



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TESIS

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DEL RESIDUO LÍQUIDO DE LA FERMENTACIÓN
DE CERVEZA PARA DETERMINAR B-GLUCANOS**

**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIA Y
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

PRESENTADO POR:

Br. PABLO ALBERTO MENDOZA INTUSCA

ASESOR:

Dr. BALTAZAR NICOLÁS CÁCERES HUAMBO

ORCI: 0009-0005-4702-5605

CO_ASESOR:

Mgt. CIRO TOMAYLLA CRUZ

ORCI: 0000-0001-6921-1250

CUSCO – PERÚ

2025

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada:

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL RESIDUO LÍQUIDO
DE LA FERMENTACIÓN DE CERVEZA PARA DETERMINAR B-GLUCANOS**

Presentado por: **Pablo Alberto Mendoza Intusca** DNI N° **43192801**

presentado por: DNI N°:

Para optar el título profesional/grado académico de
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por**2**... veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de**3**.....%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley	

Por tanto, en mi condición de **asesor**, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** las primeras páginas del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, **08** de **Agosto** de 20**25**

Firma

Post firma **B. Nicolás Caceres Huamán**

Nro. de DNI **23879771**

ORCID del Asesor **0009-0005-4702-5605**

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: **trn:oid::27259:479692241**

Pablo Mendoza

EVALUACION DE RENDIMEINTO DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DEL RESIDUO LFC EN LA OBTENCION DE -GL...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:479692241

Fecha de entrega

8 ago 2025, 9:49 a.m. GMT-5

Fecha de descarga

8 ago 2025, 9:54 a.m. GMT-5

Nombre de archivo

EVALUACION DE RENDIMEINTO DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DEL RESIDUO LFC EN LA OBTENCI....pdf

Tamaño de archivo

4.8 MB

139 Páginas

28.041 Palabras

158.398 Caracteres

3% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Exclusiones

- N.º de fuente excluida

Fuentes principales

- 2%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 2%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
95 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO ESCUELA DE POSGRADO

INFORME DE LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES A TESIS

Dra. NELLY AYDE CAVERO TORRE, Directora (e) General de la Escuela de Posgrado, nos dirigimos a usted en condición de integrantes del jurado evaluador de la tesis intitulada **EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL RESIDUO LÍQUIDO DE LA FERMENTACIÓN DE CERVEZA PARA DETERMINAR B-GLUCANOS** del Br. PABLO ALBERTO MENDOZA INTUSCA. Hacemos de su conocimiento que el (la) sustentante ha cumplido con el levantamiento de las observaciones realizadas por el Jurado el día TREINTA Y UNO DE JULIO DE 2025.

Es todo cuanto informamos a usted fin de que se prosiga con los trámites para el otorgamiento del grado académico de MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Cusco, _____



Firmado digitalmente por:
MASCO ARRIOLA Mery Luz
FAU 20527780314 soft
Motivo: Soy el autor del
documento
Fecha: 05/08/2025 18:08:00-0500

DRA. MERY LUZ MASCO ARRIOLA
Primer Replicante

MTRO. FIDEL GAMARRA SOTO
Segundo Replicante

DR. LEONCIO SOLIS QUISPE
Primer Dictaminante

MGT. RODNEY VEGA VIZCARRA
Segundo Dictaminante

Dedicatoria

A mis hijos
Hefziba Kiara y
Pablo Hared, a mi
esposa Yanet y a
mis padres
quienes son mis
motores para
seguir adelante...

Agradecimiento

Agradezco profundamente a mi asesor, Dr. Baltazar Nicolás Cáceres Huambo, por su invaluable guía, paciencia y apoyo a lo largo de este proceso de investigación. Su conocimiento y orientación fueron fundamentales para la culminación de este trabajo.

Asimismo, expreso mi sincero reconocimiento al Mgt. Ciro Tomaylla Cruz y a la Ing. Yanet Auccahuaqui Torres, quienes con su experiencia y consejos enriquecieron este estudio, brindándome su tiempo y conocimientos para fortalecer cada etapa del desarrollo de la investigación.

Extiendo mi más profundo agradecimiento a mi familia, cuyo amor, comprensión y respaldo incondicional fueron mi mayor motivación en este camino. A mis colegas, por su compañerismo, apoyo y palabras de aliento, que hicieron de este proceso un aprendizaje compartido.

A todos ustedes, mi gratitud infinita por ser parte de este logro.

Presentación

Señor director de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

Señores miembros del jurado:

En conformidad del cumplimiento del reglamento de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, presento a ustedes la investigación intitulada: **EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL RESIDUO LÍQUIDO DE LA FERMENTACIÓN DE CERVEZA PARA DETERMINAR B-GLUCANOS**, con la finalidad de optar al grado académico de maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Esta investigación se desarrolló en el ámbito de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos, orientada a la valorización biotecnológica de la levadura gastada generada por la Cervecería Backus y Johnston SAA – Planta Cusco. Este subproducto, rico en β -glucanos y proteínas, ha cobrado interés en los últimos años por su potencial como materia prima funcional. El estudio busca rentabilizar su aprovechamiento mediante hidrólisis enzimática, evaluando variables clave del proceso. La propuesta responde a la necesidad de transformar residuos agroindustriales en productos de valor, alineándose con principios de sostenibilidad. Además, contribuye a mitigar el impacto ambiental asociado a su disposición inadecuada en la región, enmarcándose en los principios de la economía circular.

El autor

INDICE GENERAL

PRESENTACIÓN	IV
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
GENERALIDADES	1
INTRODUCCIÓN	1
I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 SITUACIÓN PROBLEMÁTICA	3
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	7
1.2.1 <i>Problema general</i>	7
1.2.2 <i>Problemas específicos</i>	7
1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	7
1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	9
1.4.1 <i>Objetivo general</i>	9
1.4.2 <i>Objetivos específicos</i>	9
II FUNDAMENTOS TEÓRICOS	10
2.1 BASES TEÓRICAS	10
2.1.1 <i>La cerveza.</i>	10
2.1.2 <i>Análisis del consumo de cerveza</i>	10
2.1.3 <i>La industria cervecera</i>	11
2.1.4 <i>La fabricación de la cerveza</i>	12
2.1.5 <i>Residuos generados en la industria alimentaria</i>	14
2.1.6 <i>Residuos cerveceros</i>	15
2.1.7 <i>Levadura viva vs. levadura gastada como residuo</i>	16
2.1.8 <i>Levadura cervecera gastada</i>	16
2.1.9 <i>Economía circular</i>	18
2.1.10 <i>β-glucanos</i>	20
2.1.11 <i>Contenido de β-glucanos en la levadura de cerveza</i>	24

2.1.12	<i>Métodos de extracción de β-glucanos</i>	26
2.1.13	<i>Hidrólisis enzimática</i>	28
2.1.14	<i>Naturaleza química de las enzimas</i>	31
2.1.15	<i>Hidrólisis enzimática de β-glucanos</i>	33
2.1.16	<i>Factores que afectan la actividad enzimática</i>	34
2.1.17	<i>Estabilidad térmica de los β-glucanos</i>	36
2.1.18	<i>Corolase® 8000</i>	37
2.1.19	<i>Determinación de β-glucanos según métodos oficiales de análisis</i>	38
2.1.20	<i>Escalonamiento de procesos: laboratorio, piloto e industrial</i>	40
2.2	MARCO CONCEPTUAL	41
2.2.1	<i>Economía circular</i>	41
2.2.2	<i>Cerveza</i>	41
2.2.3	<i>Industria cervecera</i>	41
2.2.4	<i>Residuos</i>	41
2.2.5	<i>Residuos líquido en la producción de la cerveza</i>	42
2.2.6	<i>Levadura gastada</i>	42
2.2.7	<i>Enzimas</i>	42
2.2.8	<i>Proteasas</i>	42
2.2.9	<i>Hidrólisis enzimática</i>	43
2.2.10	<i>Espectrofotómetro</i>	43
2.3	ANTECEDENTES	43
III	HIPÓTESIS Y VARIABLES	48
3.1	HIPÓTESIS	48
3.1.1	<i>Hipótesis general</i>	48
3.1.2	<i>Hipótesis específicas</i>	48
3.2	IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES	48
3.2.1	<i>Variables independientes (VI)</i>	48
3.2.2	<i>Variables dependientes (VD):</i>	49
3.3	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	49

IV	MATERIALES Y MÉTODOS	50
4.1	UBICACIÓN Y GEOGRÁFICA.....	50
4.2	ÁMBITO DE ESTUDIO.....	50
4.3	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	50
4.4	POBLACIÓN DE ESTUDIO	51
4.5	UNIDAD DE ANÁLISIS	51
4.6	DISEÑO EXPERIMENTAL	52
4.7	TIPO DE MUESTREO.....	53
4.8	CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS PROXIMAL DEL RESIDUO <i>LFC</i>	56
4.9	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE RESIDUO <i>LFC</i>	58
	4.9.1 Preparación de los reactivos.....	60
	4.9.2 Determinación de β -glucanos del residuo <i>LFC</i> hidrolizado	62
4.10	TÉCNICAS DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS.....	67
4.11	TÉCNICAS PARA LA COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS	68
V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
5.1	CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO LÍQUIDO DE LA FERMENTACIÓN DE CERVEZA.	70
5.2	ANÁLISIS PROXIMAL DEL RESIDUO <i>LFC</i>	71
5.3	DATOS DE LA DETERMINACIÓN DE B-GLUCANOS	74
5.4	DETERMINACIÓN DE B GLUCANOS	75
5.4	ANÁLISIS DE CAJAS EN LOS TRATAMIENTOS DE LA OBTENCIÓN DE B GLUCANOS	78
5.5	ANÁLISIS DE PARÁMETROS PRINCIPALES EN LA OBTENCIÓN DE B GLUCANOS.....	80
5.6	ANÁLISIS DE INTERACCIONES DE VARIABLES PARA LA DETERMINACIÓN DE B-GLUCANOS ..	82
5.7	ANÁLISIS DE PARETO DE EFECTOS PRINCIPALES EN LA DETERMINACIÓN DE B GLUCANOS...	84
5.8	ANÁLISIS DE RESIDUOS PARA LA DETERMINACIÓN DE B GLUCANOS	87
5.9	RENDIMIENTO DE LA DETERMINACIÓN DE B-GLUCANOS.....	88
5.10	CONFIRMACIÓN DE LA HIPÓTESIS EXPERIMENTAL	90
	CONCLUSIONES.....	92
VI	REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍAS	94
VII	APÉNDICE	102

APÉNDICE A: MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	102
APÉNDICE A1: MATRIZ DE CONSISTENCIA	102
APÉNDICE A2: PAQUETE DE CÁLCULO EN EXCEL	103
APÉNDICE A3: FICHA TÉCNICA DE ENZIMA COLORASE 8000	104
APÉNDICE A4: MANUAL DE KIT DE DETERMINACION DE B GLUCANOS	105
APÉNDICE B: INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	115
APÉNDICE B1: ANÁLISIS PROXIMAL DEL RESIDUO LFC (LEVADURA GASTADA)	115
APÉNDICE B2: DATOS COMPLETOS OBTENIDOS POR SOFTWARE DE MAGAZINE POR ESPECTROFOTOMETRÍA.	118
APÉNDICE B3: CONCENTRACIÓN DE B-GLUCANOS POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	120
APÉNDICE B4: PRUEBA DE TUKEY Y ANÁLISIS CONFIANZA DE 95%	121
APÉNDICE B5: ANÁLISIS DE VARIANZA GENERAL	122
APÉNDICE B6: ANÁLISIS DE VARIANZA DE COEFICIENTES CODIFICADOS	122
APÉNDICE B7: COEFICIENTES CODIFICADOS	122
APÉNDICE C: PANEL FOTOGRÁFICO DE LA INVESTIGACIÓN	123

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición aproximada de <i>saccharomyces cerevisiae</i>	17
Tabla 2. Composición de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Tabla 3. <i>Clasificación de las enzimas</i>	33
Tabla 4. <i>Comparación de características de los métodos</i>	39
Tabla 5. Características comparativas de escalonamiento de procesos	40
Tabla 6. <i>Operacionalización de las variables</i>	49
Tabla 7. <i>Diseño experimental</i>	53
Tabla 8. Diseño experimental para la hidrólisis enzimática	60
Tabla 9. Parámetros asociados de la ecuación 4, para determinar los β -glucanos. 66	
Tabla 10. Caracterización del residuo LFC.	70
Tabla 11. Análisis proximal de la levadura gastada	72

