

Hipótesis para el Factor A (Tipo de harina)

Ho: El tipo de harina no influye en la conservación mediante la aplicación de nisina.

Ha: El tipo de harina influye en la conservación mediante la aplicación de nisina.

Hipótesis para el Factor B (Concentraciones de nisina)

Ho: Las distintas concentraciones de nisina aplicadas a la harina no influye en los parámetros de conservación.

Ha: Las distintas concentraciones de nisina aplicadas a la harina influye en los parámetros de conservación.

Capítulo II

Revisión de literatura

Bagazo de Cerveza

El bagazo de cerveza es un residuo insoluble resultante del proceso de filtración del mosto, durante la elaboración de la cerveza, por lo tanto, este subproducto representa el 31% del peso original de la cebada malteada y el 85% de los residuos totales, es rico en celulosa, polisacáridos no celulósicos, proteínas y β -glucano (Martinez, 2020).

El contenido de materia seca del bagazo húmedo de cerveza es de 20-25% y de energía metabolizable es 2,86 Mcal/kg. El bagazo de cerveza es un residuo de gran interés por su amplio uso en distintas áreas, por su disponibilidad durante todo el año, su bajo costo y sobre todo por su valiosa composición química. En la actualidad este residuo industrial no es aprovechado, a pesar de que contiene cantidades significativas de componentes valiosos, por ello su destino en su mayoría en zonas urbanas es como abono de tierras de cultivo, alimento de aves de corral y/o porcinos y desecho en un relleno sanitario, siendo este último un problema ambiental a corto tiempo (7-10 d), debido a su alto contenido de humedad y azúcar fermentable (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2019).

El bagazo de cerveza es básicamente un material lignocelulósico porque está conformado por cáscara de grano, pericarpio y fragmentos de endospermo. Su composición química en peso seco es predominantemente de carbohidratos de celulosa y hemicelulosa (17-25%) y no celulósicos (25-35%), proteína (10-30%), lignina (8-28%); y en menores cantidades por lípidos (<11%) y minerales (5%)(Robertson et al., 2010).

Uno de los ácidos fenólicos con mayor presencia en el bagazo, es el ácido ferúlico el cual tiene múltiples propiedades antimicrobianas, antiinflamatorios, anticancerígenas,

además el consumo de bagazo protege ante las enfermedades coronarias, reduce el colesterol plasmático y el índice plasmático (Gupta et al., 2010).

El bagazo de cerveza y su impacto al medio ambiente

En Ecuador se produce aproximadamente 120 toneladas al año de bagazo de cerveza y por su alto contenido de humedad y azúcar fermentable se vuelve un problema para el medio ambiente en un corto tiempo de 7-10 días. Además, este residuo industrial tiene como disposición final en un vertedero o relleno sanitario, donde su descomposición de forma anaeróbica genera metano, un gas de efecto invernadero 25 veces más potente que el dióxido de carbono, que además puede persistir durante varias décadas después de la eliminación de residuos, generando así un fuerte impacto sobre el medio ambiente (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2019).

Por esta razón al emplear el bagazo como materia prima para elaborar productos de consumo humano, es una propuesta oportuna como ejemplo de economía circular y un nuevo insumo de tipo renovable, siendo una medida efectiva para fortalecer una producción sostenible y las prácticas bajas en emisiones (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2019).

Enfoque y valorización biotecnológica del bagazo de cerveza para la generación de nuevos productos

Tabla 1

Nuevos productos a partir de bagazo de cerveza

Proyecto	Referencia
Evaluación de la incorporación de bagazo cervecero en salchichas veganas	(Imanol Leiva et al., 2021)
Extracción de ácido ferúlico a partir de subproductos del bagazo de cerveza	(Paula et al., 2019)

Reutilización de bagazo por secado y pelletización como suplemento forrajero	(Ferrari & Tittone, 2017)
Producción de biogás a partir de bagazo cervecero	(Rodríguez, 2012)

Fuente: Elaboración propia

Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Filogenéticamente son un grupo diverso de bacterias Gram positivas, se caracterizan por la producción de ácido láctico, sustancia con características antimicrobianas, tienen forma de cocos o bacilos, su gran mayoría son aertolerantes anaerobios. Según características bioquímicas se clasifican en homofermentativas, producto único de la fermentación es el ácido láctico y en heterofermentativas, se produce ácido láctico, etanol, acetato y CO₂ (Agudelo et al., 2015).

Las especies más empleadas para preservar los alimentos son *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. Estos microorganismos han sido aislados de granos, plantas verdes, productos lácteos y cárnicos, fermentación de verduras, y del tracto digestivo de animales y humanos (Ghanbari et al., 2013).

Bacteriocinas

Las Bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidas ribosómicamente por bacterias del grupo BAL, estas actúan contra microorganismos relacionados o responsables del deterioro de los alimentos y causantes de enfermedades, es por ello que se las emplea para la biopreservación, extensión de la vida útil, control de fermentaciones y otros. Su efecto bacteriostático o bacteriocida puede ser de espectro estrecho (misma especie) o espectro amplio (otros géneros) (Balciunas et al., 2013).

Su producción ocurre de manera natural dentro de la fase logarítmica del desarrollo microbiano o al final de la misma, generalmente cuando las bacterias se encuentran en situación de estrés (Vásquez M. et al., 2009). El género más estudiado por su efecto de bioconservación en alimentos es *Lactobacillus* (Agudelo et al., 2015).

Clasificación de las bacteriocinas

Las Bacteriocinas se agrupan en cuatro clases. La clase I está conformada por lantibióticos de amplio espectro, bajo peso molecular y con modificaciones post-traduccionales; la clase II son péptidos termoestables de bajo peso molecular, sin modificaciones, principal característica es la actividad antilisterial; la clase III son péptidos de mayor tamaño, termolábiles y la clase IV está conformada por moléculas complejas con fracciones de lípidos y carbohidratos (Agudelo et al., 2015).

Tabla 2

Bacteriocinas representativas producidas por BAL

Bacteriocinas	Productor	Espectro de inhibición	Tamaño (número de aminoácidos)
Clase I: Lantibióticos			
Nisina (A y Z)	<i>Lactococcus lactis</i>	Amplio	34
Lacticina 481	<i>Lactococcus lactis</i>	Amplio	27
Lactocina S	<i>Lactococcus sake</i>	Amplio	37
Carmocina U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Amplio	35-37
Clase II: No lantibióticos. Termoestables			
Lactococcina A	<i>Lactococcus lactis</i>	Estrecho	54
Lactococcina B	<i>Lactococcus lactis</i>	Estrecho	47

Lactacin F	<i>Lactococcus</i> <i>johsonii</i>	Estrecho	57
Plantaricina*	<i>Lactococcus</i> <i>planctarum</i>	Amplio	34
Sakacina P	<i>Lactococcus sake</i>	Amplio	41
Pediocina AcH	<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i>	Amplio	44
Divergicina M35*	<i>Carnobacterium</i> <i>divergens</i>	Amplio	43
Enterocina P*	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	Estrecho	44
Clase III: Mayor tamaño, termolábiles			
Helveticina J	<i>Lactococcus</i> <i>helveticus</i>	Estrecho	333
Clase IV: Moléculas complejas			
Circulina A*	<i>Geobacillus</i> <i>kaustophilus</i>	-	76

Fuente:(Hammami et al., 2007)

Nisina

Es producida por diversas cepas de *Lactococcus lactis subsp*, su aplicación es como bioconservante de alimentos, la FAO y OMS, aceptaron su uso y estableció la dosis aceptable que no puede ser mayor a 0,125 mg/Kg. Es la única bacteriocina incluida en la lista de aditivos alimentarios, Codex Alimentarius y la FDA le confirió el status de sustancia GRAS (*Generally Regarded as Safe*) (Agudelo et al., 2015).

Este conservante natural se emplea principalmente para prolongar la vida útil de diversos productos lácteos pasteurizados, evitar la alteración de las conservas y disminuir la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos enlatados (Agudelo et al., 2015).

Composición química y física de la Nisina

Tabla 3

Composición física y química de la Nisina

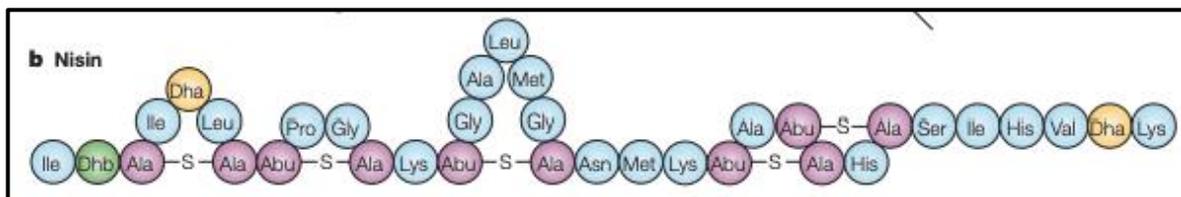
Nombre	Nisina
Fórmula	$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$
Peso molecular	3.354,07 g/mol
Numero CAS	1414-45-5
Forma	Polvo
Color	Beige
Solubilidad	Soluble en agua
Fuente	<i>Lactococcus lactis</i>
Olor	Sin datos disponibles
Concentración	2.5% (saldo de NaCl)
Temp. de almacenamiento	2-8°C
pH	Sin datos disponibles

Fuente: (Merck kGaA, 2022)

Estructura de la Nisina

Figura 1

Estructura molecular de la Nisina



Fuente: (Cotter et al., 2005)

Propiedades fisicoquímicas de la Nisina

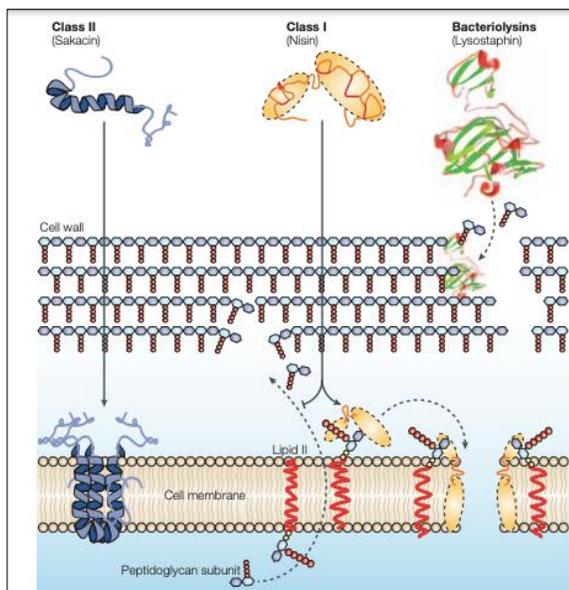
Sus propiedades fisicoquímicas la hacen resistente a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante el proceso de fabricación y almacenamiento, además, su pequeño tamaño le permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los alimentos (Agudelo et al., 2015).

Propiedades antimicrobianas y modo acción

El espectro de acción de la nisina incluye a potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos como son *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Escherichia coli*, entre otros. La acción de la nisina en las bacterias sensibles se realiza en la membrana citoplasmática, formando poros que afectan la fuerza motriz de protones y el equilibrio de pH ocasionado la pérdida de iones y la hidrólisis del ATP, resultando en la muerte celular (de Arauz et al., 2009).

Figura 2

Mecanismo de acción de antibióticos (Clase I), no antibióticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III).



Fuente: (Cotter et al., 2005)

Bacteriocinas de origen láctico en la industria de alimentos

Existe una gran demanda de productos de cuarta generación, que utilicen aditivos naturales, lo que ha aumentado el uso de las bacteriocinas producidas por BAL, debido a que son consideradas como conservadores naturales o biopreservadores. Además su aplicación tiene ventajas, éstas poseen una naturaleza peptídica que permite su degradación por parte de las enzimas digestivas, de esta forma resultan inocuas para el consumidor y su microbiota intestinal (Agudelo et al., 2015).

Métodos de aplicación de bacteriocinas en alimentos

Inoculación del alimento con cultivos iniciadores

En este método las bacterias ácido lácticas BAL producen las bacteriocinas *in situ*, durante el proceso de fabricación, el éxito de este método depende de la habilidad del cultivo para crecer y producir la bacteriocina en el alimento bajo condiciones ambientales y tecnológicas (temperatura, pH, aditivos, entre otros) (Diez Aldama, 2012).