Tabla 12. Datos recolectados en la determinación de β -glucanos	74
Tabla 13. <i>Determinación del contenido de β glucanos (% p/p)</i>	76
Tabla 14. <i>Determinación de varianza de las variables</i>	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Problema medio ambiental localizado.	6
Figura 2. <i>Consumo de alcohol per cápita en Latinoamérica (2024)</i>	11
Figura 3. <i>Diagrama de flujo del proceso de la elaboración de cerveza.</i>	14
Figura 4. <i>Las diferencias de las economías lineales, de reciclajes y circular</i>	19
Figura 5. <i>Clasificación de β-glucanos según sus ramificaciones</i>	21
Figura 6. <i>Estructuras de β-glucanos según su fuente.</i>	22
Figura 7. <i>División de la pared celular de levadura</i>	23
Figura 8. Diferencias de enlaces β -(1,3) y β -(1,6)-glucanos	25
Figura 9. Diagrama de obtención de β -glucanos de la levadura de cervecera.....	28
Figura 10. Mecanismo enzimática de modelo clásico y de ajuste inducido	30
Figura 11. <i>Enzima proteasa</i>	31
Figura 12. Actividad enzimática de Corolase® 8000.....	37
Figura 13. Etapas de toma y recolección de muestra	55
Figura 14. Diagrama de flujo de caracterización y análisis proximal.	57
Figura 15. Bloques de cajas de β -glucanos (g/100g).....	78
Figura 16. Gráfica de variables principales en la determinación de β glucanos ...	81
Figura 17. Interacción de las variables vs β -glucanos	83
Figura 18. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados	85
Figura 19. Residuos para β glucanos	87
Figura 20. Gráfico 3D de β -glucanos (%p/p) vs Enzima (%) * Temperatura (°C)	89

Abreviaturas

LFC: líquido de la fermentación de cerveza

β : beta

DFP: *Diagrama de flujo de procesos*

T: Tratamientos

Abs: absorbancia

x: promedio aritmético

UV: ultra violeta

Vis: visible

FV: Volumen de muestra

ΔA : diferencia de absorbancia

F: factor de coinversión

Ha: hipótesis alternativa

Ho: hipótesis nula

H: humedad

s: desviación estándar

E: enzima

W: peso

M: molar

mM: milimolar

RESUMEN

La presente investigación evaluó el efecto del pH, la temperatura y la concentración enzimática sobre el rendimiento de la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza para la determinación de β -glucanos. El procedimiento experimental incluyó el pretratamiento de la muestra mediante filtrado, desgasificado y subdivisión en ocho tratamientos con tres replicas. Cada tratamiento fue sometido a la acción de la enzima Corolase® 8000 bajo condiciones controladas de pH (6.0 y 8.0), temperatura (60 y 80 °C) y concentración enzimática (0.5% y 2.0%), con agitación constante a 40 rpm durante un tiempo fijo de 120 minutos. La determinación de β -glucanos se realizó según el método oficial AOAC 995.16, mediante espectrofotometría UV-Vis a 510 nm. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA y la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Como resultado se obtuvo un rendimiento máximo de $76.07 \% \pm 0.0092$ (3.818 g de β -glucanos/100 g de residuo) bajo condiciones óptimas de hidrólisis enzimática: pH 8, 80 °C y 2 % de enzima. La temperatura y el pH tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$), y la concentración enzimática del 2 % fue el factor clave para maximizar la revalorización del residuo cervecero.

Palabras claves: β -glucanos, Corolase 8000, espectrofotometría GOPOD, residuo líquido de la fermentación de cervecería.

ABSTRACT

This research evaluated the effect of pH, temperature, and enzyme concentration on the yield of enzymatic hydrolysis of brewery fermentation liquid residue for the determination of β -glucans. The experimental procedure included sample pretreatment by filtration, degassing, and subdivision into eight treatments with three replicas. Each treatment was subjected to the action of Corolase® 8000 enzyme under controlled conditions of pH (6.0 and 8.0), temperature (60 and 80 °C), and enzyme concentration (0.5% and 2.0%), with constant agitation at 40 rpm for 120 minutes. β -glucan quantification was performed using the official AOAC 995.16 method, through UV-Vis spectrophotometry at 510 nm. The data obtained were statistically analyzed using ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

As a result, a maximum yield of $76.07 \% \pm 0.0092$ (3.818 g β -glucans/100 g of residue) was obtained under optimal hydrolysis conditions: pH 8, 80 °C, and 2 % enzyme concentration. Both temperature and pH had significant effects ($p < 0.05$), and 2 % enzyme concentration was the key factor to maximize the revalorization of the brewing by-product.

Keywords: β -glucan, Corolase 8000, UV spectrophotometry, enzymatic hydrolysis, spent yeast, brewery liquid residue.

GENERALIDADES

Introducción

En la actualidad, la economía circular se ha convertido en un modelo clave para la sostenibilidad, promoviendo la reducción, reutilización y valorización de los residuos industriales (Lin *et al.*, 2013). En este contexto, la industria cervecera genera grandes volúmenes de subproductos, entre ellos, el residuo líquido de la fermentación de cerveza (levadura gastada), un residuo con alto contenido de proteínas y β -glucanos, pero que, en la mayoría de los casos, no es aprovechado adecuadamente, representando un problema ambiental.

La industria cervecera genera grandes volúmenes de residuo líquido de fermentación, compuesto principalmente por levadura gastada y agua, uno de los principales subproductos del proceso. Este residuo, formado en su mayoría por células de *Saccharomyces cerevisiae*, representa entre el 2 y 4 % del volumen total de cerveza producida (Vieira *et al.*, 2020). A pesar de su elevado contenido de proteínas, polisacáridos y compuestos bioactivos, su aprovechamiento es limitado, generando impactos ambientales por su disposición inadecuada (Gautério *et al.*, 2022). Entre sus componentes más valiosos destaca el β -glucano, polisacárido estructural de la pared celular de levaduras y hongos, con propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes y gelificantes (Bashir y Choi, 2017). Los β -glucanos tienen aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y biomédica, como agentes espesantes, prebióticos y en películas biodegradables (Kwiatkowski *et al.*, 2021). El residuo líquido generado durante la etapa de fermentación en la “Cervecería Backus y Johnston S.A.A. – Planta Cusco” constituye un subproducto con potencial de valorización mediante su transformación en compuestos de alto valor agregado, como los β -glucanos.

Este polisacárido presenta aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, debido a sus propiedades funcionales y otros beneficios (Vetvicka y Vetvickova, 2020). No obstante, la recuperación eficiente de β -glucanos a partir del residuo líquido de la fermentación de cerveza (que contiene la levadura gastada) requiere de procesos tecnológicos adecuados, como la hidrólisis enzimática, que permiten la disrupción de la pared celular y la liberación del polisacárido sin comprometer su estructura. Factores como la temperatura, el pH y la concentración enzimática influyen significativamente en el rendimiento de extracción del β -glucano (Avramia y Amariei, 2021). El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de las variables operativas en el rendimiento de la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza para la obtención de β -glucanos, empleando la enzima proteasa Corolase 8000. Para ello, se diseñó un estudio experimental en el que se evaluaron tres variables a dos niveles cada una: temperatura (60 y 80 °C), pH (6 y 8) y concentración enzimática (0,5 y 2 % p/p). La determinación de los β -glucanos se realizó mediante el método oficial AOAC 995.16, utilizando espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados de esta investigación permitirán optimizar la valorización del residuo líquido de fermentación, promoviendo su aprovechamiento en aplicaciones industriales y contribuyendo a la reducción del impacto ambiental asociado a su disposición inadecuada. Asimismo, la investigación busca sentar las bases para su extracción a escala industrial en la región, ya que los parámetros evaluados pH, temperatura, concentración enzimática y tiempo, se encuentran dentro de condiciones moderadas y fácilmente adaptables a procesos industriales. Además, se espera que el conocimiento generado sobre las condiciones óptimas de extracción de β -glucanos facilite su aplicación en el desarrollo de nuevos productos funcionales y biomateriales sostenibles, cuya producción aún no se ha implementado en la región del Cusco, a pesar de la abundante disponibilidad de materia prima.

I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Situación problemática

Los procesos de producción, involucran la transformación de materias primas los cuales producen desechos líquidos y sólidos. Esto se vuelve crucial en la industria del procesamiento de alimentos, que se desarrolla a diferentes escalas y donde se utiliza una amplia gama de recursos naturales, lo que resulta en problemas ambientales comunes en la industria cervecera (Aravena, 2003). La economía circular contribuye a la conservación del medio ambiente y de los recursos naturales, al mismo tiempo que promueve el crecimiento sostenible y la salud pública. La transición desde un modelo de economía lineal basado en tomar, fabricar y desechar hacia un modelo circular centrado en renovar, reutilizar y compartir se proyecta como una estrategia clave para alcanzar los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Esta investigación tiene un impacto significativo especialmente en los ODS 6 (agua limpia y saneamiento), 9 (industria, innovación e infraestructura), 13 (acción por el clima) y 15 (vida de ecosistemas terrestres), promoviendo una producción y consumo responsables (OMS, 2018).

A pesar de que los desechos líquidos generados durante el proceso de elaboración de cerveza contienen compuestos de alto valor como levadura residual, alcohol, aceites esenciales de lúpulo y β -glucanos (Martínez, 2020), su aprovechamiento sigue siendo limitado en muchas industrias. Esta situación representa una pérdida de recursos potencialmente valiosos, particularmente los β -glucanos, polisacáridos con propiedades nutricionales y funcionales, aplicables como aditivos en la industria alimentaria, suplementos en la alimentación animal y componentes en productos farmacéuticos.

Si bien la recuperación de β -glucanos a partir de estos residuos ofrece ventajas como sostenibilidad, reducción de desechos y rentabilidad frente a otras fuentes comerciales, aún no se ha desarrollado ampliamente una tecnología eficiente para su extracción en regiones con alta disponibilidad de materia prima. Esta falta de valorización no solo limita el desarrollo de nuevos productos funcionales, sino que también contribuye al impacto ambiental derivado de la disposición inadecuada de los residuos cerveceros.

Existen diversos métodos para la extracción y purificación de β -glucanos a partir del residuo líquido de la fermentación cervecera, entre ellos: la extracción enzimática, térmica, en medio ácido o alcalino, y técnicas asistidas con microondas o ultrasonidos (Zhu *et al.*, 2016). La hidrólisis enzimática, en particular, emplea enzimas específicas como las β -glucanasas, que rompen las cadenas complejas de polisacáridos en unidades más pequeñas, facilitando así la liberación, extracción y purificación de los β -glucanos (Mussatto *et al.*, 2006).

En la ciudad del Cusco, la empresa cervecera Backus y Johnston S.A.A. genera un aproximado de 300,000 L por cada mes (dependiendo de los meses festivos) de residuos líquidos principalmente durante la etapa de fermentación del proceso de elaboración de cerveza de 32,000 hL/mes aprox., en la producción de todas las variedades de su portafolio de dicha cervecera. Con el incremento anual en los volúmenes de producción de diversas variedades de cerveza, también ha aumentado de manera proporcional la generación de estos residuos. En años anteriores, los residuos líquidos eran distribuidos como suplemento alimenticio para el sector pecuario, siendo utilizados en la alimentación de animales mayores y menores destinados a la producción de carne y leche. En aquel entonces, el consumo de este subproducto estaba en equilibrio con los volúmenes generados por la industria cervecera.

Actualmente, la cervecería enfrenta un problema creciente debido al aumento en la generación de desechos líquidos y a la disminución de la demanda por parte del sector ganadero, que solamente consumen el 45% (135,000 L) de la levadura gastada del residuo líquido de la fermentación de cerveza generado. Esta situación ha llevado a que dichos residuos más de 55% (165,000L) cada mes, sean utilizados como fertilizante en campos de cultivo, aplicándolos directamente como riego. Sin embargo, esta práctica genera impactos ambientales negativos, ya que la descomposición de la materia orgánica presente, principalmente levaduras, produce olores desagradables y libera compuestos que deterioran la calidad del aire de la zona. Esto representa un riesgo para el medio ambiente y afecta negativamente a la salud y bienestar de las poblaciones cercanas. También en medio de este grave problema medio ambiental, hay una gran oportunidad en la revalorización del residuo en generar productos de alto valor funcional (como prebióticos, nutraceúticos y otros) demandado en muchas industrias farmacéuticas y alimentarias. Que solo 3 países como Reino unido, Irlanda y Países bajos a nivel mundial dominan el mercado en la producción de β -glucanos a partir de los cereales, también investigan la obtención de otras fuentes como la levadura gastada de las cervecerías.

La empresa JMC Soluciones Ambientales S.A.C. (empresa tercerizada) es la encargada del acopio y la disposición final del residuo líquido proveniente de la fermentación de cerveza de la Cervecería Backus y Johnston S.A.A. – Planta Cusco. Actualmente, este residuo solo el 45% se destina a la disposición como alimentos de animales y la producción de composta el 55%, como se muestra en la Figura 1; sin embargo, esta alternativa no resulta rentable debido a los altos costos logísticos asociados. Además, el proceso de descomposición del residuo, compuesto principalmente por levadura y agua, genera olores desagradables, lo que representa un problema ambiental y limita su viabilidad como estrategia de gestión sostenible. También dicha empresa tercerizada busca las posibles

soluciones a la problemática con proyectos de corto, mediano y largo plazo en colaboración de muchos sectores involucrados en la región (Gobierno regional de Cusco, INIA, otros).

Figura 1.

Problema medio ambiental localizado.



El propósito de este estudio es proponer una solución alternativa al problema medio ambiental previamente expuesto, mediante la **Evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza para determinar de β -glucanos**. Este enfoque busca revalorizar los residuos generados durante el proceso cervecero, aprovechando su potencial como fuente de compuestos de alto valor agregado. Asimismo, se espera que el conocimiento generado sobre las condiciones óptimas de extracción de β -glucanos facilite su aplicación en el desarrollo de nuevos productos funcionales y biomateriales sostenibles, cuya producción aún no ha implementado en la región del Cusco ni en el país de Perú, a pesar de la abundante disponibilidad de esta materia.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es el rendimiento de la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza para determinar β -glucanos?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cuál será el efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza sobre el rendimiento de β -glucanos?
- ¿Cuál es el efecto del pH en la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza sobre el rendimiento de β -glucanos?
- ¿En qué medida la concentración de la enzima afecta en la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza sobre el rendimiento de β -glucanos?

1.3 Justificación de la investigación

La investigación sobre la evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza para determinar β -glucanos, no solo aborda una problemática ambiental de la región del Cusco, sino también aprovecha estos residuos con la perspectiva de la economía circular. También esta investigación tiene un enfoque moderno de producción y al tener un impacto positivo en la industria cervecera y la sociedad en general.

En la actualidad, el enfoque de la economía circular busca minimizar la generación de desechos y maximizar el aprovechamiento de los recursos. Este modelo promueve la valorización de subproductos mediante su transformación en productos de valor agregado, contribuyendo al cierre del ciclo productivo. Al aplicar este enfoque al residuo líquido de

fermentación cervecera, se posibilita su reintegración en la cadena de valor, evitando su disposición inadecuada y reduciendo el impacto ambiental, especialmente en la región del Cusco.

La industria cervecera genera grandes volúmenes de desechos líquidos durante el proceso de fermentación, cuya disposición o tratamiento representa un desafío ambiental y económico. Sin embargo, estos residuos contienen compuestos valiosos que, al no ser adecuadamente valorizados, constituyen una oportunidad desaprovechada. Entre ellos, los β -glucanos destacan como un polisacárido funcional con múltiples beneficios para la salud y aplicaciones industriales. La extracción de β -glucanos a partir del residuo líquido de fermentación es una fuente alternativa a otras fuentes tradicionales de este compuesto, muchas de las cuales provienen de recursos no renovables. La ingesta de β -glucanos ha demostrado tener efectos positivos sobre la salud humana, incluyendo la modulación del sistema inmunológico y la regulación de los niveles de glucosa en sangre (Whitehead *et al.*, 2024). En la industria alimentaria, se utilizan por sus propiedades funcionales como agentes espesantes y gelificantes, mejorando la textura y estabilidad de los alimentos (Brennan *et al.*, 2013); mientras que en la industria farmacéutica se valoran por sus propiedades inmunomoduladoras y antitumorales (Murphy *et al.*, 2020). El presente estudio busca contribuir al aprovechamiento sostenible de un subproducto abundante, promoviendo la economía circular y la innovación en el desarrollo de productos funcionales.

Estudios previos han demostrado que la hidrólisis enzimática con proteasas, como Corolase 8000, facilita la liberación de β -glucanos al degradar las proteínas estructurales presentes en la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Kwiatkowski *et al.*, 2021). No obstante, el rendimiento de este proceso puede variar considerablemente según la fuente del residuo y las condiciones operativas empleadas, lo que evidencia la necesidad de realizar

estudios específicos para distintas matrices biológicas (Gautério *et al.*, 2022). En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo final en la determinación de β -glucanos a partir del residuo líquido de fermentación cervecera, mediante un proceso de hidrólisis enzimática optimizado. Este enfoque busca no solo valorizar un subproducto actualmente subutilizado, sino también generar información técnica que permita su escalado y aplicación en el desarrollo de productos funcionales y biopolímeros biodegradables (Vieira *et al.*, 2020). De este modo, se contribuirá a la sostenibilidad ambiental, la economía circular y la innovación en el aprovechamiento de residuos industriales en la región del Cusco.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el rendimiento de la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza para determinar β -glucanos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza sobre el rendimiento de β -glucanos.
- Evaluar el efecto del pH en la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza sobre el rendimiento de β -glucanos.
- Evaluar el efecto de concentración de enzima en la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza sobre el rendimiento de β -glucanos.

II FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Bases teóricas

2.1.1 La cerveza.

La denominación de la cerveza hace referencia a la bebida alcohólica o alimento producido por la fermentación alcohólica, mediante levaduras selectas de su categoría cervecera, de un mosto fermentable procedente de la maceración de malta o producto concentrado de azúcares de los granos de cebada o de otros cereales. También adicionan a la mezcla otros productos ricos en almidones transformables en azúcares por hidrólisis enzimática, lúpulo para proporcionar amargor característico de la cerveza y coadyuvantes que ayudan a mejorar la calidad del producto, finalmente pasa por el proceso de filtración reteniendo las impurezas presentes y pasteurización para asegurar la inocuidad de la cerveza (Berger *et al.*, 2005).

2.1.2 Análisis del consumo de cerveza

El mercado cervecero a nivel mundial mantuvo en 2024 un consumo aproximado de 1.89 mil millones de hectolitros, con un valor de mercado estimado en USD 793.74 mil millones (Statista, 2024). América y Asia continúan liderando la producción, concentrando el 63% del total mundial. China se mantiene como el mayor productor (con 381 millones de hectolitros en 2024), seguido por Estados Unidos (193 millones de hl) y Brasil (141 millones de hl). Estos tres países representan cerca del 38% de la producción global, reforzando su dominio en el sector, la cerveza sigue siendo la bebida alcohólica más consumida globalmente, con proyecciones de crecimiento anual del **3.2%** (CAGR) hasta 2030 (Grand View Research, 2024).

A nivel regional, Perú se mantiene como el cuarto lugar como mayor consumidor de cerveza en América Latina, con un consumo per cápita de 9.1 litros anuales en 2024, solo por detrás de Brasil (9.3 L) y Chile (9.5 L). Este crecimiento se debe al aumento de la preferencia por cervezas artesanales y premium, que registraron un incremento del 18% en ventas respecto al 2022 (IWSR, 2024). Como lo muestra la figura 2, de consumo de la cerveza.

Figura 2.

Consumo de alcohol per cápita en Latinoamérica (2024)

Ranking	País	Consumo (L)	Tendencia
1	Argentina	9.8	↑ (+0.7 vs 2022)
2	Chile	9.5	↑ (+0.5)
3	Brasil	9.3	↑ (+0.4)
4	Perú	9.1	↑ (+0.2)
5	Uruguay	8.9	Nuevo
6	Guyana	8.8	↔
7	Panamá	8.4	↑ (+0.5)
8	Belice	8.3	↑ (+0.1)
9	Colombia	8.2	Nuevo
10	Rep. Dominicana	8.0	Nuevo

Fuente: IWSR, 2024.

2.1.3 La industria cervecera

La industria cervecera, con más de 7,000 años de historia, sigue siendo una de las más importantes a nivel global, alcanzando un valor de mercado de USD 793,740 millones en 2023 (Statista, 2024). Su producción se basa en cebada malteada, lúpulo, agua y levadura, siguiendo un proceso que incluye malteado, fermentación y envasado, con innovaciones recientes como el uso de cereales alternativos (quinua, sorgo) y envases sostenibles. El sector

ha experimentado un auge en cervezas artesanales (15% del mercado) y un fuerte enfoque en sostenibilidad, reduciendo el consumo de agua a 3.5L por litro de cerveza y adoptando energías renovables. Además, genera millones de empleos y se adapta a tendencias como la personalización y la economía circular, consolidando su rol clave en la economía y cultura mundial (Bamforth, 2023).

2.1.4 La fabricación de la cerveza

La producción de la cerveza incluye varias etapas como la transformación de los ingredientes básicos como los granos malteados (principalmente cebada Pilsner y Pale Ale, las dos variedades más utilizadas en la industria), agua, lúpulo y levadura selecta. En los procesos generales, inicia con la maceración de la malta, seguida por fermentación, filtración, envasado y finalmente con la distribución.

Cada fabricante emplea recetas específicas para perfiles únicos de cerveza con las características propias y diferente a las demás, y en el campo del proceso de la cerveza se muestra en la figura 2, pero generalmente todos siguen las etapas en la industria cervecera para garantizar la mejor calidad y consistencia del producto esperado (Bamforth, 2023).

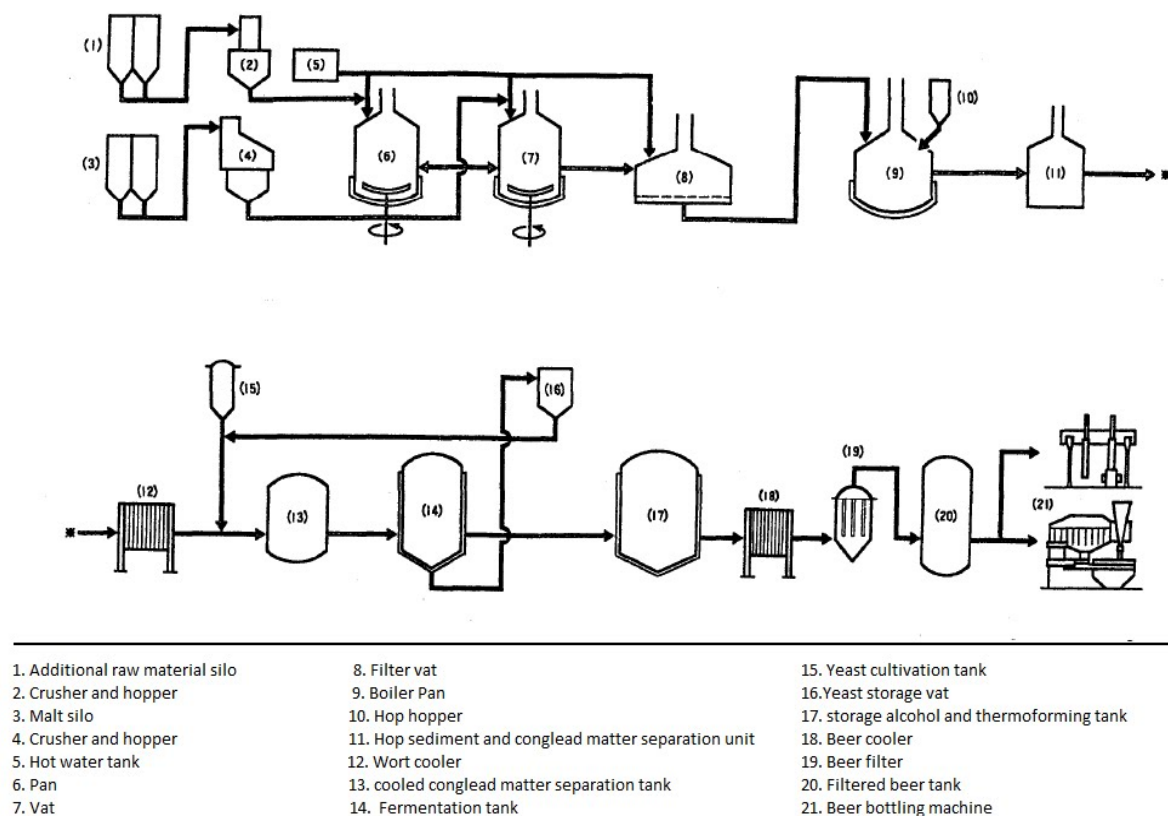
Según Briggs *et al.*, (2004) se menciona las etapas generales de producción de cerveza industrial son:

- **Malteado:** El grano de cereal generalmente la cebada se sumerge en agua para su germinación controlada y luego se seca en diferentes grados en una maltería para producir malta.
- **Molienda:** La malta se muele para desmenuzar en pequeñas partículas, creando el grist, junto con los cereales adicionales que pueden ser la avena, arroz, maíz y otros, que luego serán utilizado en el siguiente paso.

- **Maceración:** El grist (adjuntos compuestos de cereales como trigo, avena, maíz y arroz) se diluye con agua caliente en tanque de maceración. Para poder extraer los azúcares y otros compuestos solubles de la malta controlando el gradiente de temperatura y tiempo.
- **Hervido:** El mosto de la solución azucarada extraída de la maceración de la malta se tiene que llegar al punto de ebullición con lúpulo para poder agregar sabor característico a cerveza y garantizan la inocuidad del producto final.
- **Fermentación:** El mosto (contenidos de azúcares fermentables) de la malta se enfría y luego se transfiere al tanque fermentador, después la levadura seleccionada se añade para que inicie la fermentación de los azúcares de los grist y producir alcohol, CO₂ y levadura gastada.
- **Maduración:** La cerveza una vez culminada la fermentación primaria, sigue el proceso de la maduración en el fermentador para mejorar el sabor y clarificarla.
- **Filtración y clarificación:** La cerveza obtenida se filtra en sus diferentes grados para eliminar las impurezas y se somete a un proceso de clarificación para obtener una apariencia más transparente o los tipos de cervezas requeridas.
- **Carbonatación:** Se añade CO₂ a la cerveza para darle efervescencia y carbonatación.
- **Envasado:** el producto elaborado se envasa en diferentes presentaciones como botellas de vidrio, latas de aluminio o barriles para su distribución y consumo.
- **Control de calidad:** Al término del proceso, se implementan rigurosos controles que incluyen análisis físico-químicos (medición de alcohol, CO₂, pH y turbidez), pruebas microbiológicas para detectar contaminantes, evaluación sensorial por panel certificado, garantizando así la calidad, inocuidad y consistencia del producto final según los estándares internacionales. Para la cual se muestra la figura 3, la secuencia de los procesos en la producción de la cerveza industrial.