Los cultivos iniciadores, no deben tener impacto en las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del alimento, así como no debe producir gas ni exopolisacáridos para evitar inflamamiento del empaque y la formación de viscosidades en las superficies de los productos (Vásquez M. et al., 2009).

Adición de bacteriocinas purificadas o semipurificadas

Este método permite usar dosis más precisas de bacteriocinas, ofreciendo una mejor herramienta de control para los productos, además se puede lograr una mejor distribución y evitar cambios físicos, químicos y organolépticos. Su aplicación se limita a la legislación de cada país, el costo vuelve a esta técnica poco atractiva (Vásquez M. et al., 2009).

Cultivo productor de bacteriocina como ingrediente

La adición de un cultivo productor como ingrediente (producción ex situ) consiste en añadir preparaciones de bacteriocina cruda, licor fermentado o concentrados obtenidos por el crecimiento de BAL productoras (Vásquez M. et al., 2009). Este método evita los costos de purificación de cada compuesto (Balciunas et al., 2013).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del área de investigación

Ubicación política

País: Ecuador

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas

Cantón: Santo Domingo

Parroquias: Zaracay y Luz de América

Ubicación geográfica

Las muestras de bagazo cervecero se obtuvieron en la Cervecería Artesanal “Byggvir” ubicada en la calle Cotopaxi y Puyo en Santo Domingo de los Tsáchilas.

La investigación y análisis fue desarrollada en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE sede Santo Domingo de los Tsáchilas, la misma que se encuentra ubicada en la Hacienda Zoila Luz, kilómetro 24 de la vía Santo Domingo - Quevedo, margen izquierdo, perteneciente a la parroquia Luz de América.

Ubicación Ecológica

Zona de vida:	Bosque húmedo tropical
Altitud:	224 msnm
Temperatura promedio:	24,6 °C
Precipitación:	260 mm/año
Humedad relativa:	85%
Heliofanía:	680 horas luz/año
Suelo:	Franco arenoso

Materiales

Adición de las distintas concentraciones de nisina a la harina proveniente del bagazo cervecero

Tabla 4

Recursos empleados para la aplicación de las distintas concentraciones de nisina a la harina proveniente del bagazo cervecero

Equipos	Insumos	Materiales/reactivos
Balanza	Espátula	Nisina A 2,5% marca
analítica	Agua destilada	Lactocomerce
	Vaso de precipitado de 50 mL	Harina
	Vidrio reloj	
	Atomizador	

Determinación de pH

Tabla 5

Recursos utilizados para la determinación de pH en las muestras de harina.

Equipos	Insumos	Reactivo
Potenciómetro	Vaso de precipitación	Agua destilada
	Agitador orbital	

Determinación de Acidez titulable

Tabla 6

Recursos empleados para la determinación de acidez titulable en las muestras de harina.

Equipos	Insumos	Reactivos
Balanza analítica	Matraz Erlenmeyer	Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.02 N
	Agitador orbital	Alcohol al 90%
	Soporte universal	Fenolftaleína
	Bureta de 50 mL	
	Agitador magnético	
	Plancha agitadora	

Determinación de Ceniza

Tabla 7

Recursos empleados para la determinación de ceniza en las muestras de harina.

Equipos	Insumos	Materiales
Mufla ajustada a 550° ±15°C	Crisol	Muestra de harina
Desecador	Pinzas	
Balanza analítica al 0,1 mg	Guantes	

Determinación de Humedad

Tabla 8

Recursos empleados para la determinación de humedad en las muestras de harina.

Equipos	Insumos	Materiales
Estufa ajustada a 130° ±3°C	Cajas Petri	Muestra de harina
Desecador	Guantes	
Balanza analítica al 0,1 mg		

Determinación de Grasas

Tabla 9

Recursos empleados para la determinación de grasas en las muestras de harina.

Equipos	Insumos	Reactivos
Desecador	Probeta	Eter etílico
Balanza analítica	Papel filtro	
Equipo de Soxhlet		
Extractor de humo		

Determinación de Fibra

Tabla 10

Recursos empleados para la determinación de grasas en las muestras de harina.

Equipos	Insumos	Reactivos
Estufa	Probeta	Acido Sulfurico (HSO ₄)
Balanza analítica	Embudo	Hidróxido de Sodio (NaOH)
Equipo de fibra	Pipeta	Agua destilada
Mufla	Matraz Erlenmeyer	Acetona
Bomba al vacío		

Determinación de Proteína

Tabla 11

Recursos empleados para la determinación de proteínas en las muestras de harina.

Equipos	Insumos	Materiales
Analizador Dumas de Proteína		Harina

Determinación de presencia de microorganismos

Tabla 12

Recursos empleados para la determinación de la presencia de microorganismos.

Equipos	Insumos	Reactivos
Vórtex	Vasos de precipitación	Agua peptonada
Incubadora	Micropipetas	Petrifilm para mohos y levaduras
Cámara de Flujo Laminar	Tubos de ensayo	Petrifilm para aerobios
Autoclave		Petrifilm para enterobacterias

Métodos

Para el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de harina procedente de distintos bagazos de cerveza artesanal se plantearon tres fases sucesivas, descritas a continuación:

Primera fase: recolección de los dos tipos de bagazo de cerveza

Segunda fase: elaboración de la harina de forma artesanal

Tercera fase: análisis de la muestra aplicada el bioconservante en laboratorio.

Recolección de muestras de bagazo de cerveza artesanal

Para la recolección de las muestras de bagazo, materia prima para la elaboración de la harina, se procedió de la siguiente manera; luego del proceso de filtración del mosto, el bagazo húmedo es prensado para extraerle el exceso de humedad, luego es almacenado en tachos de plástico herméticos. Ambos bagazos fueron se obtuvieron de la Cervecería Byggvir, los bagazos correspondían a las variedades cebada tostada y cebada sin tostar.

Elaboración de harina procedente de bagazo de cerveza artesanal

Para la transformación del bagazo en harina, se comenzó por pesar el bagazo en una balanza para determinar la cantidad de producto a secar, luego se procedió a deshidratar el bagazo en un deshidratador industrial a una temperatura constante de 55 °C durante un tiempo de 5 horas, posterior a ello se continuó con el proceso de molienda en un molino artesanal y finalmente se tamizó la harina empleando un tamiz de 212 micras N° 70, el mismo que es indicado dentro de las normas INEN 616, como adecuado para harinas panaderas, finalmente se procede a almacenar la harina en fundas de polietileno herméticas con cierre.

Tratamiento de harina procedente de bagazo de cerveza artesanal con bioconservante (nisina)

Para la conservación de la harina se adicionaron distintas concentraciones de nisina (100, 200 y 300 ppm) en 700 gr de cada uno de los tipos de harina como se detalla en la tabla 12, tomando como referencia la norma general para los aditivos alimentarios CODEX STAN 192-1995, en la cual se detalla que la dosis máxima es 12,5 mg/Kg. Pg 238.(CODEX ALIMENTARIUS, 2019) y en cuanto al procedimiento de elaboración de la harina se tomó en consideración el trabajo realizado en el estudio de (Pantoja, 2020).

Tabla 13

Datos para tratamiento de harina procedente de bagazo de cerveza artesanal con el bioconservante

Concentración de nisina (ppm)	Masa de muestra de harina de bagazo	Masa soluto de la nisina
100 ppm	0,70 Kg	10 mg
200 ppm	0,70 Kg	20 mg
300 ppm	0,70 Kg	40 mg

Diseño experimental

Factores del experimento

Tabla 14

Factores y niveles a probar en el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de harina proveniente de bagazo de cerveza artesanal.

Factores	Niveles
Tipo de harina (A)	a0= Harina tostada a1= Harina sin tostar
Concentración de nisina (B)	b0= sin bioconservante b1= 100 ppm b2= 200 ppm b3= 300 ppm

Tratamientos a comparar

Tabla 15

Tratamientos a comparar en el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de harina procedente de distintos bagazos de cerveza artesanal.

N° Tratamiento	Tratamientos(interacciones)	Descripción
T1	a0b0	Harina tostada + sin bioconservante
T2	a0b1	Harina tostada + 100 ppm
T3	a0b2	Harina tostada + 200 ppm
T4	a0b3	Harina tostada + 300 ppm
T5	a1b0	Harina sin tostar + sin bioconservante
T6	a1b1	Harina sin tostar + 100 ppm
T7	a1b2	Harina sin tostar + 200 ppm
T8	a1b3	Harina sin tostar + 300 ppm

Tipo de diseño

Se empleó ANOVA con modelo bifactorial (2x4) con un diseño de bloques completamente al azar (D.B.C.A.) donde A corresponde al tipo de harina, B a la concentración de nisina aplicada, cada tratamiento se desarrolló con 3 repeticiones.

Repeticiones

Los 8 tratamientos incluyeron 3 repeticiones por cada tratamiento, dando un total de 24 unidades experimentales.

Características de las unidades experimentales

Para esta investigación se aplicó un modelo factorial en la cual se emplearon 8 tratamientos (200 g de cada uno) con tres réplicas para cada uno, de los cuales, 4 fueron de harina tostada y los 4 restantes de harina sin tostar, de estos 2 corresponden a la

concentración de 100 ppm, 200 ppm y 300 ppm de nisina, de igual manera se realizó sin aplicar bioconservante.

Análisis estadístico

Esquema del análisis de varianza

Tabla 16

Esquema del análisis de varianza del estudio del efecto de distintas concentraciones de Nisina como bioconservante de harina procedente de distintos bagazos de cerveza artesanal.

Fuentes de Variación		Grados de Libertad
Tipo de harina (A)	a-1	1
Concentración de Nisina (B)	b-1	3
AxB	(a-1)(b-1)	3
Réplicas	d-1	2
Error experimental		14
Total	(abd)-1	23

Análisis funcional

Para aquellas variables con análisis de varianza significativos, se aplicó la prueba de significancia de Tukey al 5%.

Determinación de las características nutricionales, microbiológicas y organolépticas de la harina de bagazo.

Análisis organoléptico

Todas las muestras se evaluaron en una escala del 1 a 5; siendo 5 el valor correspondiente a la muestra que en la variable de medida se ajuste mejor a la característica deseada.

Una vez elaborado el producto final se realizó una prueba organoléptica en donde participaron 14 panelistas no entrenados, a los resultados obtenidos se aplicó la prueba de bloques incompletos.

Posteriormente se obtuvo los resultados de la catación, se realizó las tabulaciones para aplicar el diseño experimental y obtener el mejor tratamiento según los parámetros color, olor, sabor y textura.

Análisis fisicoquímicos y microbiológicos

En la tabla 17 y 18 se aprecian los análisis fisicoquímicos y microbiológicos que se realizaron a las muestras de harina, los mismos que se describen a continuación:

Tabla 17

Análisis fisicoquímicos

Variables nutricionales	Método	Unidad
pH	INEN 526	-
Acidez titulable	INEN 521	(g/1000 mL)
Ceniza	INEN 520	%
Grasa	INEN 523	%
Proteína	AOAC 920.87	%
Fibra	INEN 522	%
Humedad	INEN 518	%