Figura 3.

Diagrama de flujo del proceso de la elaboración de cerveza.



Fuente: Briggs et al., (2004).

2.1.5 Residuos generados en la industria alimentaria

Este sector produce principalmente residuos orgánicos (60-70% del total), como cáscaras, huesos, pulpas y suero lácteo; inorgánicos (envases plásticos, metales y vidrio); y peligrosos (aceites usados y químicos de limpieza). Según la FAO (2023), estos desechos contribuyen al 8% de las emisiones globales de metano, se estima que representan el 44% de los residuos sólidos municipales en países en desarrollo, generando pérdidas económicas y ambientales significativas, lo que exige estrategias urgentes de valorización y manejo sostenible.

2.1.6 Residuos cerveceros

El término de "residuos cerveceros" se refiere al uso o valorización de los residuos generados por la industria cervecera, considerando como 'desecho' a toda sustancia u objeto del que su poseedor se deshace, tiene la intención de desechar o está obligado a hacerlo. En función de su destino final, los desechos orgánicos que surgen del proceso productivo pueden ser clasificados como desecho o subproducto. según (FAO, 2023).

Las raicillas de la malta, el bagazo y la levadura gastada son los principales subproductos producidos por la industria cervecera. Las yemas separadas de los granos de cebada germinada durante el proceso de malteado en condiciones controladas de temperatura y humedad se conocen como raicillas de malta. Se obtienen mediante el cribado del grano germinado y por cada 100 kg de cebada, se obtienen 5 kg de raicillas, el bagazo de la malta es el resultado del prensado y filtración del mosto terminado que se produce después de la hidrólisis natural y la sacarificación de los granos malteado, que es rico en proteínas y fibras. El subproducto más común en la industria cervecera es el bagazo, que abarca el 85 % de todos los desechos generados. También el bagazo requiere un proceso de prensado previo, mediante el cual se reduce su humedad del 80% al 60% al salir de la fábrica. Esta reducción incrementa el tiempo de conservación del bagazo. Las células de *Saccharomyces cerevisiae* que se extraen de la decantación de los fondos del mosto fermentado forman la biomasa conocida como levadura gastada o agotada al término de la fermentación, estas levaduras se separan mediante centrifugación y se limpian. Luego pasa por filtros para reducir el contenido de humedad hasta obtener un producto llamado levadura prensada, que tiene un 68 o 70 % de humedad y se envasa en bloques o en forma granulada. Finalmente, la levadura se deshidrata al vacío o en secadores de lecho fluidizado de atomización obteniendo una

levadura hasta un 8 % de humedad manteniendo así su inactividad biológica (Torrente, 2019).

2.1.7 Levadura viva vs. levadura gastada como residuo

La levadura viva, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, se caracteriza por su alta viabilidad y capacidad fermentativa, siendo empleada activamente en procesos industriales como la producción de cerveza, pan y vino. Estas células poseen metabolismo activo, membranas integra y capacidad de replicación bajo condiciones óptimas. En contraste, la levadura gastada es el resultado de la acumulación de células inactivas o muertas al final del proceso fermentativo, sin capacidad reproductiva ni fermentativa, debido al agotamiento de nutrientes, acumulación de etanol y estrés osmótico, por esta razón, se clasifica técnicamente como un residuo agroindustrial. (Marson *et al.*, 2020).

2.1.8 Levadura cervecera gastada

La levadura cervecera gastada (sin viabilidad) ha sido ampliamente estudiada como una biomasa con alto potencial de valorización en diversas industrias. A pesar de su inactividad, la levadura gastada contiene hasta 40–60 % de proteínas y entre 20–30 % de polisacáridos, siendo los β -glucanos uno de sus componentes estructurales más abundantes e importantes, localizados en la pared celular. Esta composición convierte a la levadura gastada en una fuente estratégica para la valorización de residuos cerveceros, ya que permite la recuperación de β -glucanos mediante técnicas como la hidrólisis enzimática, sin competir con cadenas productivas de alimentos. La disponibilidad, bajo costo y composición rica en proteínas convierten a la levadura gastada en una alternativa sostenible para el desarrollo de ingredientes funcionales y nutraceuticos. Esta evidencia respalda la necesidad de investigaciones orientadas a optimizar los procesos de extracción y transformación de estos

péptidos, como parte de estrategias de economía circular en la industria cervecera (Marson *et al.*, 2020). En la tabla 1 se observa las composiciones de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Tabla 1. Composición aproximada de *saccharomyces cerevisiae*

Componente	%	Descripción
Proteínas totales	50 %	Incluye proteínas intracelulares y de pared celular
Polisacáridos totales	30 %	Principalmente β -glucanos (60 %) y mananos (40 %)
Lípidos	5 %	Fosfolípidos y triglicéridos en membranas
Ácidos nucleicos	3 %	ADN y ARN presentes en el núcleo y citoplasma
Minerales (cenizas)	6 %	P y K principalmente; también Ca, Mg, Fe, Zn
Otros (metabolitos, vitaminas)	6 %	Incluye vitaminas B, compuestos fenólicos y residuos no clasificados

Fuente: Aguilar-Uscanga y François, (2003)

Contenido de β -glucanos a partir de proteínas de la levadura gastada.

En la valorización de subproductos industriales, como la levadura gastada proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, es de especial interés estimar compuestos de alto valor agregado, entre ellos los β -glucanos, polisacáridos presentes en la pared celular de dicha levadura. Dada la limitada disponibilidad de análisis específicos en algunas etapas de investigación, se propone una estimación indirecta basada en el contenido de proteína cruda, parámetro de fácil acceso y ampliamente reportado en la literatura científica.

La justificación de este enfoque radica en la composición estructural de la levadura. Diversos estudios han reportado que la pared celular representa entre un 15 % y 30 % del peso seco de la célula, y dentro de esta fracción, los β -glucanos constituyen aproximadamente entre el

50 % y 60 %. A partir de estos datos, es posible aplicar una regla de tres simple para proyectar la concentración estimada de β -glucanos, particularmente útil cuando no se cuenta con instrumental analítico avanzado para su determinación directa.

Este método ha sido empleado por autores como Vieira *et al.* (2020) y Marson *et al.* (2020), quienes utilizaron relaciones composicionales teóricas para estimar polisacáridos en matrices biológicas complejas como la levadura cervecera gastada. Asimismo, enfoques similares han sido validados en estudios sobre fibras dietéticas, almidones resistentes y otros compuestos bioactivos, especialmente en el campo de la tecnología de alimentos y bioprocesos industriales.

2.1.9 Economía circular

La definición de la economía circular busca cambiar el paradigma tradicional de la economía lineal (producir, usar y desechar) hacia un enfoque sostenible y comprometido con el cuidado del medio ambiente, la economía circular se centra en la gestión eficiente de los recursos, promoviendo ciclos cerrados de materiales y reduciendo la dependencia de recursos vírgenes. También incorpora dimensiones adicionales, como modelos de consumo que cambian (OMS, 2018).

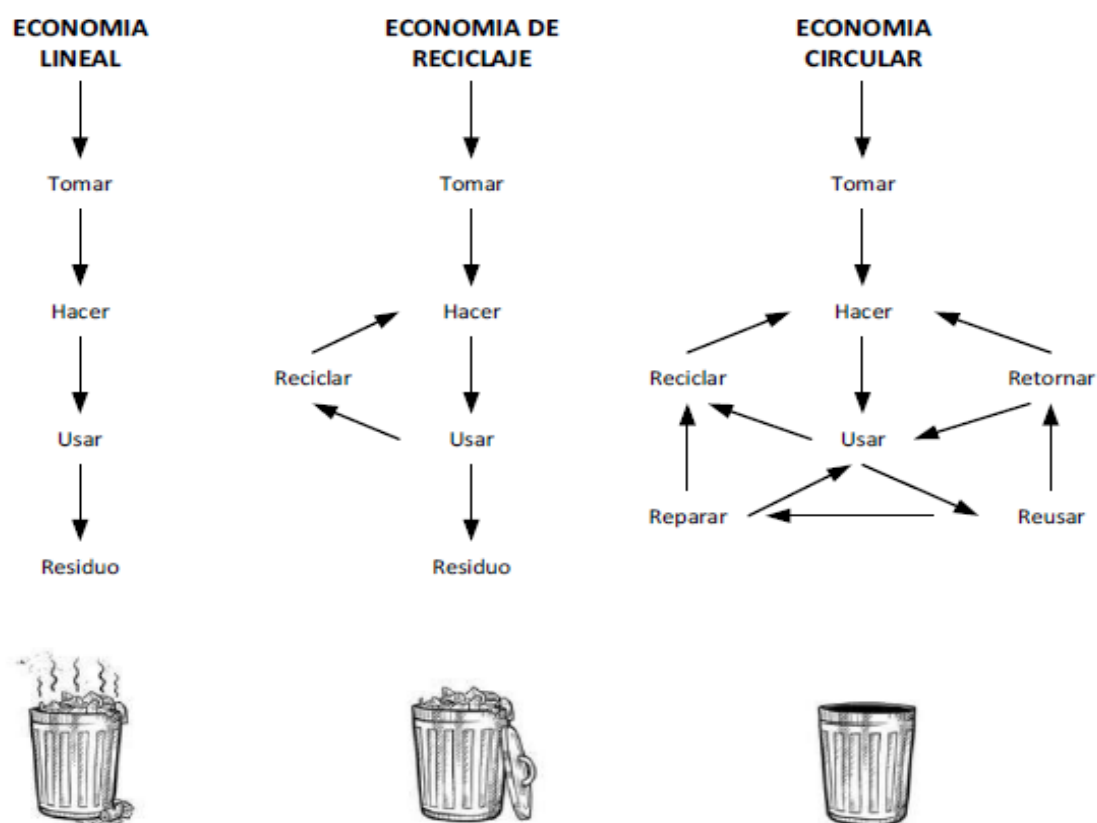
Es fundamental buscar acciones globales que mejoren el medio ambiente, la salud social y la economía. La valorización de desechos es una forma de convertir desechos agrícolas e industriales en productos con mayor valor comercial. Esta alternativa es completamente renovable y utiliza la biomasa de desechos como materia prima, lo que reduce la producción de desechos y los costos de manipulación (Corredor y Pérez, 2018).

En la Figura 4, se muestra un esquema que representa gráficamente los métodos que se han desarrollado desde la perspectiva económica. El concepto fundamental de economía

circular se refiere al uso de recursos durante el mayor tiempo posible, maximizando la eficiencia, creando el mayor valor agregado durante la etapa de uso y recuperando o reciclando productos o materiales después del uso. (Gobierno Regional de los Lagos, 2019).

Figura 4.

Las diferencias de las economías lineales, de reciclajes y circular



Fuente: Samaniego *et al.*, (2023).

En la producción de la cervecería, la economía circular se aplica para maximizar los recursos naturales y minimizar los residuos generados durante las etapas de producción de la cerveza. Los subproductos de la cervecería se pueden utilizar para generar energía, alimentos para animales, elaborar productos para la agricultura, entre otras aplicaciones, en lugar de ser simplemente desechados (Tammela, 2021).

2.1.10 β -glucanos

Los β -glucanos son fibras solubles compuestas por unidades de glucosa unidas principalmente por enlaces β -(1,3), con ramificaciones que pueden variar entre β -(1,6) o β -(1,4), dependiendo de su origen biológico. Estos polisacáridos se encuentran principalmente en las paredes celulares de bacterias, hongos, algas y cereales, donde cumplen funciones estructurales esenciales. En hongos como *Saccharomyces cerevisiae*, los β -glucanos forman parte fundamental de la pared celular, actuando como barrera protectora y facilitando el intercambio de sustancias con el entorno. Además de su rol estructural, los β -glucanos destacan por sus propiedades funcionales y beneficiosas para la salud, incluyendo actividad inmunomoduladora, antioxidante y prebiótica, lo que los convierte en compuestos de alto interés para las industrias alimentaria, farmacéutica y de la salud. En particular, su elevada concentración en la levadura gastada, un subproducto abundante de la industria cervecera, ha motivado el desarrollo de estrategias para su recuperación. En este contexto, la presente investigación plantea la hidrólisis enzimática como una alternativa biotecnológica eficiente para valorizar estos residuos y determinar β -glucanos con aplicaciones potenciales en productos funcionales y biomateriales sostenibles (Chan *et al.*, 2009; Latgé, 2007 y Vetvicka & Vetvickova, 2020).