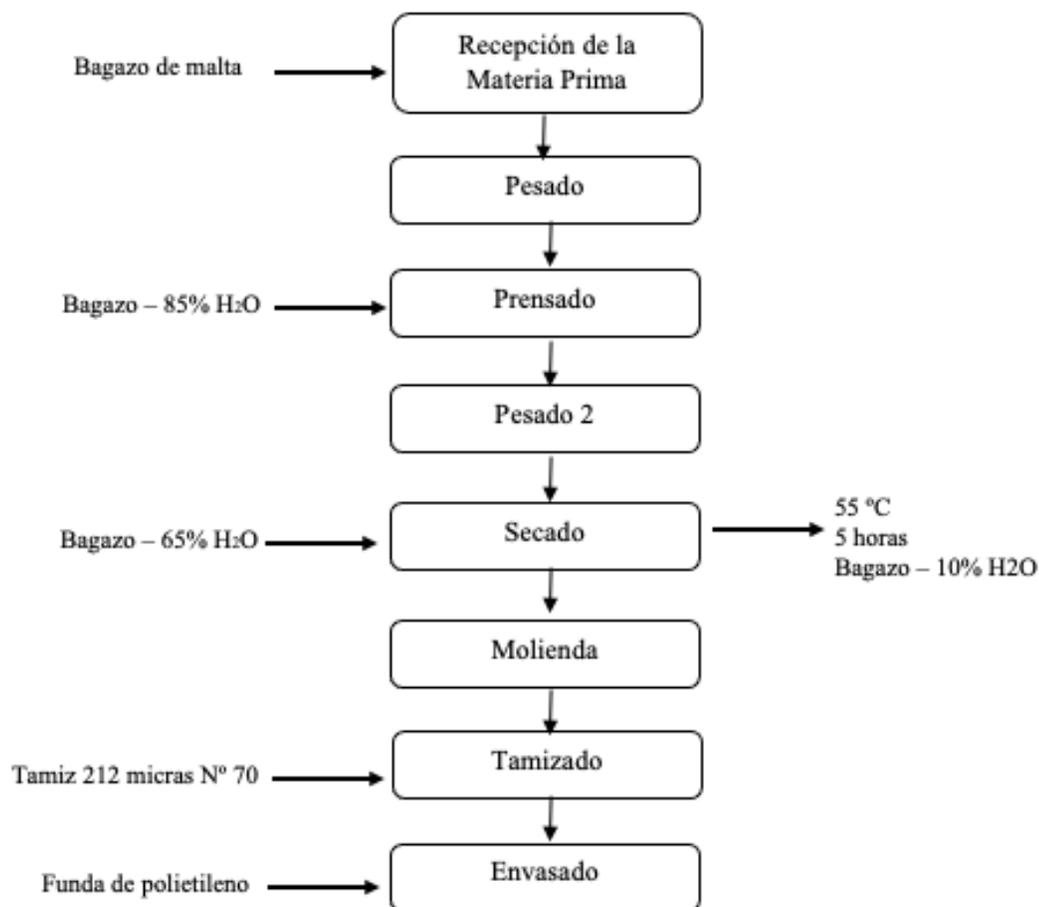
Tabla 18

Análisis microbiológicos

Variables microbiológicas	Método
Recuento de Enterobacteriaceae	INEN 1529-13
Recuento de Mohos y levaduras	INEN 1529-10
Recuento de aerobios mesófilos	INEN 1529-5

Manejo específico del Experimento

Diagrama de flujo para la elaboración de harina de bagazo de cerveza artesanal.



Variables evaluadas

Para los análisis físico-químicos de la harina procedente de bagazo de cerveza se han tomado como referencia las NTE-INEN 526:2013 (INEN, 2013b).

pH

- Calibrar el potenciómetro con los buffers de pH 4,01 y pH 9,18.
- En un vaso de precipitación colocar 10 gramos de la muestra de harina.
- Añadir 100 mL de agua destilada y agitar suavemente durante 30 min.

- Dejar reposar por 10 min y decantar el sobrenadante en un vaso de precipitación.
- Determinar el pH por lectura directa, introducir el electrodo del potenciómetro en el vaso de precipitación con el líquido sobrenadante.

Acidez titulable

El procedimiento se desarrolló tomando en cuenta la norma NTE INEN 521

- Pesar 5 g de la harina con aproximación de 0,1 mg y transferir al matraz Erlenmeyer de 100 cm^3 .
- Agregar lentamente 50 cm^3 de alcohol de 90 %(V/V), tapar el matraz Erlenmeyer y agitar fuertemente.
- Dejar en reposo durante 24 h. agitando de vez en cuando.
- Tomar con la pipeta una alícuota de 10 cm^3 del líquido sobrenadante y transferir al matraz Erlenmeyer de 50 cm^3 ; agregar 2 cm^3 de la solución indicadora de fenolftaleína.
- Agregar lentamente y con agitación la solución de 0,02 N de hidróxido de sodio, hasta conseguir un color rosado que persista durante 30 s.
- Leer en la bureta el volumen de la solución empleada, con aproximación de 0,05 cm^3 .
- Determinar la acidez titulable mediante el siguiente cálculo.

$$A = \frac{490 * N * V}{m (100 - H)} * \frac{V_1}{V_2}$$

Donde,

A = contenido de acidez en las harinas de origen vegetal, en porcentaje de masa de ácido sulfúrico.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

V = cm^3 de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación.

- V_1 = cm^3 del alcohol empleado.
- V_2 = cm^3 de la alícuota tomada para la titulación.
- m = masa de la muestra, en g.
- H = porcentaje de humedad en la muestra.

Ceniza

Esta técnica se desarrolló tomando en cuenta la norma NTE INEN 520:2013 (INEN, 2013a).

- Calentar el crisol de porcelana en la estufa ajustada a $550^\circ \pm 15^\circ C$ durante 30 min. Dejar enfriar en el desecador y pesar con aproximación de 0,1 mg.
- Trasferir al crisol la muestra y pesar aproximadamente 3 g de la muestra con aproximación de 0,1 mg.
- Colocar el crisol con su contenido cerca de la puerta de la mufla abierta por pocos minutos, para evitar pérdidas por proyección de material.
- Introducir el crisol a la mufla a (550 15) hasta obtener cenizas de un color gris claro.
- Sacar de la mufla el crisol con la muestra, dejar enfriar en el desecador y pesar, con aproximación de 0,1mg.
- Determinar las cenizas mediante el siguiente cálculo.

$$C = \frac{100 (m_3 - m_1)}{(100 - H)(m_2 - m_1)}$$

Donde,

C = contenido de cenizas en harinas de origen vegetal, en porcentaje de masa.

m_1 = masa de crisol vacío, en g.

m_2 = masa de crisol con la muestra (antes de incineración), en g.

m_3 = masa de crisol con la ceniza (después de incineración), en g

H = porcentaje de humedad en la muestra.

Grasa

Esta técnica se desarrolló tomando en cuenta la norma NTE INEN 523(INEN, 1980).

- Secar los vasos beakers en la estufa a $100 \pm 3^\circ\text{C}$, por 1h. Transferir al desecador y pesar con aproximación de 0,1 mg.
- Pesar aproximadamente 5 g de muestra sobre un papel filtro y colocarlos en el interior del dedal, taponar con suficiente algodón, luego introducirlo en el portadedal.
- Colocar el dedal y su contenido en el vaso beaker, llevar a los ganchos metálicos del aparato de golfish.
- Adicionar en el vaso beaker 50 mL de solvente, al mismo tiempo abrir el reflujo de agua.
- Colocar el anillo en el vaso y llevar a la hornilla del aparato de golfish, ajustar al tubo refrigerante del extractor. Levantar las hornillas y graduar la temperatura a 55°C .
- Terminada la extracción, bajar con cuidado los calentadores, retirar momentáneamente el vaso con el anillo, sacar el portadedal con el dedal y colocar el vaso recuperar del solvente.
- Levantar los calentadores, dejar hervir hasta que el solvente este casi todo en el vaso de recuperación.
- Bajar los calentadores, retirar los beaker, con el residuo de la grasa, el solvente transferir al frasco original.

- Colocar los vasos beaker en la estufa a 105°C, hasta completar la evaporación del solvente por 30 min.
- Dejar enfriar los beaker en el desecador, luego pesar y registrar.
- Determinar el porcentaje de grasa mediante el cálculo de la fórmula.

$$G = \frac{Pf - Pi}{\mu} * 100$$

G = porcentaje de grasa.

μ = masa de la muestra, en g

Pf = peso final del beaker con muestra, en g.

Pi = peso inicial del beaker sin muestra, en g.

Proteína

Analizador de Nitrógeno-DUMAS

- Pesar 50 mg de muestra.
- Colocar en el horno del equipo y calibrar el equipo.
- Determinar el contenido de nitrógeno empleando la fórmula.

$$P = \%N * F$$

Donde:

P = porcentaje de proteína.

$\%N$ = porcentaje de nitrógeno

F = factor de conversión (5,83).

Fibra bruta

1. Preparación de la muestra

- Moler la muestra de tamiz de 1 mm.
- Llenar los crisoles con las muestras molidas y colocarlo en la "gradilla porta – crisoles". Esta gradilla se puede fijar en la parte frontal de la unidad

principal. Mediante la “asa de crisoles” recoger los crisoles e introducirlos en la unidad principal frente a las resistencias. Bajar la palanca de fijación y bajar la palanca reflectora.

- Situar los mandos de las válvulas en posición “OFF”.
- Abrir el grifo de entrada de agua refrigerante con caudal entre 1 y 2 litros/minuto.
- Accionar el intercepto principal (Power), el piloto ámbar se iluminará. El potenciómetro en posición “OFF”.

2. Proceso de extracción caliente

- Levantar la tapa superior y agregar el reactivo en cada columna, determinar la cantidad de reactivos mediante la escala graduada de cada columna.
- Girar el potenciómetro de ajuste (sentido horario) hasta la posición 80 - 90%, la resistencia se pone en marcha.
- Agregar antiespumante en cada columna.
- Cuando el reactivo empiece a hervir, disminuir la potencia de calor girando el potenciómetro (sentido antihorario) hasta 20 – 30%.
- Mientras dura la extracción puede aprovecharse en calentar el segundo reactivo o agua destilada.
- Una vez finaliza la extracción apagar el calefactor por el interruptor.
- Abrir el grifo de la trompa de agua (si se ha utilizado este sistema para producir presión de vacío), ubicar los mandos de la válvula en posición “Aspirar”. Una vez completada la filtración cerrar la válvula.

- Si durante la filtración es necesario disolver el residuo, accionar el interruptor de bomba de aire (PRESSURE) y situar el mando de la válvula en la posición “Soplar” volviendo luego a la posición “Aspirar”. La potencia de la bomba de soplar es ajustable interiormente.
- Lave la muestra con agua destilada caliente utilizando un bote pulverizado. El agua se la introduce por la entrada de cada columna situando los mandos de las válvulas en la posición “Aspirar” para dejar la muestra seca. Cerrar de nuevo las válvulas. Si el método precisa de varias extracciones repetir el proceso.
- Para sacar los crisoles de la unidad de extracción utilice el “asa portacrisoles” encajando los crisoles y librándolos desbloqueados de la palanca de la izquierda.
- Trasladarlos a la gradilla.

3. Procedimiento

- Pesar (con una precisión de ± 1 mg) de 2 gr. de muestra en un crisol poroso. La cantidad de muestra es W0.
- Introducir los cristales en el Dosi-Fiber.

4. Hidrólisis ácida en caliente

- Asegurarse que las válvulas estén en posición “Cerrado”.
- Añadir 100 - 150 ml de H_2SO_4 caliente en cada columna y unas gotas de antiespumante.
- Abrir el circuito de refrigeración y activar las resistencias calefactoras (potencial 90%).

- Esperar a que hierva, reducir el potencial al 30% y dejar hervir durante el tiempo de extracción (30 min a una 1 hora dependiendo del material). Para una hidrólisis más efectiva accionar la bomba de aire en posición “Soplar”.
- Para la calefacción abrir el circuito de vacío y poner los mandos de la válvula en posición “Adsorción”, lavar con agua destilada y filtrar. Repetir este proceso tres veces.

5. Hidrólisis básica en caliente

- Repetir los pasos 3 y 7 pero utilizando KOH o NaOH de H₂SO₄.

6. Extracción en frío con acetona

No realizar las extracciones en frío con acetona en el equipo Dosi-Fiber

- Preparar el “kitasatos” con las trompas de vacío, situar el crisol de la entrada del kitasato y añadir acetona a la vez que el circuito de vacío está adsorbiendo hacia el frasco. Repetir esta operación tres veces.
- Colocar las muestras de secar en la estufa a 150 °C durante 1 hora.
- Dejar enfriar en el desecador.
- Pesar con una precisión de ±0.1 mg. La cantidad pesada es W1.
- Incinerar las muestras de los crisoles en el horno de mufla a 500 °C durante un tiempo de 3 horas.
- Dejar enfriar en el desecador, tener en cuenta las recomendaciones dadas para la manipulación de los crisoles.
- Pesar los crisoles con una precisión de ±1 mg. La cantidad pesada es W2.

$$\%Fibra\ bruta = \frac{W1 - W2}{W0} * 100$$

Donde:

W0 = peso de la muestra

W1 = peso del crisol + muestra seca

W2 = peso del crisol + muestra calcinada

Humedad

Esta técnica se desarrollo tomando en cuenta la norma NTE INEN518.

- Calentar el pesafiltro y tapa durante 30 min en la estufa a $130 \pm 3^\circ\text{C}$. Enfriar en el desecador y pesar.
- Pesar 2 g de la muestra de harina, transferirla al pesafiltro y distribuirla uniformemente.
- Calentar el pesafiltro y su contenido durante una hora, en la estufa a $130 \pm 3^\circ\text{C}$.
- Sacar el pesafiltro, transferirlo al desecador, y tan pronto se haya enfriado, pesar.
- Repetir las operaciones de calentamiento, enfriamiento y pesaje, hasta que la diferencia de masa entre los resultados de dos operaciones de pesaje sucesivas no exceda 0,1 mg.
- Para determinar la humedad se debe realizar el siguiente calculo.

$$P_c = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100$$

Donde:

Pc = pérdida por calentamiento, en porcentaje de masa.

m_1 = masa del pesafiltro vacío con tapa, en g.

m_2 = masa del pesafiltro y tapa, con la muestra sin secar, en g.

m_3 = masa del pesafiltro y tapa, con la muestra seca, en g.

Recuento de UFC (Ensayo para aeróbios mesófilos, para Mohos – levaduras y Enterobacteriaceae)

Esta técnica se desarrolló tomando en cuenta las normas NTE INEN 1529-5;1529-10;1529-13.

Preparación de la muestra

- Preparar una solución de peptona al 5% y añadir 9 mL de la solución en cada tubo de ensayo empleado en el estudio.
- Autoclavar los tubos de ensayo a 121°C por 20 min.
- Preparar la solución madre (10^{-1}) con 45 mL de agua de peptona y 5 g de harina, mezclar bien con la ayuda de un vortex o agitador orbital.
- Extraer 1mL de la solución madre, añadir en tubo, agitar y de esta forma se obtiene la dilución (10^{-2}).
- Repetir el proceso hasta obtener la disolución (10^{-9}).

Procedimiento

- En condiciones asépticas, se colocó 1 mL de la disolución (10^{-9}) de la muestra en un Petri film para aerobios, repetir el proceso para el Petri film específico para hongos y levaduras.
- Repetir el proceso anterior con la disolución (10^{-2}), en el caso de las Petri film de Enterobacterias.
- Colocar dentro de la incubadora los Petri film para aerobios a una temperatura de 37 °C durante 48 h, en el caso de los Petri film para hongos- levaduras se incubó durante 72 h a temperatura ambiente y las Petri film de enterobacterias se incubó a una temperatura de 37 °C durante 24 h.
- Determinar la cantidad de UFC en cada Petri film, empleando un contador de colonias.

- El número de microorganismos se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{UFC}{ml}\right) = \frac{n * f}{v}$$

Donde:

- n = número de colonias por placa
f = factor de dilución
v = volumen inoculado en la placa

Capítulo IV

Resultados

Caracterización de la harina de bagazo de cerveza mediante análisis fisicoquímicos.

Los bagazos empleados en la investigación provienen de las variedades de cebada sin tostar y cebada tostada, materia prima para la elaboración de cerveza rubia artesanal. Los resultados de la caracterización fisicoquímica se muestran en la tabla 19:

Tabla 19

Caracterización fisicoquímica de las harinas

Muestra	pH	Fibra (%)	Ceniza (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Humedad (%)	Acidez g/100mL
Harina A (tostada)	5,65	6,46	2,3	4,35	13,46	9,07	0,41
Harina B (sin tostar)	4,38	4,53	2,2	5,41	20,45	8,20	0,86

Análisis de varianza para la variable pH

Tabla 20

Resultados de análisis de varianza de pH de la harina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Valor-P
Tipo de Harina	9,68	1	9,68	20450,35	<0,0001*
Concentración	1,5E-03	3	5,0E-04	1,06	0,3987
Repetición	7,7E-04	2	3,9E-04	0,82	0,4610
Tipo de Harina*Concentración	3,0E-04	3	1,0E-04	0,21	0,8869*
Error	0,01	14	4,7E-04		
Total corregido	9,69	23			

De acuerdo con la tabla 20 (Resultados de análisis de varianza de pH de harina) nos indica, diferencia significativa en: Factor A (Tipo de Harina) y en la interacción A*B (Tipo de harina y concentración), mientras que en: Factor B (Concentración) y en repetición, no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable Acidez titulable

Tabla 21

Resultados de análisis de varianza de acidez titulable de la harina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Valor-P
Tipo de Harina	1,51	1	1,51	18242,50	<0,0001*
Concentración	0,03	3	0,01	137,41	<0,0001*
Repetición	1,3E-04	2	6,7E-05	0,81	0,4650
Tipo de Harina*Concentración	0,01	3	2,6E-03	31,96	<0,0001*
Error	1,2E-03	14	8,3E-05		
Total corregido	1,55	23			

De acuerdo con la tabla 21 (Resultados de análisis de varianza de Acidez titulable de harina) nos indica, diferencia significativa en: Factor A (Tipo de Harina), Factor B (Concentración) y en la interacción A*B (Tipo de harina y concentración), mientras en repetición, no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable Ceniza

Tabla 22

Resultados de análisis de varianza de ceniza de la harina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Valor-P
Tipo de Harina	0,02	1	0,02	5,16	0,0395*
Concentración	0,08	3	0,03	6,46	0,0057*
Repetición	0,02	2	0,01	1,79	0,2025
Tipo de Harina*Concentración	0,03	3	0,01	2,11	0,1448*
Error	0,06	14	4,3E-07		
Total corregido	0,21	23			

De acuerdo con la tabla 22 (Resultados de análisis de varianza de Ceniza) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Tipo de Harina), Factor B (Concentración) e interacción A*B (Tipo de Harina*Concentración), mientras que en repetición no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable Humedad

Tabla 23

Resultados de análisis de varianza de Humedad de harina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Valor-P
Tipo de Harina	5,24	1	5,24	3000,58	<0,0001*
Concentración	2,20	3	0,73	419,33	<0,0001*
Repetición	0,01	2	4,7E-03	2,69	0,1025
Tipo de Harina*Concentración	0,01	3	3,0E-03	1,72	0,2079*
Error	0,02	14	1,7E-03		
Total corregido	7,48	23			

De acuerdo con la tabla 23 (Resultados de análisis de varianza de Humedad) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Tipo de Harina), Factor B (Concentración) e interacción A*B (Tipo de Harina*Concentración), mientras que en repetición no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable Grasa

Tabla 24

Resultados de análisis de varianza de grasa de harina de bagazo

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medios	F	Valor-P
Tipo de Harina	7,39	1	7,39	2103,09	<0,0001*
Concentración	0,05	3	0,02	4,68	0,0182*
Repetición	0,01	2	2,6E-03	0,73	0,4975
Tipo de Harina*Concentración	0,01	3	3,8E-03	1,07	0,3930*
Error	0,05	14	3,5E-03		
Total corregido	7,50	23			

De acuerdo con la tabla 24 (Resultados de análisis de varianza de Grasa) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Tipo de Harina), Factor B (Concentración), e interacciones A*B (Tipo de Harina*Concentración), mientras que, en repetición, no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable Fibra

Tabla 25

Resultados de análisis de varianza de fibra de harina de bagazo

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Valor-P
Tipo de Harina	19,84	1	19,84	8168,68	<0,0001*
Concentración	0,01	3	1,9E-03	0,77	0,5272
Repetición	5,2E-04	2	2,6E-04	0,11	0,9000
Tipo de Harina*Concentración	0,03	3	0,01	3,76	0,0360*
Error	0,03	14	2,4E-03		
Total corregido	19,91	23			

De acuerdo con la tabla 25 (Resultados de análisis de varianza de fibra) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Tipo de Harina), interacción A*B (Tipo de Harina*Concentración), mientras que en: Factor B (Concentración) y repetición no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable Proteína

Tabla 26

Resultados de análisis de varianza de proteína de harina

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Valor-P
Tipo de Harina	222,13	1	222,13	32032901,69	<0,0001*
Concentración	1,29	3	0,43	62182,84	<0,0001*
Repetición	3,6E-05	2	1,8E-05	2,57	0,1124
Tipo de Harina*Concentración	2,02	3	0,67	97236,05	<0,0001*
Error	9,7E-05	14	6,9E-06		
Total corregido	225,45	23			

De acuerdo con la tabla 26 (Resultados de análisis de varianza de Proteína) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Tipo de Harina), Factor B (Concentración), y en la interacción A*B (Tipo de Harina*Concentración), mientras que en repetición no se encontró diferencia significativa.

Análisis microbiológicos

Estos análisis sirven para determinar que el producto esté libre de microorganismos perjudiciales y sean aptos para el consumo humano. Principalmente se emplean para :

- Seguridad higiénica del producto.
- Ejecución de prácticas adecuadas de producción.
- Generar calidad comercial.