2.1.10.1 Estructura y tipos de β -glucanos

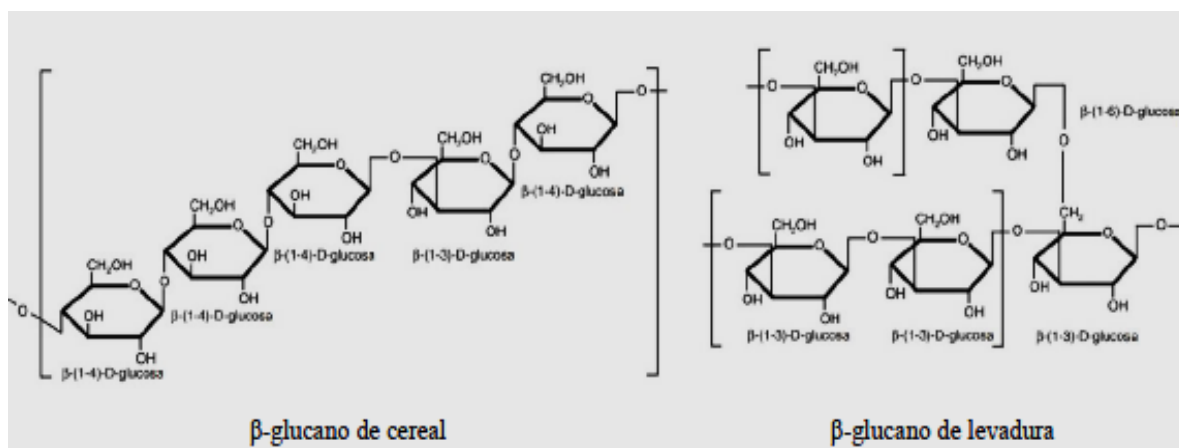
Las estructuras dependen de la procedencia del β -glucanos que pueden ser de origen bacteriano, fungí o vegetal como los cereales, estos pueden tener diferentes estructuras moleculares, que permite diferenciar la pared celular de los β -glucanos de la levadura y hongos en general está compuesta por ramas de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos (Volman *et al.*, 2008). Existen diferentes tipos de estructuras de β -glucanos que

varían según la fuente y la organización de las unidades de glucosa. Según Vetvicka y Vetvickova, (2020) algunos de los tipos más comunes tenemos:

- **β -(1,3)-Glucano:** Estos β -glucanos tienen enlaces glucosídicos β -(1,3) entre las unidades de glucosa. Son comunes en hongos, como las levaduras, y se encuentran en las paredes celulares, desempeñando un papel importante en la respuesta inmune.
- **β -(1,6)-Glucano:** Estos β -glucanos tienen enlaces glucosídicos β -(1,6) adicionales que se derivan de la cadena principal de β -(1,3)-glucano. Se encuentran en hongos y algunos granos como la cebada y la avena.
- **β -(1,4)-Glucano:** Estos β -glucanos tienen enlaces glucosídicos β -(1,4) entre las unidades de glucosa y son comunes en los cereales de la cebada y la avena.

La diferencia de las paredes celulares de los granos de la avena y cebada contienen β -glucanos no ramificados con enlaces de 1,3 y 1,4 glucopiranosil unidos por enlaces β . Los β -glucanos de origen bacteriano son residuos no enlazados de 1,3 glucopiranosil unidos por enlaces β (Volman *et al.*, 2008). Se visualiza en la figura 5, las estructura según su procedencia de β -glucanos.

Figura 5.
Clasificación de β -glucanos según sus ramificaciones



Fuente: Volman *et al.*, (2008).

2.1.10.2 Características físico-químicas de los β -glucanos

Además de las diferencias del tipo de enlace y ramificaciones, los homopolisacáridos de glucosa se unen a través de los enlaces β -(1,3) y β -(1,4) que presentan diferentes ramificaciones que varían en la solubilidad, masa molecular, estructura terciaria y en otras propiedades moleculares dependiendo su procedencia de obtención de β -glucanos (Lazaridou y Biliaderis, 2007). También los estudios indican recientemente que los β -glucanos de alto peso molecular proveniente de hongos, activan directamente los leucocitos o glóbulos blancos (células sanguíneas ejecutoras de la respuesta inmunitaria) y los β -glucanos de bajo peso molecular sirve para que las células de respuesta a las estimulaciones por citoquinas que son proteínas que regulan la respuesta inmunitaria (WOOD *et al.*, 1994).

A continuación, se muestra la figura 6, las estructuras de β -glucanos según su origen.

Figura 6.

Estructuras de β -glucanos según su fuente.

Tipo de β -glucano	Estructura	Descripción
Bacteria		Glucano lineal β -1,3 (ej: Curdlan)
Hongo		Glucano ramificaciones cortas β -1,6 y β -1,3 (ej: Esquizofilano)
Levadura		Glucano ramificaciones largas β -1,6 y β -1,3 (ej: β -glucano WGP, Betafectina)
Cereal		Glucano lineal β -1,3/1,4 (ej: avena, cebada, centeno)

Fuente: Volman *et al.*, (2008).

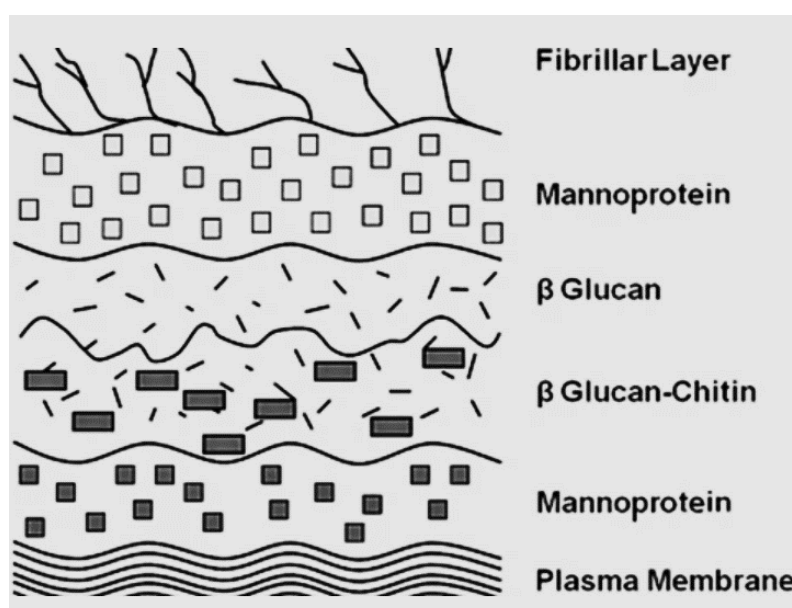
2.1.10.3 Levadura y β -glucanos

Las levaduras son microorganismos unicelulares del reino fungí. Estos hongos poseen una pared celular en la estructura externa de la célula, que encierra el protoplasto de su interior y el β -glucanos está situada entre la membrana plasmática y el medio externo. La pared celular es esencial para proteger la célula del exterior y el intercambio de sustancias necesarias para la célula, amortiguar el pH intracelular y extracelular de la célula de levadura, similar a la estructura de sándwich (Pontón, 2008).

A continuación, en la figura 7 se aprecia la estructura de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde se observa su división por capas: la fibrilla de la capa exterior, las nanoproteínas externas, los β -glucanos y la quitina en el centro, seguidos por las nanoproteínas internas y, finalmente, la membrana plasmática.

Figura 7.

División de la pared celular de levadura



Fuente: Pontón, (2008).

La levadura proveniente de la fermentación cervecera es una de las fuentes más importantes de β -glucanos, debido a su alta concentración en la pared celular. Diversos estudios señalan que la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* representa entre el 15 % y 25 % de la masa seca de la célula, y está compuesta principalmente por polisacáridos (aproximadamente de 80 %–90 %), entre los cuales predominan los β -glucanos, acompañados de menores proporciones de quitina y proteínas (alrededor del 40 %–50 % en base seca), así como una fracción menor de lípidos (Aguilar-Uscanga y François, 2003).

2.1.11 Contenido de β -glucanos en la levadura de cerveza

El contenido de β -glucanos en la levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) puede variar según diversos factores, como la cepa utilizada, las condiciones de cultivo, el estado fisiológico de las células y, en particular, el método de extracción aplicado. Según se muestra en la Tabla 1, la pared celular de la levadura, que constituye aproximadamente entre el 20 % y el 25 % del peso seco total de la célula, está compuesta principalmente por polisacáridos estructurales. Dentro de esta fracción, los β -glucanos constituyen entre el 40 % y el 45 % del total, siendo los β -(1,3)-glucano los predominantes, junto con una menor proporción de β -(1,6)-glucano. Diversos estudios han demostrado que, mediante técnicas de extracción optimizadas como hidrólisis enzimática, tratamiento alcalino o procesos asistidos por ultrasonido, es posible recuperar entre un 80 % y un 90 % de los β -glucanos presentes en la pared celular, lo que permite su aprovechamiento con fines tecnológicos, funcionales o nutracéuticos. (Klis y De Groot, 2006).

A continuación, se presenta la Tabla 2, composición de la pared celular de la levadura de cerveza.

Tabla 2.

Composición de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

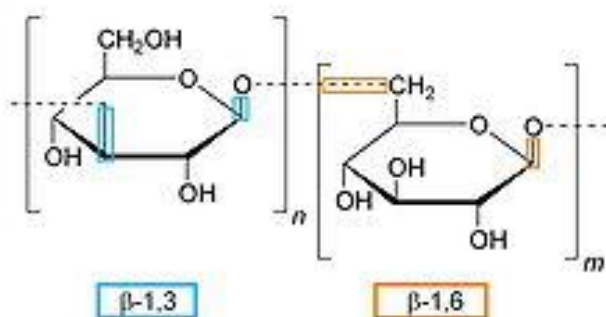
Componente	Aprox. (%)	Función principal
β-(1,3)-glucano	30–35%	Estructura base de la pared celular que proporciona rigidez mecánica.
β-(1,6)-glucano	~10%	Conectan β -(1,3)-glucanos con manoproteínas y otros componentes que aportan flexibilidad.
Total: β-glucanos	40–45%	De la pared celular
Manoproteínas	25–50%	Funcionalidad superficial probada; implicadas en adhesión, permeabilidad y antigenicidad.
Quitina	1–2%	Refuerza zonas específicas de la pared celular, especialmente el septo durante la división celular.
Proteínas estructurales	Variable	Algunos forman enlaces covalentes con los polisacáridos; participante en señalización y estructura.
Lípidos y otros polisacáridos	<1%	Residuos menores; pueden participar en procesos de remodelado o interacción externa.

Fuente: Vázquez *et al.*, 2019

A continuación, también se observa la figura 8, la diferencia de tipos de enlaces.

Figura 8.

Diferencias de enlaces β -(1,3) y β -(1,6)-glucanos



Fuente: Klis y De Groot, 2006

2.1.12 Métodos de extracción de β -glucanos

Los métodos de extracción de β -glucanos son diversos, y entre los más utilizados se encuentran el uso de agua caliente, enzimas o soluciones ácidas, aplicados a matrices biológicas provenientes de diversas fuentes como cereales (cebada y avena) y hongos, especialmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Hemery *et al.*, 2007). La elección del método de extracción es fundamental, ya que influye directamente en la conservación de los compuestos bioactivos con propiedades nutricionales y funcionales, lo que ha despertado un creciente interés en su aprovechamiento dentro de las industrias alimentaria, farmacéutica y de la salud. En general, los métodos más comunes para la extracción de β -glucanos incluyen técnicas como las descritas por Maheshwari *et al.* (2017):

- **Extracción térmica:** La utilización de agua caliente (45 a 60 °C) para extraer los β -glucanos presentes en granos y materiales biológicos. Este método es simple y ampliamente utilizado, pero su rendimiento de extracción es bajo.
- **Extracción por solventes orgánicos:** para este método se emplea solventes, como etanol o metanol, para disolver los β -glucanos y determinar extractos concentrados.
- **Extracción con soluciones ácidas o alcalinas:** El uso de soluciones ácidas (pH 2–5) o alcalinas (pH 8–12) puede facilitar la ruptura de la estructura de la pared celular y liberar los β -glucanos de las matrices biológicas, mejorando así su rendimiento de extracción. La selección del rango de pH dependerá del tipo de materia prima y de la sensibilidad del β -glucano a las condiciones de extracción.
- **Extracción enzimática:** Se emplea enzimas específicas, como celulasas o glucanasas, para degradar las estructuras celulares y liberar los β -glucanos de las fuentes naturales, este método proporciona mayor rendimiento en la extracción.

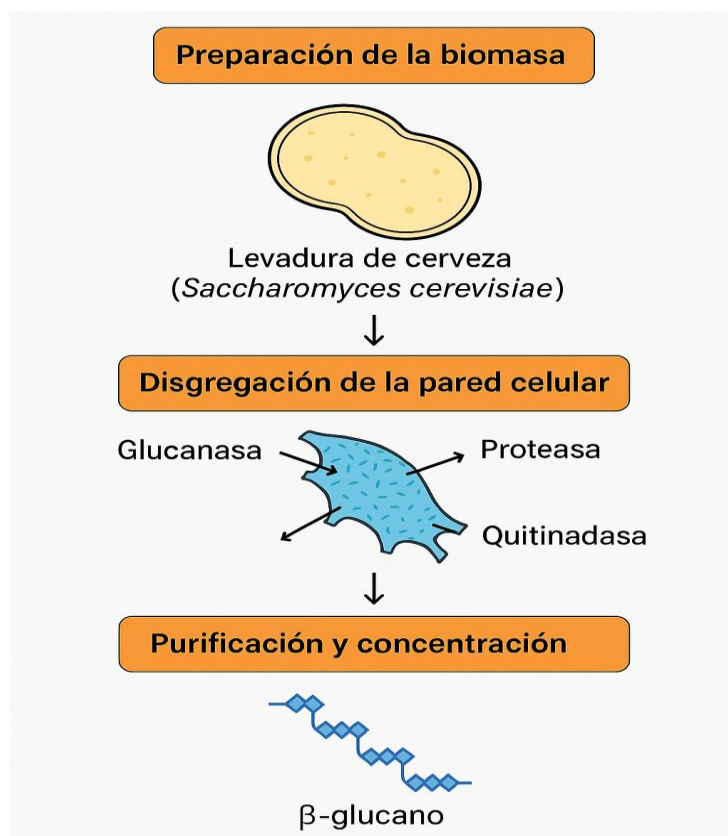
- **Extracción asistida por ultrasonidos o microondas:** Las nuevas técnicas de extracción que utilizan ultrasonidos o microondas para mejorar la eficiencia y velocidad de extracción de los β -glucanos. Esta técnica no es tan aplicada, por no ser tan conocida.

En la Figura 9, se muestra un esquema del proceso de obtención de β -glucanos a partir de levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*). El procedimiento incluye tres etapas principales: (1) preparación de la biomasa, (2) disgregación de la pared celular mediante enzimas hidrolíticas (glucanasa, proteasa y quitinasa), (3) purificación y concentración del β -glucanos liberado. Este enfoque biotecnológico permite recuperar compuestos funcionales de alto valor agregados a partir de subproductos industriales (Guarín y Sastoque, 2019).

A continuación, se presenta la Figura 9, secuencia de la obtención de β -glucanos a partir de la levadura de cerveza.

Figura 9.

Diagrama de obtención de β -glucanos de la levadura de cerveza.



Fuente: Compañía Nacional de Levaduras Levapan S.A. (2021)

2.1.13 Hidrólisis enzimática

Proceso bioquímico, donde las enzimas actúan como catalizadores para romper los enlaces químicos de una molécula más grande, utilizando moléculas de agua. Este proceso bioquímico es utilizado en la biología, la industria alimentaria y la industria farmacéutica, para descomponer compuestos complejos en unidades más pequeñas y más fácilmente utilizables. Estas enzimas están compuestas por proteínas de estructura tridimensional, en el cual tiene cavidades conocidas como "sitios activos" que demuestran afinidad con moléculas específicas de sustratos, que aceleran las reacciones químicas en el cuerpo y en sistemas biológicos (Nelson y Cox, 2021).

Mecanismos de acción enzimática: Llave–cerradura y ajuste inducido

Según Nelson y Cox, (2021) los mecanismos de acción enzimática explican cómo las enzimas interactúan con sus sustratos para formar productos. El modelo de llave–cerradura propone que el sitio activo de la enzima encaja perfectamente con un sustrato específico, destacando su alta especificidad estructural. En cambio, el modelo de ajuste inducido plantea que el sitio activo es flexible y se adapta a diferentes sustratos, lo que permite a algunas enzimas actuar sobre moléculas con estructuras similares. Ambos modelos explican la formación del complejo enzima–sustrato y la posterior liberación de productos.

a) Modelo de llave y cerradura (modelo clásico):

- En este modelo, la enzima (E) posee un sitio activo con una forma específica, complementaria al sustrato (S), como una cerradura a su llave.
- El sustrato se une perfectamente al sitio activo, formando el complejo enzima-sustrato (ES).
- Posteriormente, la enzima cataliza la transformación del sustrato en productos (P), los cuales se liberan, quedando la enzima libre para iniciar un nuevo ciclo.
- Este modelo resalta la especificidad estructural entre enzima y sustrato.

b) Modelo de ajuste inducido (modelo moderno):

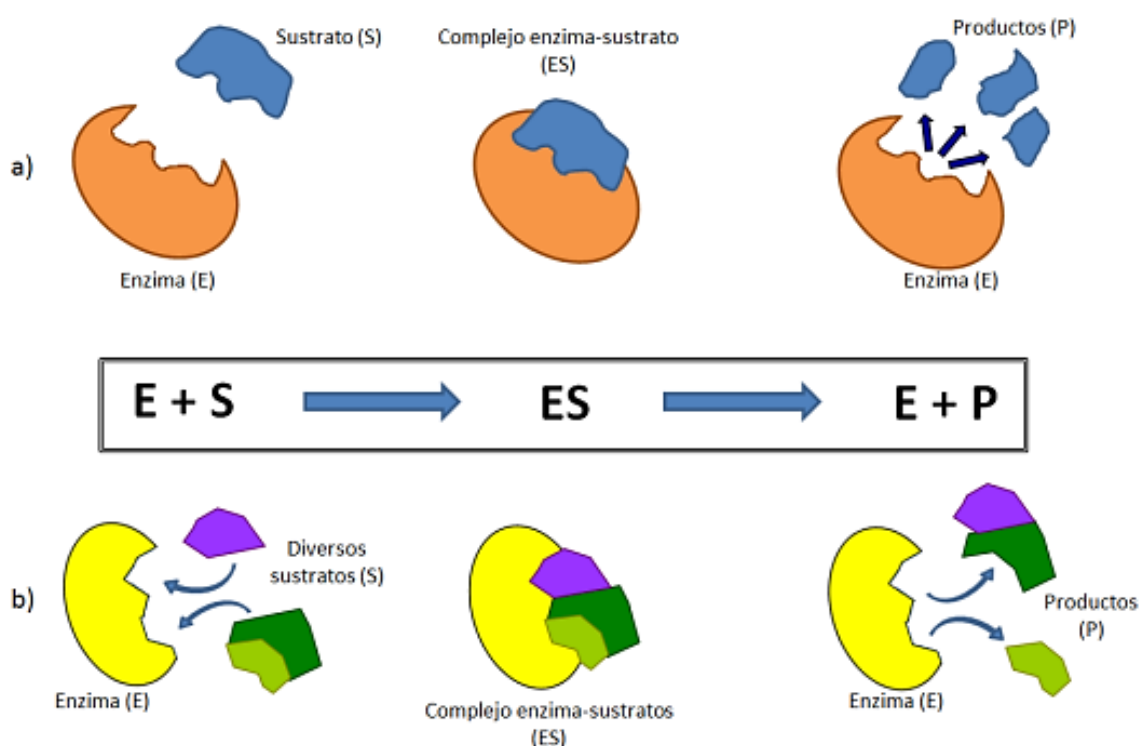
- Aquí, la enzima tiene un sitio activo más flexible, que puede ajustarse a la forma del sustrato.
- Se muestra cómo diferentes sustratos (S) pueden inducir un cambio conformacional en la enzima para acomodarse en el sitio activo.

- Se forma el complejo enzima-sustratos (ES) ajustado, que luego permite la conversión en productos (P).
- Este modelo explica mejor la capacidad de adaptación de algunas enzimas para actuar sobre múltiples sustratos similares.

A continuación, se observa la Figura 10, el mecanismo de acción enzimática de modelo clásico de llave – cerradura y el modelo de ajuste inducido.

Figura 10.

Mecanismo enzimático de modelo clásico y de ajuste inducido



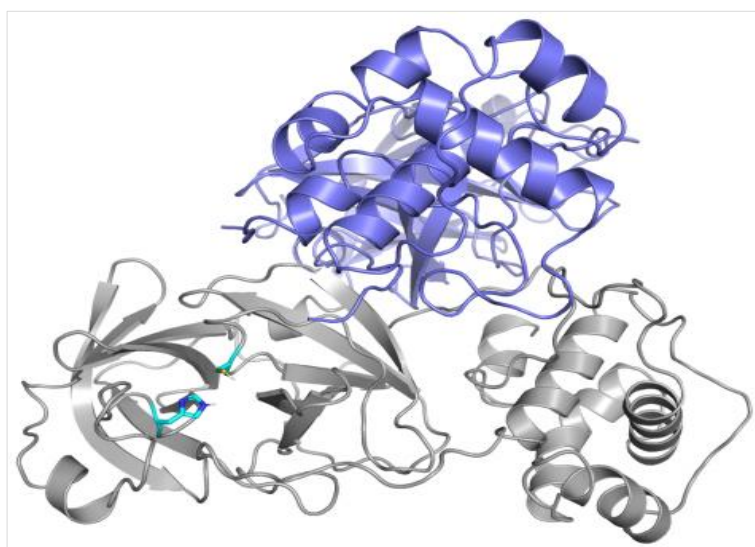
Fuente: Agrologia, (2015)

En el libro *Lehninger Principles of Biochemistry* de Nelson y Cox (2021), se aborda de manera detallada la función de las enzimas en los sistemas biológicos. Como se presenta en la figura 11 la estructura de una enzima proteasa, destacando su papel fundamental en la catálisis de reacciones bioquímicas. Que permite comprender la

eficiencia con la que las enzimas actúan sobre sus sustratos, facilitando procesos bioquímicos clave como la digestión, la síntesis de biomoléculas y la regulación metabólica.

Figura 11.

Enzima proteasa



Fuente: Nelson y Cox (2021).

2.1.14 Naturaleza química de las enzimas

Las enzimas son biocatalizadores que se encuentra en la naturaleza, principalmente proteica que aceleran o inhibe las reacciones bioquímicas en los sistemas vivos, sin ser consumidas en el proceso (Berg *et al.*, 2018). Están compuestas por aminoácidos que se pliegan en estructuras terciarias tridimensionales específicas, determinando su función catalítica (Nelson y Cox, 2021). Sin embargo, algunas enzimas requieren cofactores no proteicos para su actividad, como:

- Iones metálicos (Zn^{2+} en anhidrasas carbónicas, Mg^{2+} en quinasas).
- Coenzimas (NAD^+ , FAD, coenzima A), derivadas de vitaminas (Lodish *et al.*, 2021).

Estas moléculas auxiliares se clasifican en:

- Grupos prostéticos (unidos covalentemente).
- Cosustratos (se unen y liberan durante la reacción).

Mecanismo de Acción Enzimática

Las enzimas reducen la energía de activación ($\Delta G^\ddagger$) de las reacciones, facilitando la formación del estado de transición (Nelson y Cox, 2021). Su acción se explica mediante:

- Modelo de llave-cerradura: La enzima y el sustrato encajan perfectamente.
- Modelo de ajuste inducido: La enzima cambia su conformación al unirse al sustrato.

La especificidad enzimática puede ser:

- Absoluta (actúa sobre un único sustrato).
- Grupo-específica (proteasas que hidrolizan enlaces peptídicos).
- Estereoespecífica (L-aminoácido oxidasa).

Clasificación de las enzimas

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) clasifica las enzimas en seis clases principales según el tipo de reacción que catalizan, como se indica en la Tabla 3 (Berg *et al.*, 2018). Esta clasificación, basada en el sistema EC (Enzyme Commission), cada una con funciones específicas en los procesos bioquímicos. Este sistema facilita el estudio y aplicación de las enzimas en biotecnología.

Tabla 3.*Clasificación de las enzimas*

Clase	Función	Ejemplo
1. Oxidorreductasas	Catalizan reacciones redox	Alcohol deshidrogenasa
2. Transferasas	Transfieren grupos funcionales	Hexoquinasa
3. Hidrolasas	Rompen enlaces con agua	Lipasa (Glucanasas)
4. Liasas	Forman/rompen enlaces C-C, C-O	Anhidrasa carbónica
5. Isomerasas	Rearreglan isómeros	Fosfoglucoisomerasa
6. Ligasas	Unen moléculas con ATP	ADN ligasa

Fuente: Berg *et al.*, 2018

Clasificación de las enzimas Glucanasas

Las glucanasas son enzimas hidrolíticas que catalizan la ruptura de enlaces β -glucosídicos en polisacáridos como la celulosa, β -glucanos y otros polímeros de glucosa. Se clasifican en (Berg *et al.*, 2018):

- β -1,3-Glucanasas (EC 3.2.1.39): Degradan enlaces β -1,3 en β -glucanos. presente en paredes celulares de hongos y levaduras.
- β -1,4-Glucanasas (EC 3.2.1.4): Rompen enlaces β -1,4 en celulosa y derivados.
- β -1,6-Glucanasas (EC 3.2.1.75): Actúan sobre enlaces β -1,6.

2.1.15 Hidrólisis enzimática de β -glucanos

La hidrólisis enzimática de β -glucanos es un proceso bioquímico en el cual las enzimas conocidas como glucanasas catalizan los enlaces β -glucosídicos presentes, que son

polisacáridos compuestos por unidades de glucosa conectadas mediante enlaces β (Nelson y Cox, 2021). Durante la hidrólisis, las glucanasas rompen estos enlaces mediante la adición de moléculas de agua. Este método más utilizado en la actualidad garantiza la calidad del proceso de hidrólisis enzimática, que es importante en la industria alimenticia, farmacéutica y atención médica, ya que permite liberar y concentrar las unidades de glucosa de los β -glucanos, lo que puede aumentar su solubilidad, biodisponibilidad y sus propiedades beneficiosas para la salud. En este contexto, la hidrólisis enzimática de β -glucanos es relevante para mejorar sus propiedades funcionales y su utilidad en diversas aplicaciones (Skendi *et al.*, 2010).