Tabla 27

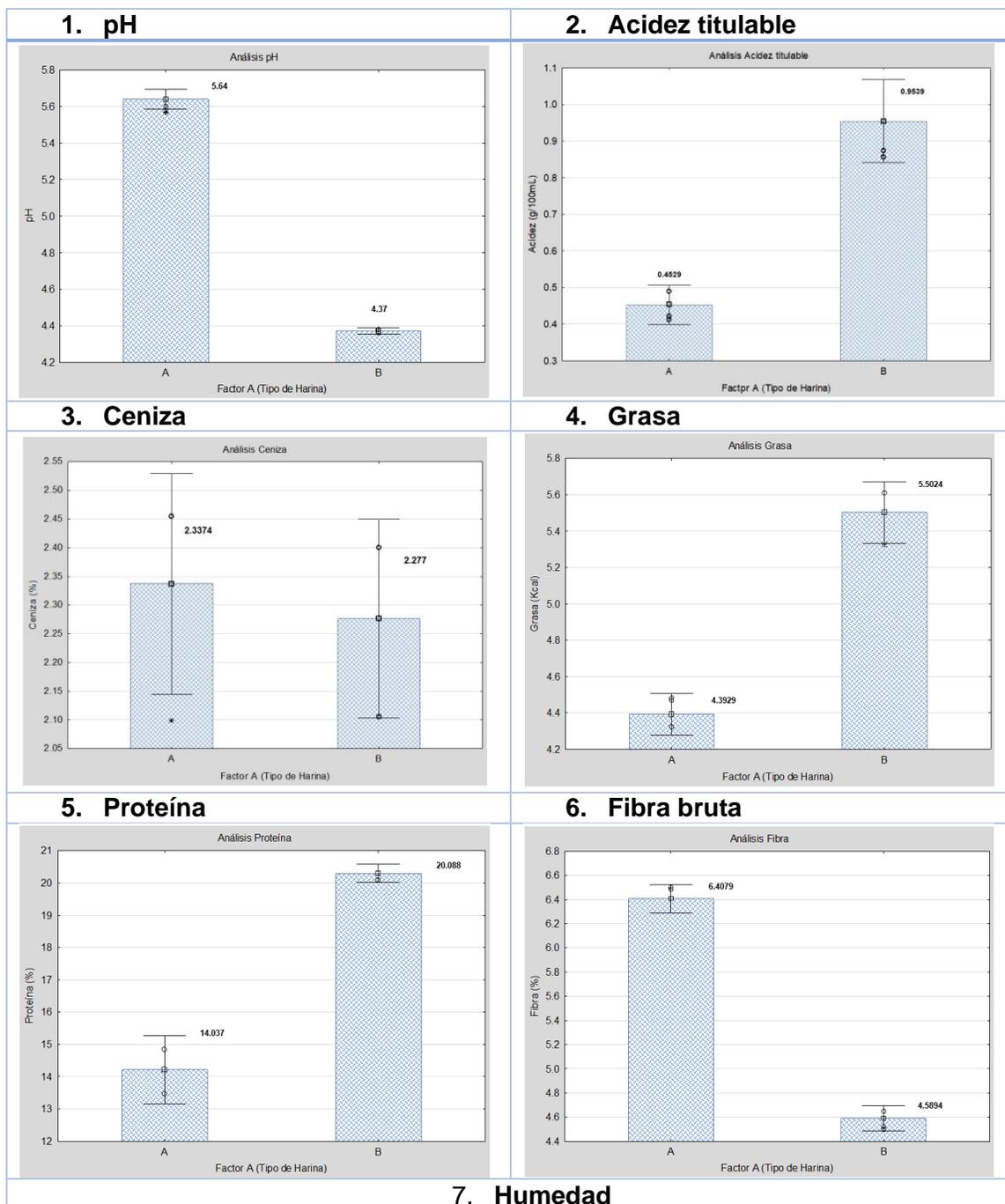
Parámetros microbiológicos

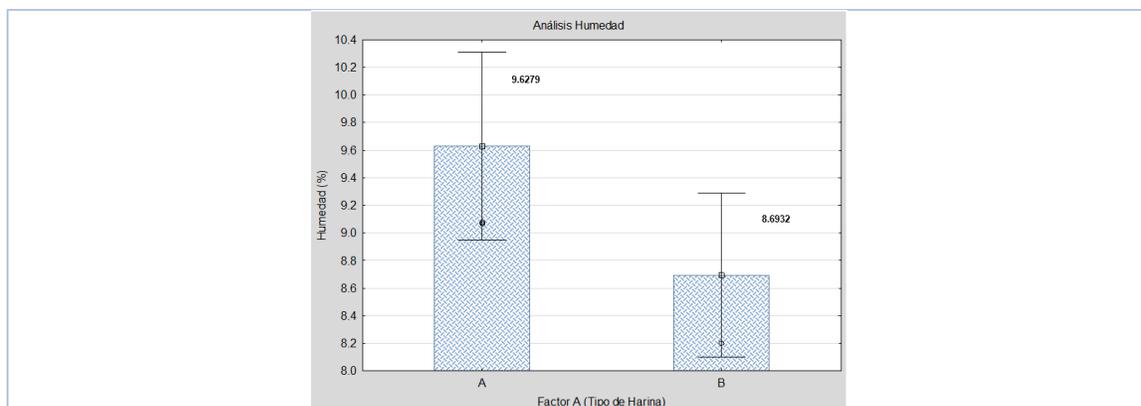
Parámetros microbiológicos	Resultados
Recuento de Aeróbios mesófilos, UFC/g	Ausencia
Recuento de Mohos y levaduras, UFC/g	Ausencia
Recuento de Enterobacteriaceae, UFC/g	Ausencia

En la tabla 27 se evidencian los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos, los mismos que se encuentran dentro de los parámetros de las NTE INEN 1529-5, NTE INEN 1529-7, NTE INEN 1529-10, indicando que el producto es inocuo y apto para el consumo humano.

Figura 3

Factor A (Tipo de harina)

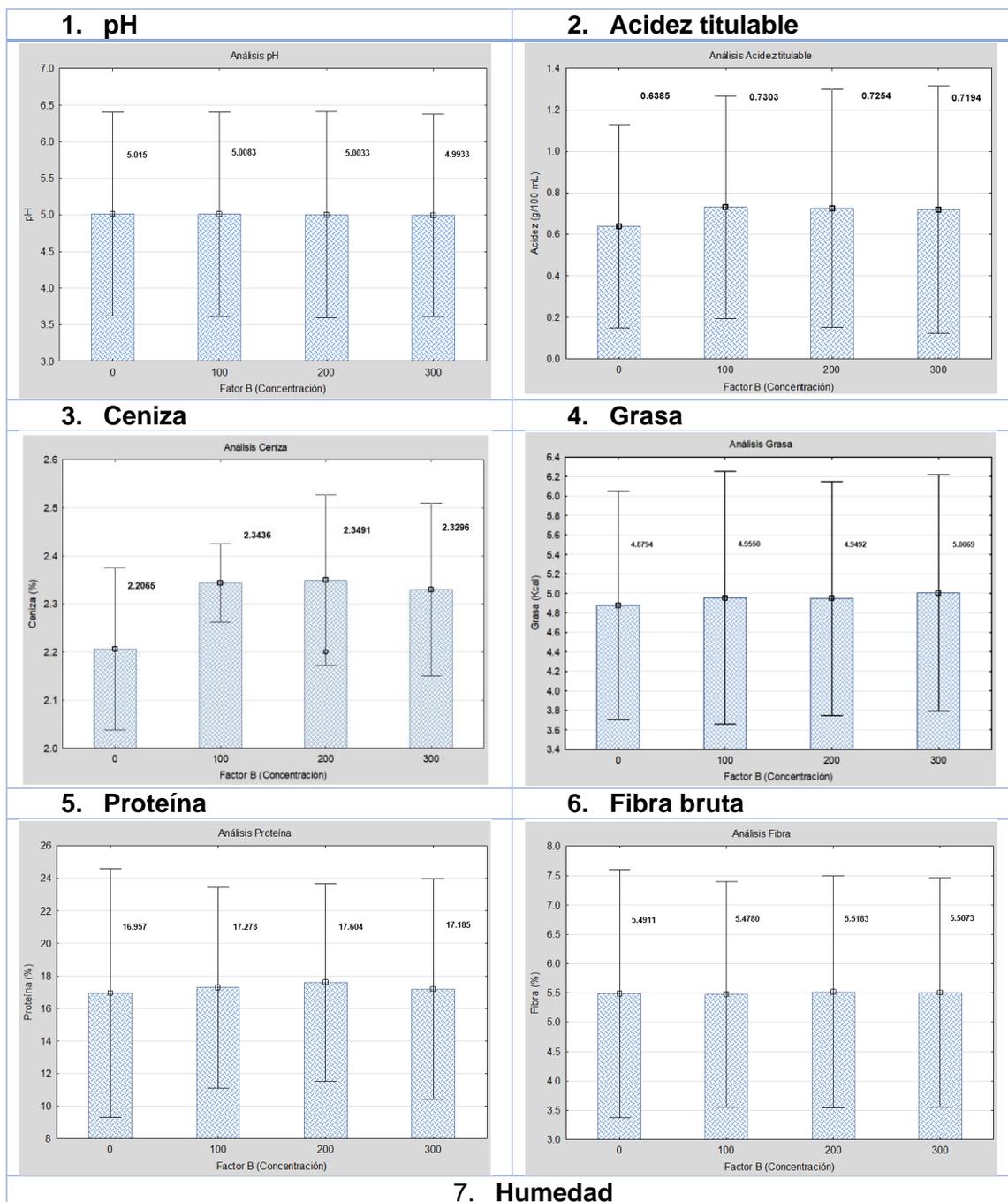


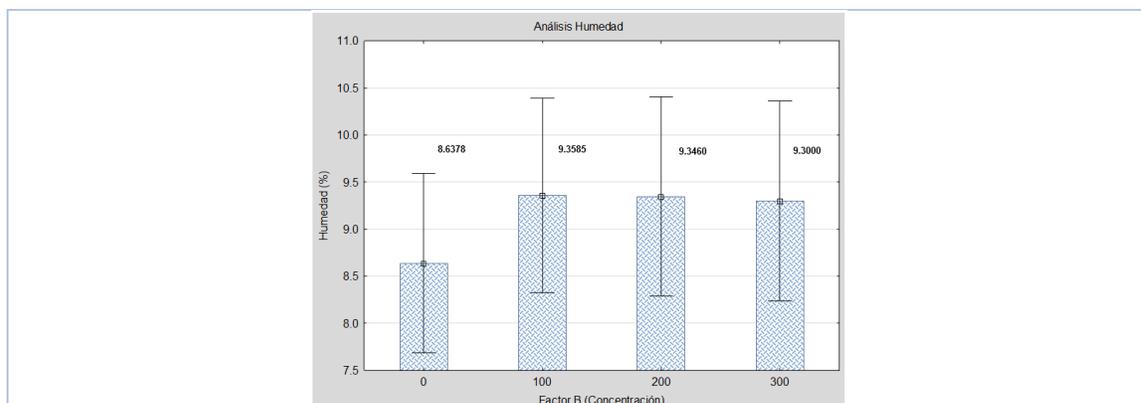


De acuerdo con la figura 3 numeral 1 variable pH, nos indica que la harina A tiene un valor de 5.64, siendo mayor al de la harina B con 4.37. Numeral 2 Acidez titulable, nos indica que la harina B posee un valor de 0.9538 (g/1000 mL), mientras que la harina A posee 0.453 (g/1000 mL). Numeral 3 Ceniza, nos indica que la harina A posee un valor de 2.34 %, mientras que la harina B posee un valor de 2.28 %. Numeral 4 análisis Grasa, el mayor valor lo posee la harina B con 5.50 %, mientras la harina A posee un valor de 4.39 %. Numeral 5 Proteína, nos indica que la harina B posee 20.08 %, mientras la harina A posee 14.04%. Numeral 6 Fibra bruta, nos indica que la harina A posee 6.41%, mientras que la harina B posee 4.59%. Numeral 7 Humedad, nos indica que la harina A posee 9.63%, mientras que la harina B posee 8.60 %.

Figura 4

Factor B (Concentración de Nisina)

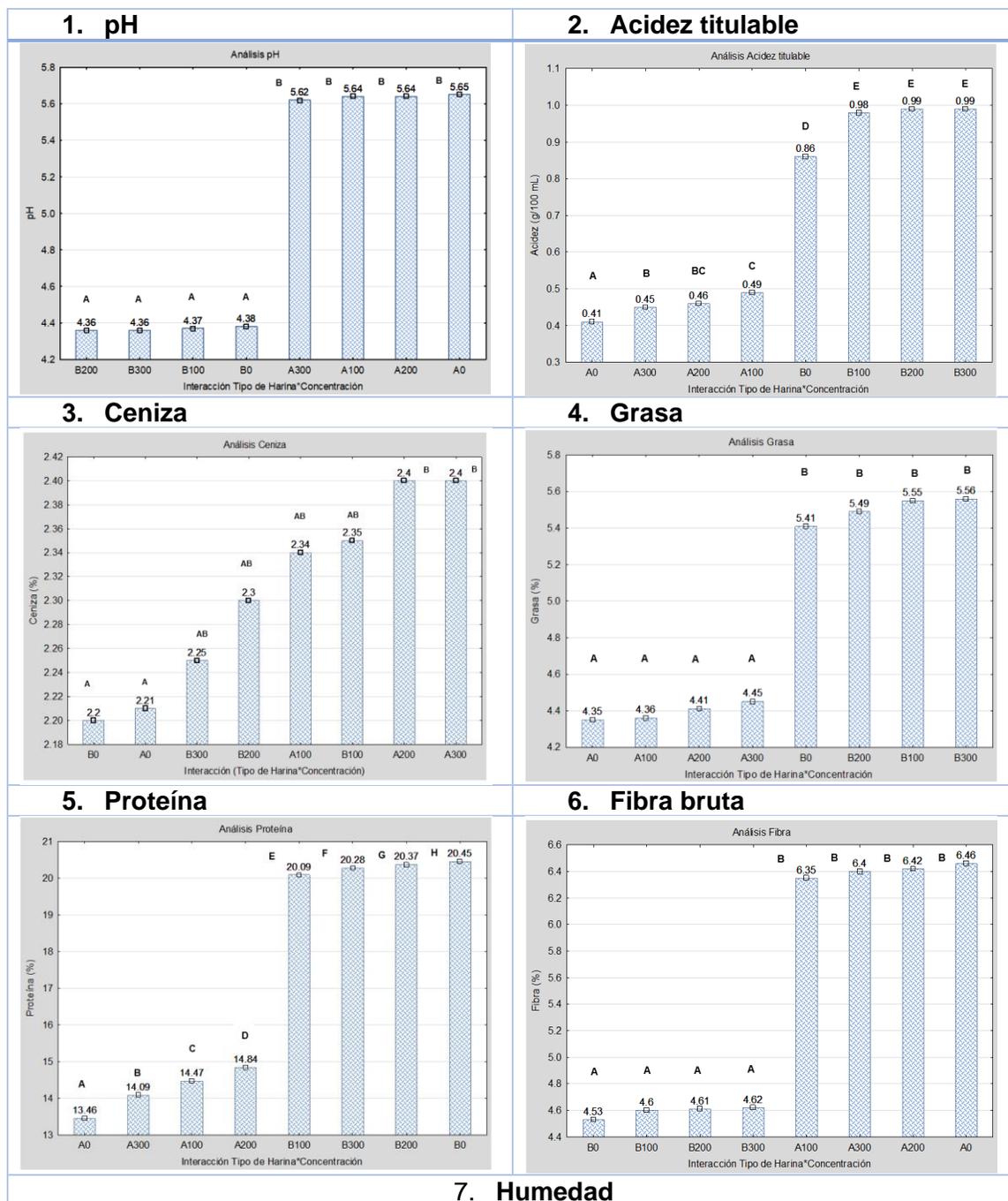


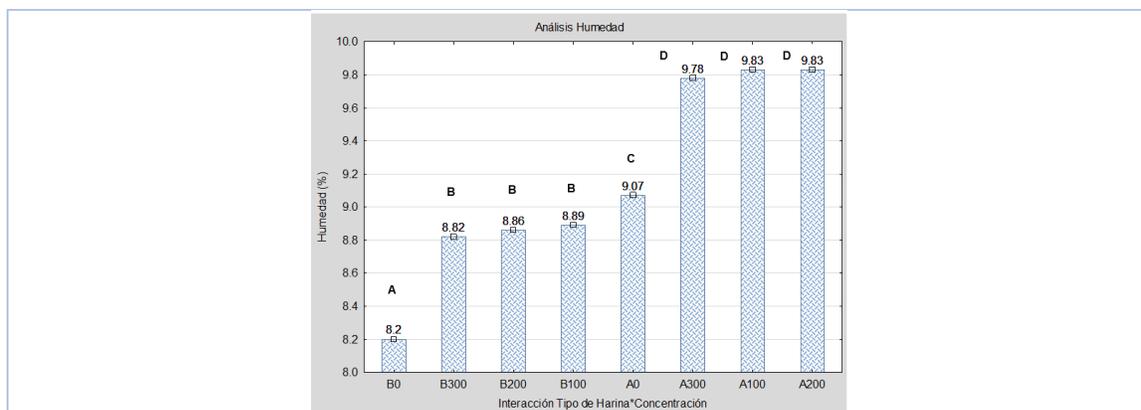


De acuerdo con la figura 4 numeral 1 variable pH, nos indica que las distintas concentraciones están un rango de 4.99 – 5.02. Numeral 2 Acidez titulable, nos indica que la concentración 0 posee un valor de 0.64 (g/1000 mL), mientras que las concentraciones 100, 200 y 300 tiene un valor 0.72 – 0.73 (g/1000 mL). Numeral 3 Ceniza, nos indica que la concentración 0 posee un valor de 2.21 %, mientras que las concentraciones 100, 200 y 300 tiene un valor 2.33 – 2.35 %. Numeral 4 análisis de Grasa, nos indica que la concentración 0 posee un valor de 4.88 Kcal, mientras que las concentraciones 100, 200 y 300 tiene un valor 4.99 – 5.01 Kcal. Numeral 5 Proteína, nos indica que la concentración 0 posee un valor de 16.96 %, mientras que las concentraciones 100, 200 y 300 tiene un valor 17.19 – 17.60 %. Numeral 6 Fibra bruta, nos indica que la concentración 0 posee un valor de 5.49 %, mientras que las concentraciones 100, 200 y 300 tiene un valor 5.48 – 5.51 %. Numeral 7 Humedad, nos indica que la concentración 0 posee un valor de 8.64 %, mientras que las concentraciones 100, 200 y 300 tiene un valor 9.30 – 9.36 %.

Figura 5

Interacción A*B (Tipo de harina * Concentración)



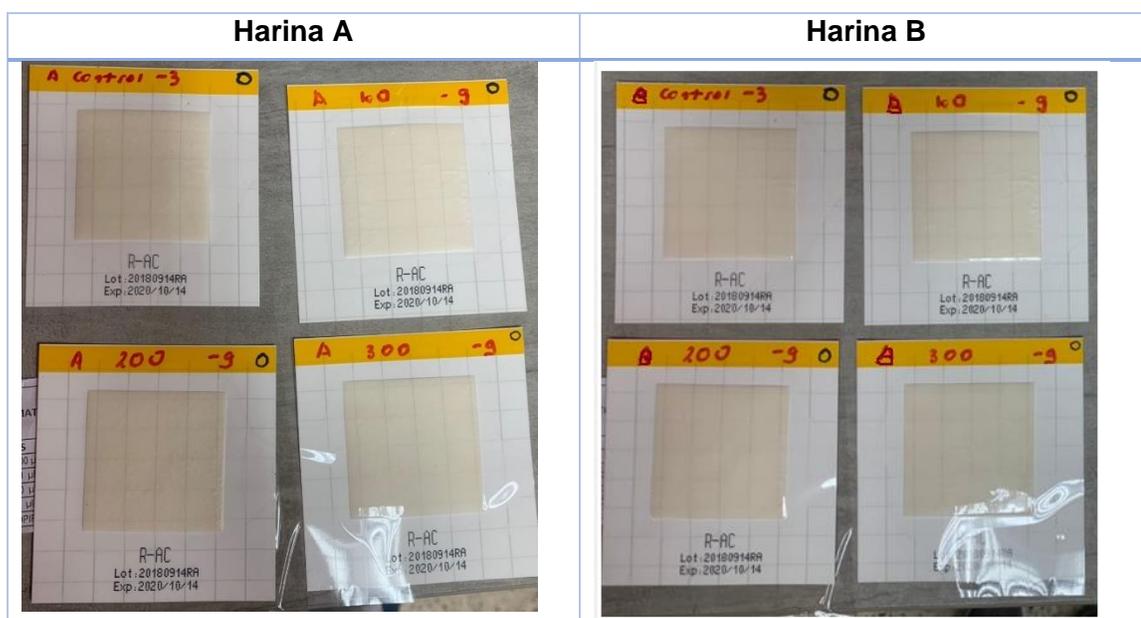


De acuerdo con la figura 5, Numeral 1 muestra diferencia significativa para la variable pH, identificando dos grupos independientes. Se encontró que B300, B200, B100, B0 (Grupo A), mientras que A300, A200, A100, A0 (Grupo B), presentando que B200 tiene menor pH (4.36) y el tratamiento A0 mayor pH (5.65). Numeral 2 muestra diferencia significativa para la variable Acidez titulable, identificando cinco grupos independientes. Se encontró que A0 (Grupo A), A300 (Grupo B), A200 (Grupo BC), A100 (Grupo C), B0 (Grupo D) y B100, B200, B300 (Grupo E), presentando que B300 tiene mayor acidez (0.99 g/100 mL) y el tratamiento A0 menor acidez (0.41 g/100 mL). Numeral 3 muestra diferencia significativa para la variable Ceniza, identificando dos grupos independientes. Se encontró que A0, B0 (Grupo A), B300, B200, B100, A100 (Grupo AB), A200, A300 (Grupo B), presentando que A300 tiene mayor acidez (2.4%) y el tratamiento B0 menor acidez (2.2%). Numeral 4 muestra diferencia significativa para la variable Grasa, identificando dos grupos independientes. Se encontró que A0, A100, A200, A300 (Grupo A), B0, B100, B200, A300 (Grupo B), presentando que B300 tiene mayor grasa (5.56 %) y el tratamiento A0 menor grasa (4.35%). Numeral 5 muestra diferencia significativa para la variable Proteína, identificando ocho grupos independientes. Se encontró que A0, (Grupo A), A300, (Grupo B), A100 (Grupo C), A200 (Grupo D), B100 (Grupo E), B300 (Grupo F), B200 (Grupo G), B0 (Grupo H) presentando que B0 tiene

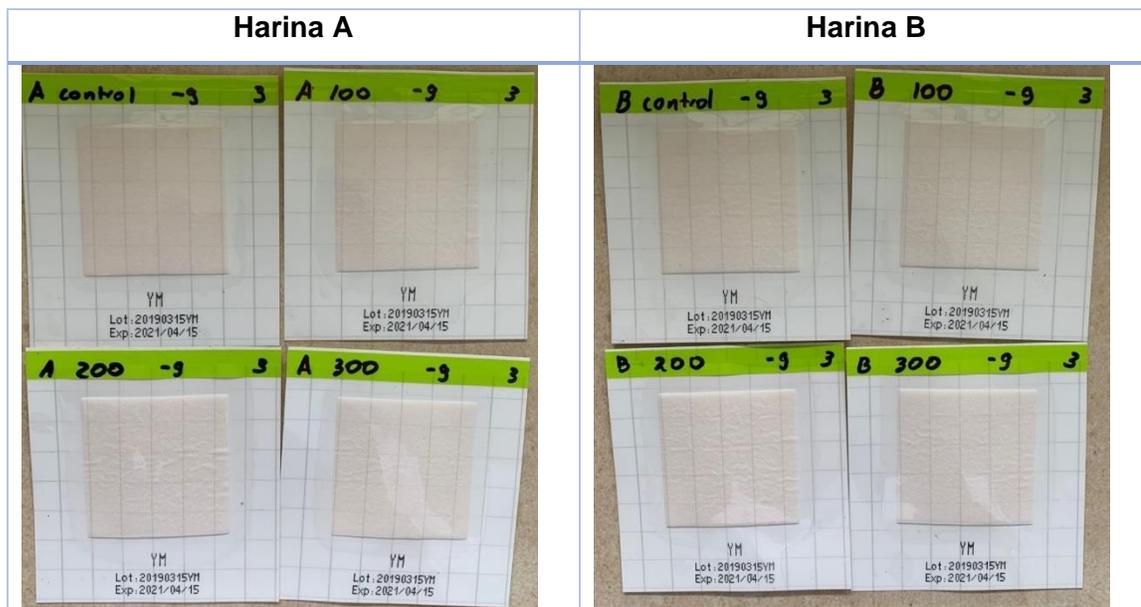
mayor proteína (20.45%) y el tratamiento A0 menor proteína (13.46%). Numeral 6 muestra diferencia significativa para la variable Fibra bruta identificando dos grupos independientes. Se encontró que B0, B100, B200, B300 (Grupo A), A0, A100, A200, A300 (Grupo B), presentando que A0 tiene mayor fibra bruta (6.46%) y el tratamiento B0 menor fibra bruta (4.53%). Numeral 7 muestra diferencia significativa para la variable Humedad, identificando cuatro grupos independientes. Se encontró que B0 (Grupo A), B300, B200, B100 (Grupo B), A0 (Grupo C), A300, A100, A200 (Grupo D), presentando que A200 y A100 tienen mayor humedad (9.83%) y el tratamiento B0 menor humedad (8.2%).

Figura 6

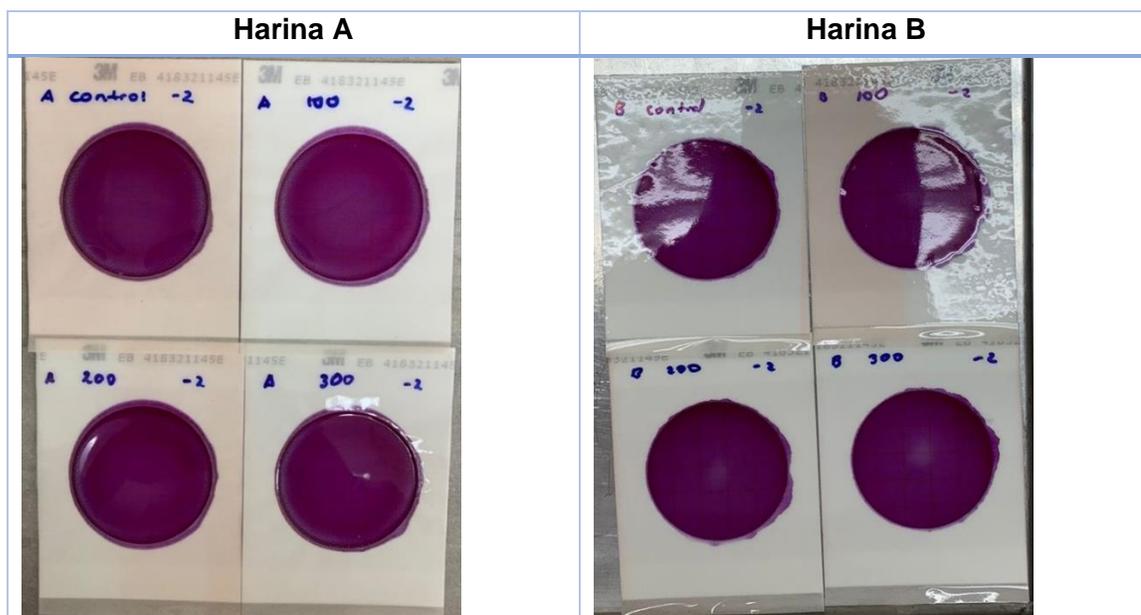
Análisis Microbiológicos de Aerobios Mesófilos



De acuerdo a la figura 6, se evidenció que no hubo crecimiento de bacterias aerobias mesófilas en ninguno de los 8 tratamientos empleados en el estudio, el tiempo de incubación de esta prueba microbiológica fue dos días, para constatar la ausencia de estos microorganismos se extendió la incubación por un periodo de 5 días, siendo el resultado el mismo.