2.1.16 Factores que afectan la actividad enzimática

- 1) **Efecto de la temperatura en la actividad enzimática:** A temperaturas elevadas, las enzimas suelen tener una mayor actividad y la velocidad de la reacción de hidrólisis aumenta
 - **Fundamento:** La velocidad de reacción enzimática sigue la ecuación de Arrhenius, donde el aumento de temperatura incrementa la energía cinética de las moléculas, favoreciendo los choques efectivos entre enzima y sustrato (Nelson & Cox, 2021).
 - **Límite térmico:** Cada enzima tiene una temperatura óptima (ej.: 40-60°C para muchas glucanasas). Superarla causa desnaturalización proteica, reduciendo la actividad (Berg *et al.*, 2018).
- 2) **Influencia del pH en la hidrólisis enzimática:** Cada enzima tiene su pH ideal donde se activa más en la hidrólisis y en el mecanismo, el pH afecta la ionización de residuos clave en el sitio activo, alterando la unión al sustrato (Nelson y Cox, 2021).

- **β -glucanasas fúngicas:** pH óptimo 4.5-5.5 (rango ácido).
- **Proteasas alcalinas:** pH 8-10 (rango básico).

Consecuencias: Desviaciones del pH óptimo provocan pérdida de actividad por cambios conformacionales (Lodish *et al.*, 2021).

3) **Tiempo de reacción y grado de hidrólisis:** El tiempo óptimo de la reacción es una variable que determina el grado de hidrólisis alcanzado. A medida que aumenta el tiempo, favorece la reacción de hidrólisis y la cantidad de producto formado incrementa

- **Cinética:** La hidrólisis sigue una curva saturable (Michaelis-Menten). Tiempos prolongados pueden inducir inhibición por producto (Nelson & Cox, 2021).
- **Optimización:** En la obtención de β -glucanos, Tãm *et al.* (2013) determinaron que 120 minutos era el tiempo óptimo para maximizar el rendimiento.

4) **Efecto de la concentración de enzimas y sustrato en la hidrólisis enzimática:** La relación de concentración de enzimas y sustratos también influye en la tasa de hidrólisis

- La velocidad de reacción aumenta proporcionalmente con la concentración de enzima ($[E]$), manteniendo $[S]$ constante (cinética de 1° orden) (Berg *et al.*, 2018).
- A altas $[S]$, la velocidad alcanza una meseta (V_{max}) cuando todos los sitios activos están saturados (cinética de Michaelis-Menten) (Nelson & Cox, 2021).

Constante de Michaelis (K_m): Indica la afinidad enzima-sustrato. Un K_m bajo significa alta afinidad y para β -glucanasas, valores típicos de K_m oscilan 0.1-5 mM (0.001 moles por litro) para β -glucanos, como se muestra en la ecuación general de Michaelis-Menten (Jiang *et al.*, 2020).

$$v_0 = (V_{\max} * [S]) / (K_m + [S]) \dots\dots\dots \text{Ecuación general de Michaelis-Menten}$$

Donde:

V_0 : Velocidad inicial de reacción

$V_{\max}$: Velocidad máxima de reacción

$[S]$: Concentración de sustrato

K_m : Constante de Michaelis-Menten

Inhibición por exceso de sustrato: Concentraciones muy altas de sustrato pueden disminuir la eficiencia catalítica (Nelson & Cox, 2021).

2.1.17 Estabilidad térmica de los β -glucanos

Los β -glucanos, polisacáridos presentes en la pared celular de levaduras y cereales, son reconocidos por su resistencia a condiciones térmicas moderadamente elevadas. Según el estudio la disolución de β -glucanos tipo (1,3) y (1,6) en agua caliente presurizada mostró que estos compuestos pueden soportar temperaturas superiores a los 90 °C sin degradación significativa de su estructura. Esta propiedad permite aplicar tratamientos térmicos destinados a la inactivación enzimática, como el calentamiento a 90 °C durante 15 minutos, sin comprometer la integridad ni la funcionalidad del β -glucano extraído. Tal estabilidad es clave para mantener el rendimiento y la calidad del producto final durante procesos de extracción asistidos por enzimas (Benito *et al.*, 2016).

- **Concentración:** Las enzimas y sustratos también influye en la tasa de hidrólisis. En general, un aumento en la concentración de las enzimas o sustratos puede aumentar la velocidad de reacción hasta que se alcance una saturación en la cual ya no hay suficiente sustrato para que todas las enzimas actúen.

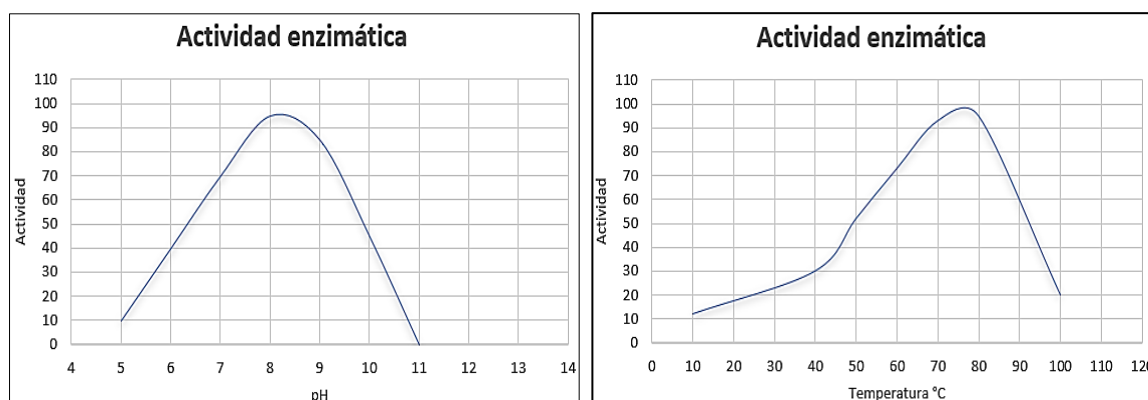
2.1.18 Corolase® 8000

Es una proteasa alcalina termotolerante, producida por fermentación de *Trichoderma reesei*, diseñada para hidrólisis de proteínas vegetales y animales en condiciones alcalinas (pH 6.0-10.0) y temperaturas de hasta 100 °C (AB Enzymes, 2024), como se puede observar en la Figura 12. Según su ficha técnica (Apéndice A3), su actividad endopeptidásica permite aplicaciones en la hidrólisis de gluten, soja, gelatina, y proteínas lácteas, con dosificaciones óptimas entre 0.1-2.0% del contenido enzimático. En la Figura 12, se evidencian que su actividad catalítica máxima se alcanza en pH alcalinos (8-9) y temperaturas moderadas (60-80 °C), mostrando una reducción significativa fuera de estos rangos. Su cumplimiento con estándares FAO/WHO/JECFA y su formulación líquida (densidad ~1.10 g/ml) lo posicionan como una herramienta eficiente en procesos industriales sostenibles, aunque requiere almacenamiento a <10 °C para preservar su estabilidad (AB Enzymes, 2024).

A continuación, se presenta la Figura 12, de la actividad catalítica de la enzima Corolase 8000.

Figura 12.

Actividad enzimática de Corolase® 8000



Fuente: AB Enzymes, 2024.

2.1.19 Determinación de β -glucanos según métodos oficiales de análisis

Método AOAC 995.16: Este método es un procedimiento enzimático-espectrofotométrico diseñado para cuantificar β -glucanos solubles en cereales (avena, cebada) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), basado en la hidrólisis específica de enlaces β -glucosídicos y la medición de glucosa liberada (AOAC, 1995).

a) Digestión Enzimática

- **Extracción de β -glucanos:** Muestra de cereales (harina de avena/cebada) o levaduras se suspende en buffer fosfato (pH 6.5) y Calentamiento a 100°C (o punto de ebullición) para inactivar enzimas endógenas.
- **Hidrólisis con Liquenasa (β -1,3-1,4-1,6-glucanasa):** La liquenasa rompe los enlaces β -1,4 y β -1,6 en secuencias alternas con β -1,3, liberando oligosacáridos (McCleary y Mugford, 2007).
- **Hidrólisis con β -Glucosidasa:** Convierte oligosacáridos en glucosa libre.

b) Determinación por Espectrofotometría (GOPOD)

- **Reactivo GOPOD** (Glucosa Oxidasa/Peroxidasa): La glucosa oxidasa oxida glucosa a gluconolactona + H₂O₂. La peroxidasa reacciona con H₂O₂ + 4-aminoantipirina, generando un cromógeno rojo claro con tendencia a color rosa ($\lambda = 510$ nm).
- **Cálculo:** La absorbancia se correlaciona con la concentración de glucosa usando una curva estándar.

Método AACCI 32-23.01: Este método cuantifica β -glucanos como parte de la fibra dietética total, combinando digestión enzimática, precipitación y determinación por Espectrofotometría GOPOD y HPLC (AACCI, 2023).

a) Digestión Enzimática Secuencial

Degradación de Proteínas: Uso de proteasas a pH 6 – 10.

Degradación de Almidón: α -Amilasa y para eliminar interferentes.

Precipitación de Fibra Soluble: Adición de etanol al 78% para aislar β -glucanos.

b) Hidrólisis y determinación

Hidrólisis con β -Glucanasas: Similar a AOAC 995.16, pero incluye precipitación previa.

Espectrofotometría GOPOD o HPLC: GOPOD: Igual que AOAC 995.16. y HPLC: Alternativa para matrices complejas.

Tabla 4.

Comparación de características de los métodos

Característica	AOAC 995.16	AACCI 32-23.01
Objetivo	β -Glucanos específicos en cereales y levadura.	Fibra dietética total (incluye β -glucanos).
Enzimas Clave	Liquenasa + β -glucosidasa.	Proteasas + amilasas + β -glucanasas.
Precipitación	No aplica.	Etanol 78% para fibra soluble.
Ph	6.5	8.2
Técnica Final	Solo espectrofotometría GOPOD.	GOPOD o HPLC.
Conclusión	Ideal para análisis directo de β -glucanos en cereales y levadura.	Mas completo para alimentos complejos con fibra mixta

Fuente: AOAC International, (1995) y AACC International, (2000).

2.1.20 Escalonamiento de procesos: laboratorio, piloto e industrial

El escalonamiento de procesos es clave en ingeniería de procesos para trasladar tecnologías validadas en laboratorio hacia la producción industrial. Implica una transición progresiva en complejidad, capacidad operativa y control de variables (Towler y Sinnott, 2013). En laboratorio, se trabaja con volúmenes pequeños (100 mL a 5 L) para optimizar parámetros como pH, temperatura y concentración enzimática. La planta piloto, con volúmenes entre 50 y 1000 L, valida la reproducibilidad y estima el rendimiento y los costos. La escala industrial (>5,000 L) permite la producción continua con automatización y control de calidad, como se observa en la Tabla 5 de las características comparativas de escalonamiento de procesos (Montgomery y Carlberg, 2021).

Tabla 5.

Características comparativas de escalonamiento de procesos

Escala	Volumen tratado	Objetivo principal	Equipos característicos	Aspectos clave
Laboratorio	0.1 – 5 L	Optimización de parámetros y comprobación técnica	Agitadores, incubadoras, espectrofotómetro, pH-metro	Control preciso, bajo riesgo, bajo costo.
Planta piloto	20–1000 L	Validación operativa y estimación de rendimiento escalado	Biorreactores, reactores de tanque agitado, sensores	Reproducibilidad, estabilidad, análisis económico.
Planta industrial	>5,000 L	Producción continua a gran escala	Biorreactores industriales, CIP, PLCs	Automatización, control de calidad, eficiencia.

Fuente: Sinnott, (2005)

2.2 Marco conceptual

2.2.1 Economía circular

Es una gestión eficiente y prolongada de los recursos, priorizando su reutilización, reciclaje y valorización. Su objetivo es maximizar el valor agregado durante el ciclo de vida útil de los materiales. Este enfoque reduce la dependencia de insumos vírgenes y disminuye los residuos. Además, impulsa soluciones sostenibles con beneficios ambientales, sociales y económicos (OMS, 2018).

2.2.2 Cerveza

Es una bebida alcohólica de origen fermentativo que se obtiene a partir de la fermentación alcohólica, el mosto elaborado principalmente con malta de cebada, agua y lúpulo, utilizando cepas específicas de levaduras, usualmente *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces pastorianus*. Este proceso microbiológico transforma los azúcares del mosto en etanol y compuestos secundarios que contribuyen al perfil sensorial y nutricional del producto final (Berger *et al.*, 2005).

2.2.3 Industria cervecera

Es aquella dedicada a la producción, distribución y comercialización de cerveza. Comprende todas las etapas involucradas en el proceso de elaboración de cerveza, la obtención de materias primas como granos malteados y lúpulo, finalmente el embotellado o envasado y la venta al consumidor final (Boulton *et al.*, 2017).

2.2.4 Residuos

Se denomina residuo a materiales, sustancias o productos que se consideran no deseados o desechados y que pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos. Estos materiales

pueden provenir de actividades domésticas, industriales, comerciales o agrícolas (Hettiarachchi, 2018).