Figura 7*Análisis Microbiológicos de Mohos y Levaduras*

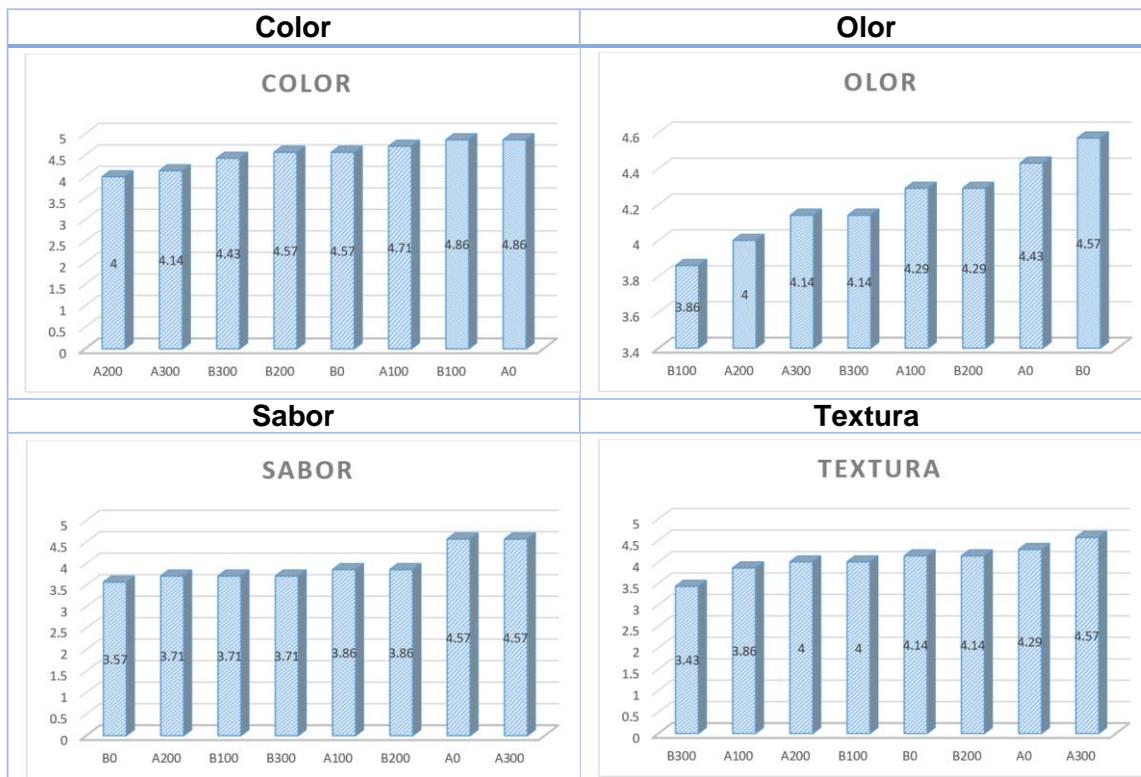
De acuerdo a la figura 7, se evidenció que no hubo crecimiento de mohos y levaduras, en ninguno de los 8 tratamientos empleados en el estudio, el tiempo de incubación de esta prueba microbiológica fue tres días, para constatar la ausencia de estos microorganismos se extendió la incubación por un periodo de 8 días, manteniendo el resultado el mismo.

Figura 8*Análisis Microbiológicos de Enterobacteriaceae*

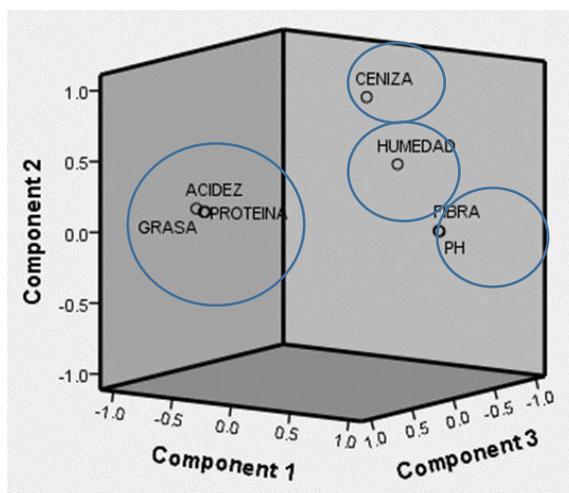
De acuerdo a la figura 8, se evidenció que no hubo crecimiento de enterobacterias, en ninguno de los 8 tratamientos empleados en el estudio, el tiempo de incubación de esta prueba microbiológica fue un día, para constatar la ausencia de estos microorganismos se extendió la incubación por un periodo de 3 días, manteniendo el resultado el mismo.

Análisis Organolépticas

Una vez obtenidos los resultados de la catación y aplicado el diseño estadístico se procedió a realizar un promedio para determinar cual fue el mejor tratamiento aceptado por los catadores basado en los cuatro parámetros evaluados. Obteniendo que el mejor tratamiento para el parámetro color fue A0 (Harina tostada + sin conservante), parámetro olor fue B0 (Harina sin tostar + sin conservante), parámetro sabor fueron A300 (Harina tostada + 300 ppm) y A0 (Harina tostada + sin conservante), y finalmente para el parámetro textura fue A300 (Harina tostada + 300 ppm) como se puede observar en la figura 9 .

Figura 9*Análisis organolépticas*

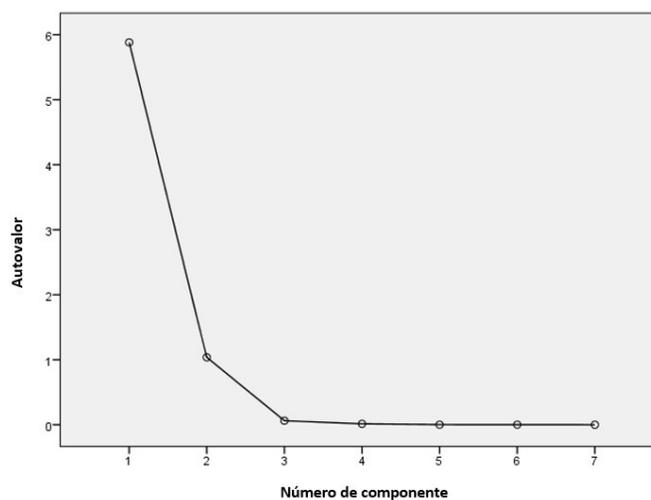
Resultados de análisis de conglomerados en harina proveniente de bagazo de cerveza

Figura 10*Gráfico del análisis de componentes principales en harina*

La figura 10 muestra la conformación de los componentes, siendo el primer componente conformado por las variables acidez, proteína y grasa. El segundo componente está constituido por las variables fibra y pH. El tercer componente esta constituido por humedad y el cuarto componente por la variable ceniza.

Figura 11

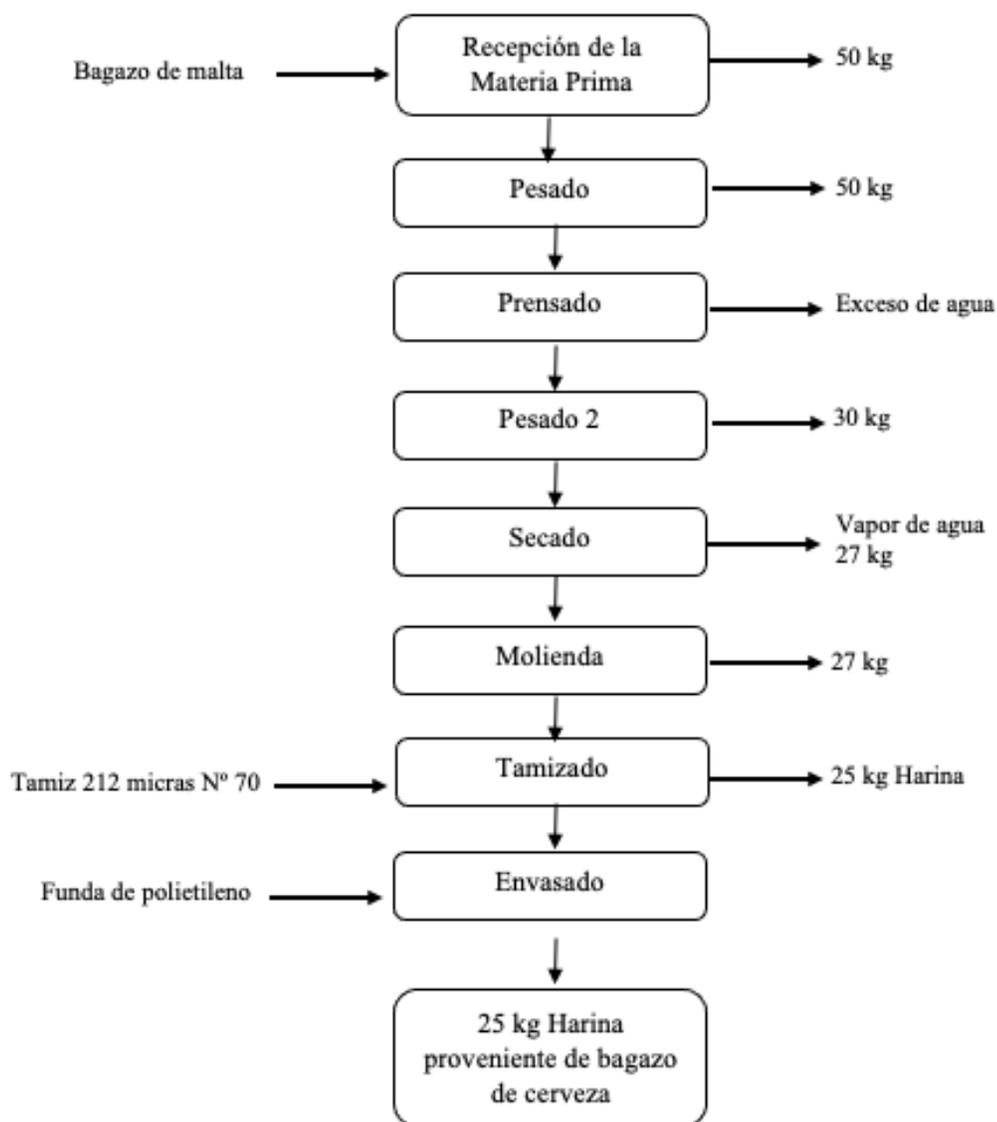
Sedimentación de componentes principales en harina



En la figura 11, se visualizó dos componentes principales que presentan mayor porcentaje de explicación de la varianza, las cuales corresponden a las variables pH y acidez, mientras que a partir de la tercera variable se observa autovalores menores a 1 que no se consideran relevantes en la investigación.

Balance de materia

Se realizó el balance de materia para la harina de bagazo de cerveza para establecer la cantidad de producto obtenido de su procesamiento.



Rendimiento

Se realizó los cálculos respectivos para obtener el rendimiento de la harina proveniente de diferentes bagazos de cerveza, donde se determinó un rendimiento del 50%, en ambas variedades de bagazo.

$$R\% = \frac{\textit{peso final}}{\textit{peso inicial}} * 100$$

$$R\% = \frac{25}{50} * 100$$

$$R\% = 50\%$$

Se determinó que existe una relación 2:1, es decir, por cada 2 kg de bagazo húmedo se obtiene 1 kg de harina, el mismo porcentaje de rendimiento se evidenció en ambos tipos de bagazo (cebada tostada y cebada sin tostar).

Capítulo V

Discusión

Pruebas fisicoquímicas a la harina proveniente de bagazo de cerveza

PH

El pH de las dos tipos de harina es ácido, siendo los valores Harina A 5.65 y Harina B 4.38, sin embargo las distintas concentraciones de nisina empleadas en el estudio no modifica de forma significativa este parámetro, como lo indica la tabla 20. Actualmente no se ha establecido el rango óptimo de pH que debe tener el bagazo de cerveza para ser empleado como materia prima de nuevos productos como es el caso de la harina a partir de este residuo industrial.

Acidez

En acidez titulable se obtuvo para la harina A 0.4529 (g/100 mL) y para la harina B 0.9539 (g/mL), las diferentes concentraciones de nisina mantienen el valor de acidez titulable, como lo indica la tabla 21, este análisis es de suma importancia porque nos ayuda a determinar si existe o no proliferación de bacterias, microorganismos y hongos en los alimentos, además permite determinar la presencia de algunos ácidos minerales, ácidos orgánicos, sales de ácidos fuertes y bases débiles (Asociación Iberoamericana de tecnología Poscosecha SC, 2018). En la actualidad no se ha establecido un rango óptimo de acidez titulable que debe tener el bagazo de cerveza para emplearlo como materia prima.

Ceniza

Según las normas Argentinas (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2019), el porcentaje de ceniza que debe tener el bagazo de cerveza es de 2.5 a 4.5%, esto indica el porcentaje de materia inorgánica presente, los valores obtenidos fueron Harina A 2.3% y Harina B 2.2%, ambos valores están por debajo del rango, pero según (North Dakota

State University, 2020) no afecta a la calidad de las harinas, que el valor de ceniza sea menor a lo establecido. En otros estudios realizados en Ecuador se reportó un valor de 2% de ceniza según (Pantoja, 2020). Sin embargo se evidenció un incremento de la ceniza al añadir la nisina, en el caso de la Harina A (200 y 300 ppm) se obtuvo un valor de 2.4% y en la Harina B (100 ppm) un valor de 2.35%, este incremento no afecta las propiedades del producto final.

Grasa

El bagazo de cerveza debe tener un valor promedio de grasa o lípidos entre 3.9 y 18% según las normas de Argentina (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2019), en nuestra investigación se obtuvo para Harina A 4.35% y Harina B 5.41%, por ende ambos valores se encuentran dentro del rango establecido, y de igual manera al evaluar con las distintas concentraciones de nisina se evidenció una variación significativa del porcentaje de grasa, esto se debe aún aumento de humedad al momento de añadirle la nisina al producto por aspersion, según (North Dakota State University, 2020) esto se debe ha que las enzimas degradarán los lípidos nativos del bagazo y producirán ácidos grasos libres.

Proteína

Según las normas Argentinas (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2019) el bagazo de cerveza debe tener un valor de 17-19% de proteína, en esta investigación se empleó distintas concentraciones de nisina en diferentes tipos de harinas, permitió observar que la harina A contiene un porcentaje de proteína en un rango entre 13 – 14%, mientras que en la harina B el valor es de 20%, según (Ferrari & Tittone, 2017) sostiene que el bagazo cervecero originalmente contiene el 7.34% de proteína, pero al perder otros elementos durante el macerado del mosto de la cerveza, ayuda a aumentar marcadamente la concentración de proteína.

Fibra

El porcentaje promedio de fibra en bagazo de cerveza es 7-8 % según las normas Argentinas (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2019), en nuestra investigación se obtuvo dos resultados correspondientes a la harina A con 6.46% y la harina B con 4.53%, ambos valores se encuentran fuera del rango, sin embargo la harina A tiene el valor más próximo, estos valores se mantienen con las diferentes concentraciones de nisina, según lo indicado en la investigación de (Agudelo et al., 2015) la aplicación de nisina mediante el método de adición de bacteriocinas purificadas o semipurificadas no altera las características fisicoquímica en el producto y esto se lo puede corroborar en la figura 5, donde se observa una variación no significativa de fibra con respecto a las distintas concentraciones de nisina utilizada en la investigación.

Humedad

El valor máximo de humedad que debe tener el bagazo es de 12% según las Normas Argentinas (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2019), para evitar su descomposición, debido a que si excede el porcentaje el bagazo sería susceptible a degradación por parte de microorganismos. Los valores de humedad obtenidos en la investigación fueron Harina A de 9.07% y Harina B 8.20%, siendo ambos valores menores al porcentaje máximo, esto nos indica la baja vulnerabilidad de las harinas frente a los microorganismos, y fue comprobado mediante un análisis microbiológico como se observa en la figura 7, donde hubo ausencia de mohos y levaduras.

Pruebas microbiológicas

En la presente investigación se determinó la ausencia de microorganismos como son: aerobios mesófilos, mohos y levaduras y enterobacterias, esto nos permite conocer y monitorear la calidad sanitaria del producto, condiciones higiénicas durante la obtención de materia prima, producción de la harina y almacenamiento del producto, y la prevención de humedad que esto nos llevaría alargar la vida útil del producto final (Superintendencia de Control de Poder de Mercadeo, 2017).

La ausencia de microorganismos nos aseguraría un buen impacto sensorial en los panelistas en cuanto a los parámetros color, olor, sabor y textura que hacen a un producto aceptado o rechazado como se observa en la figura 7 (Superintendencia de Control de Poder de Mercadeo, 2017).

Capítulo VI

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones.

Factor A (Tipo de harina)

De acuerdo a los parámetros evaluados tanto fisicoquímicos como microbiológicos, se concluye que la Harina A (tostada), proporcionó mejores resultados por lo cual se acepta la hipótesis alternativa, donde indica que el tipo de harina si influye en la conservación mediante la aplicación de nisina.

Factor B (Concentración de nisina)

De acuerdo a los parámetros con mayor incidencia en la conservación de la harina, se determinó que las mejores concentraciones son 100 y 300 ppm, por lo cual se acepta la hipótesis alternativa del estudio, la misma que indica que la concentración de nisina si influye en la conservación de la harina.

Interacción A*B

Se concluye que los mejores tratamientos fueron: Harina A (tostada) + 300 ppm y Harina B (sin tostar) +100 ppm, esto basado en los parámetros pH y acidez ya que son los factores que afectan la conservación en su almacenamiento.

Se concluye además que los diferentes tratamientos evaluados fueron aceptados por los panelistas al realizar un análisis sensorial, tomando en cuenta que la aplicación de la nisina no influye en los parámetros analizados (color, olor, sabor y textura).

Recomendaciones.

Respecto a la aplicación de nisina como bioconservante, se recomienda las concentraciones de 300 ppm para harinas provenientes de bagazo de cebada tostada y la concentración de 100 ppm para harina proveniente de bagazo de cebada sin tostar, esto basado en los diferentes análisis microbiológicos que determinaron la acción inhibitoria de la nisina frente a microorganismos que deterioren y afecten la calidad del producto final.

Referente al empleo de bagazos de cerveza como materia prima, se recomienda el empleo de este residuo industrial por su excelente composición nutricional y fisicoquímica, para la elaboración de nuevos productos alimenticios, además de reducir el impacto ambiental de las industrias alimentarias.

En lo que concierne a los resultados obtenidos en la investigación, se evidenció un gran potencial del bagazo de cerveza como materia prima de productos alimenticios, así como una excelente acción inhibitoria de la nisina como bioconservante de un producto sólido homogéneo, es por ello que se recomienda en futuras investigaciones utilizar bagazos provenientes de otros estilos de cerveza como las denominadas rojas y negras, con la finalidad de estandarizar la concentración óptima de nisina dependiendo del bagazo, para una mejor bioconservación del producto final.

Capítulo VII

Bibliografía

Agudelo, N., Torres, M., Alvarez, C., & Vélez, L. (2015). Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Ácido Lácticas Y Su Aplicación En La Industria De Alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36), 63–72.

<http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/356>

Asociación Iberoamerica de tecnología Poscosecha SC. (2018). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha Vol.19 Nº2 by Horticultura & Poscosecha - Issuu* (2nd ed.). RedAlyc.

https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/vol.19_n.2_revista_iberoamericana_t

Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. de M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. In *Food Control* (Vol. 32, Issue 1, pp. 134–142).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Food microbiology: Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777–788.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>

de Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., & Vessoni Penna, T. C. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 20, Issues 3–4, pp. 146–154).

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.056>

Diez Aldama, L. (2012). *Efecto de agentes enológicos y pediocina PA-1 sobre las*

bacterias lácticas del vino. 292.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=25831&info=resumen&idioma=SPA>

Ferrari, J., & Tittone, P. (2017). Reutilización de Bagazo de Cebada Cervecera Por Secado Y Pelletización Como Suplemento Forrajero. *Presencia*, 43–46.

<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35066.95688>

Ghanbari, M., Jami, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2013). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. *Food Control*, 32(2), 379–385.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.024>

Gupta, M., Abu-Ghannam, N., & Gallagher, E. (2010). Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9(3), 318–328.

<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x>

Hammami, R., Zouhir, A., Ben Hamida, J., & Fliss, I. (2007). BACTIBASE: A new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*, 7.

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-89>

Imanol Leiva, C., Nahir Moreno, N., Vitantonio, L., Natalia López, D., Galante, M., Soledad Forastieri, P., Laura Pedrido, M., Spelzini, D., David Giordano, E. V., & Boeris, V. (2021). *Evaluation of the brewers' spent grain incorporation in vegan sausages* (Vol. 17).

INEN, I. E. de N. (1980). Harina de origen vegetal. Determinación de grasa. *Norma Técnica Ecuatoriana*.

INEN, I. E. de N. (2013a). *NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 520 : 2013*

Primera revisión HARINAS DE ORIGEN VEGETAL. DETERMINACIÓN DE LA CENIZA.

INEN, I. E. de N. (2013b). *NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 526:2013 Primera revisión HARINAS DE ORIGEN VEGETAL. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IÓN HIDRÓGENO o pH Primera edición VEGETAL FLOUR. DETERMINATION OF CONCENTRATION OF HYDROGEN ION ON pH.*

Kanauchi, O., Mitsuyama, K., & Araki, Y. (2018). Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59(2), 59–62.
<https://doi.org/10.1094/asbcj-59-0059>

Kirin Beer University. (2016). *Kirin Beer University informa sobre la producción mundial de cerveza por país en 2018 | 2019 | Comunicados de prensa | Kirin Holdings.*
https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2016/0810_01.html

Martinez, J. (2020). *Área de consolidación Gestión de la Producción de Agroalimentos Producción de Harina de Bagazo a partir de un residuo de la industria cervecera.*

Merck kGaA. (2022). *Nisina from Lactococcus lactis.*
https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/search/1414-45-5?focus=products&gclid=Cj0KCQiArt6PBhCoARIsAMF5waiSfDsrs_qq9jCCR8luyYPfy3QWusdABMchenCelw6GONE5098bBdAaAqpIEALw_wcB&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=1414-45-5&type=cas_number

Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. (2019). Bagazo de cerveza: un subproducto con múltiples aplicaciones. *Bach*, 17–19.
[https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/17114/Producción de Harina de bagazo a partir de un residuo de la industria](https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/17114/Producción%20de%20Harina%20de%20bagazo%20a%20partir%20de%20un%20residuo%20de%20la%20industria)

cervecera.pdf?sequence=1&isAllowed=y

North Dakota State University. (2020). *Análisis de harina - Investigación de carbohidratos y calidad de trigo de NDSU.*

<https://www.ndsu.edu/faculty/simsek/wheat/flour.html>

Pantoja, G. (2020). *UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE "DETERMINACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO DE LA MEZCLA DE HARINA DE BAGAZO DE CEBADA DE MALTA CON HARINA DE TRIGO PARA LA APLICACIÓN EN Tesis presentada como requisito para la obtención del título de ingeniero agroindustrial.*

Paula, B., Santos, ;, Victoria, M., & Noemí, Z. (2019). Extracción de ácido ferulico a partir de subproductos de la industria cervecera: bagazo de cerveza. In *V Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería. Facultad de Ingeniería UNLP.* <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/75651>

Robertson, J. A., l'Anson, K. J. A., Treimo, J., Faulds, C. B., Brocklehurst, T. F., Eijsink, V. G. H., & Waldron, K. W. (2010). Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 890–896. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.019>

Rodriguez, C. (2012). Producción de biogás a partir del bagazo cervecero. *Memoria de Título Universidad de Chile*, 1–35. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/114955>

Superintendencia de Control de Poder de Mercadeo. (2017). *Versión Pública Tema : Informe Especial “ Sector Cerveza Artesanal ” Fecha de elaboración : Mayo 2017 Dirección Nacional de Estudios de Mercado Intendencia de Abogacía de la Competencia.*

Vásquez M., S. M., Suárez M., H., & Zapata B., S. (2009). Use of antimicrobial

substances produced by acid lactic bacterias on meat conservation. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64–71. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182009000100007>