2.2.5 Residuos líquido en la producción de la cerveza

Se refiere a los residuos líquidos que se generan durante la etapa de la fermentación de cerveza, compuesto de levadura, agua, restos de malta y otros. Estos residuos pueden tratarse como valiosos y no necesariamente como desechos. Con la gestión adecuada, pueden tener beneficios económicos y sostenibles en la investigación y los bioprocesos innovadores en este campo de la producción de cerveza (Colchado, 2023).

2.2.6 Levadura gastada

Subproducto de la industria cervecera que pierde su capacidad fermentativa tras convertir los azúcares en etanol y CO₂. Esta biomasa, rica en β -glucanos, proteínas y compuestos bioactivos, es una materia prima de alto potencial para obtener ingredientes funcionales (Briggs *et al.*, 2004).

2.2.7 Enzimas

Las enzimas son biocatalizadores compuestos principalmente por proteínas, aunque algunas contienen cofactores no proteicos, como iones metálicos o coenzimas. Su función es acelerar reacciones bioquímicas sin consumirse en el proceso (Berg *et al.*, 2018).

2.2.8 Proteasas

Enzimas proteolíticas destacan por su capacidad de catalizar la ruptura de enlaces peptídicos en las proteínas, transformándolas en péptidos más pequeños o aminoácidos, como los β -glucanos asociados a matrices celulares (Lodish *et al.*, 2021).

2.2.9 Hidrólisis enzimática

Es un proceso bioquímico mediante el cual enzimas específicas catalizan la ruptura de enlaces químicos de macromoléculas, utilizando agua como reactivo. Esta reacción permite descomponer compuestos complejos en unidades más simples, como oligómeros o monómeros (Berg, 2018).

2.2.10 Espectrofotómetro

Mide la absorción o transmisión de la luz por una sustancia en función de la longitud de onda, permitiendo determinar los compuestos de la solución. Se basa en la ley de Beer-Lambert, que relaciona la absorción con la concentración de la muestra (Skoog *et al.*, 2018).

2.3 Antecedentes

Hernández, (2023). En esta investigación, se exploró la extracción de β -glucanos a partir de levadura agotada de cerveza (LAC) utilizando métodos innovadores como la extracción enzimática asistida por microondas (MWE) y por ultrasonido (USE). Los tratamientos se diseñaron para maximizar la obtención de carbohidratos solubles. El tratamiento MWE, seguido de una hidrólisis proteolítica, logró un rendimiento total de extracción de carbohidratos solubles del 72.3 ± 1.5 %. Además, se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos, encontrando que el extracto obtenido mediante MWE alcanzó una inhibición de hemólisis del 88.9 ± 0.3 %, sugiriendo su potencial como producto natural antiinflamatorio.

Valerio *et al.*, (2023). Se evaluó el impacto de la temperatura, el tiempo y la concentración de enzima en el grado de hidrólisis y el nivel de amargor de hidrolizados obtenidos a partir de anchoveta (*Engraulis ringens*). Se empleó anchoveta eviscerada y sin

cabeza, piel ni cola, sometiénola a dos etapas de hidrólisis enzimática mediante el método de superficie de respuesta. Inicialmente, se utilizó la enzima Corolase 8000, optimizando el proceso a 60.1 °C, 93.4 minutos y 1.68 % de enzima, lo que permitió alcanzar un grado de hidrólisis del 12.8 %. Posteriormente, con la enzima Corolase 7089, se logró maximizar el grado de hidrólisis al 14.8 % y reducir el nivel de amargor a 3.8, operando a 49.1 °C, durante 54.3 minutos y con una concentración enzimática de 0.472 %. Los modelos matemáticos obtenidos pueden ser aplicados para estandarizar el proceso, ajustando el grado de hidrólisis y el nivel de amargor según el objetivo deseado.

Vaithanomsat *et al.*, (2022). Este estudio evaluó la funcionalidad de los β -glucanos extraídos de la levadura *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925 mediante procesos alcalinos y enzimáticos. Los resultados indicaron que la recuperación de β -glucanos fue del 35.45% utilizando NaOH 1 M a 90 °C durante 1 hora, y del 81.15% empleando una enzima proteasa hidrolítica al 1% (p/v) a 55 °C durante 5 horas. Sin embargo, los β -glucanos obtenidos mediante el proceso alcalino presentaron una mayor pureza, confirmada mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y resonancia magnética nuclear (RMN). Estos hallazgos sugieren que el proceso alcalino podría ser eficaz para la solubilización y recuperación de β -glucanos de alta pureza a partir de células de levadura.

Gautério *et al.*, (2022). Evaluaron métodos de extracción de β -glucanos a partir de levadura cervecera gastada (*Saccharomyces cerevisiae*), con el fin de optimizar su recuperación como ingrediente alimentario tecnofuncional. Compararon técnicas de disrupción celular, incluyendo tratamientos enzimáticos, mecánicos (ultrasonido) y combinados. La revisión analizó variables como tiempo, temperatura, concentración enzimática y potencia del ultrasonido. Los resultados mostraron que la hidrólisis enzimática ofrece buena eficiencia y mantiene la integridad del polisacárido, pero el mejor rendimiento

(72,06 %) se logró con el método combinado de ultrasonido (28,9 W/g) seguido de tratamiento enzimático. Este estudio destaca el potencial de estrategias integradas para valorizar residuos cerveceros y fomentar su aplicación en productos funcionales.

Yuan *et al.*, (2022) investigaron la hidrólisis enzimática de β -glucanos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) asistida por ultrasonido, utilizando β -glucanasa como catalizador. El objetivo fue mejorar la solubilización y funcionalidad del polisacárido. En su metodología, combinaron el tratamiento enzimático con ultrasonido de alta frecuencia, evaluando tanto los cambios químicos como microestructurales del β -glucano extraído. Como resultado el tratamiento combinado alcanzó una solubilidad del 75,4 % y mejoró notablemente las propiedades antioxidantes del compuesto. Estos resultados demuestran la eficacia del ultrasonido como tecnología de intensificación de procesos para mejorar la eficiencia de extracción y la calidad funcional del β -glucano, favoreciendo su aplicación en productos funcionales y nutraceuticos.

Piermaria *et al.*, (2021). En este trabajo, se abordó la caracterización estructural de β -glucanos extraídos de las paredes celulares de levaduras cerveceras, específicamente *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). La investigación destacó que las paredes celulares de estas levaduras contienen aproximadamente un 40% de β -glucanos, polímeros con alto potencial para ser utilizados como aditivos funcionales en alimentos debido a su actividad prebiótica. La caracterización estructural mediante ATR-FTIR permitió identificar las características moleculares de los β -glucanos extraídos, lo que es fundamental para su aplicación en la industria alimentaria.

Romero, (2021). En este estudio se utilizó el diseño experimental de Box-Behnken para optimizar la extracción de β -glucanos de levadura, identificando las condiciones

óptimas que permitieron una recuperación del 68% de los β -glucanos. Las condiciones óptimas fueron una concentración enzimática del 1,5% (p/p), una temperatura de 37°C, un pH de 6,3 y un tiempo de hidrólisis de 6 horas.

Guarín y Sastoque (2019). En esta investigación, se evaluó la extracción de β -glucanos a partir de residuos de levadura generados durante la producción de cerveza, utilizando una metodología ácido-base. Se variaron factores como el tipo de ácido en la hidrólisis, el tiempo de incubación en la autólisis y los métodos de secado. Los resultados indicaron que un tiempo de incubación de 72 horas, el uso de ácido clorhídrico en la hidrólisis y el secado al aire fueron las condiciones óptimas para determinar β -glucanos con mayor pureza y rendimiento.

Tian *et al.*, (2019). Evaluaron la eficiencia de extracción de β -glucanos a partir de levadura cervecera gastada mediante un tratamiento combinado de tipo alcalino y alta presión (ATHP, por sus siglas en inglés). El estudio utilizó *Saccharomyces cerevisiae* como fuente, sometiendo la biomasa a dos ciclos de homogeneización a alta presión (hasta 1700 bar) para facilitar la ruptura celular, seguido de un tratamiento con solución alcalina de NaOH al 0,85 %, a 108 °C durante 5 minutos, con una relación líquido-sólido de 6,5:1. Este enfoque combinado permitió una disrupción eficiente de la pared celular, incrementando el área de contacto y facilitando la liberación de los β -glucanos. Los análisis mostraron un contenido de β -glucanos del 78,11 % y un rendimiento de extracción de 78,38 %, confirmados mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), que evidenció estructuras ramificadas β -(1,3) y β -(1,6), asociadas a un alto grado de pureza. Además, al comparar con técnicas que emplean únicamente alta presión, se concluyó que la adición del tratamiento alcalino fue esencial para eliminar impurezas y extraer un extracto más limpio y funcional.

Tâm et al. (2013). Investigaron la extracción de β -glucanos a partir de residuos de levadura cervecera (*Saccharomyces cerevisiae*), desarrollando un estudio comparativo de cuatro métodos: autólisis, tratamiento enzimático, ultrasonido y un enfoque combinado (enzimas + ultrasonido). Los autores evaluaron parámetros clave como temperatura, tiempo de reacción y concentración de enzimas, determinando que la hidrólisis enzimática fue la técnica más efectiva para maximizar el rendimiento de β -glucanos. Además, demostraron que el método combinado (ultrasonido a 28.9 W/g + enzimas) logró un rendimiento máximo de autólisis celular del 72.06%, superando significativamente a los otros métodos. Este estudio resalta el potencial de las estrategias multimodales para la valorización de subproductos industriales.

Marinescu et al., (2010) Evaluaron el estudio comparativo de los métodos de determinación de β -glucanos en levadura de cerveza gastada. Se evaluaron 3 métodos, el enzimático con el kit de β -glucanos de levadura de la variedad “K-YBGL”, el ensayo del contenido de β -glucanos por sustracción de la glucosa total de la glucosa obtenida del glucógeno y la identificación de la fibra dietética de levadura por el método AOAC modificado. Para la cual el β -glucanos de levadura se preparó mediante autólisis de levadura a 50 °C durante 24 h, 48 h respectivamente y el tratamiento de la pared celular con solución de NaOH 0.1N a 90 °C. Como resultados se ha demostrado que entre el primer y el segundo método hubo menor diferencia de resultados de 0.9 a 1.3%, con respecto al tercer método hubo mejores resultados determinación de β -glucanos.

A partir de este punto, el término “**residuo líquido de la fermentación de cerveza**” será referido simplemente como “**residuo LFC**”, con el fin de evitar redundancias en el desarrollo del texto.

III HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis general

La hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza permite determinar β -glucanos con un rendimiento cuantificable y significativo, en función de la aplicación de condiciones específicas de temperatura, pH y concentración enzimática.

3.1.2 Hipótesis específicas

- El incremento de la temperatura en la hidrólisis enzimática del residuo *LFC*, permite determinar mayor rendimiento de β -glucanos.
- El pH en medio alcalino en la hidrólisis enzimática del residuo *LFC*, permite determinar mayor rendimiento de β -glucanos.
- A medida que se incrementa la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática del residuo *LFC*, se obtiene mejor rendimiento de β -glucanos.

3.2 Identificación de variables e indicadores

En la investigación se considera las siguientes variables y sus indicadores:

3.2.1 Variables independientes (VI)

VI₁: Temperatura de hidrólisis

Indicador: Temperatura [T °C]

VI₂: pH de hidrólisis

Indicador: pH [--]

VI₃: Concentración de enzima

Indicador: Porcentaje de masa [%]

3.2.2 Variables dependientes (VD):

VD: Rendimiento de β -glucanos

Indicador: β -glucanos [g/100g]

Donde: [g/100g]: β -glucanos g/100g de residuo liquido LFC (levadura gastada)

3.3 Operacionalización de variables

Tabla 6.

Operacionalización de las variables.

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Instrumento
Temperatura de hidrólisis (independiente)	Grado de calor involucrado en el proceso de hidrólisis enzimática, que afecta la actividad de la enzima.	Es el valor en °C al que se somete el residuo durante la hidrólisis enzimática.	Temperatura	(°C)	Termómetro
pH de hidrólisis (independiente)	Medida de la acidez o alcalinidad que influye en la estabilidad y eficiencia de la enzima durante el proceso de hidrólisis.	Valor de pH ajustado en el medio de reacción para favorecer la actividad enzimática.	pH	6 - 8	Potenciómetro
Concentración de enzima (independiente)	Proporción de enzima Corolase 8000 utilizada en el proceso, la cual influye en la velocidad de reacción y ruptura celular.	Porcentaje de enzima (p/p) añadida al sistema de hidrólisis.	Concentración	%	Balanza analítica
Rendimiento de β -glucanos (dependiente)	Cantidad de β -glucanos determinados a partir de la levadura gastada como producto de la hidrólisis enzimática.	Cantidad de β -glucanos obtenida, medida mediante espectrofotometría UV-Vis (absorbancia a 510 nm, AOAC 995.16).	Composición funcional extraída	% de rendimiento de β -glucanos	Espectrofot. UV-vis

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación geográfica

El estudio se desarrolló en la ciudad del Cusco, donde se genera el residuo *LFC*, específicamente por parte de la empresa Backus & Johnston S.A.A. – Planta Cusco. Además, se dispone de la infraestructura técnica y científica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), donde se realizó las etapas experimentales del proceso. La investigación es de carácter experimental y se enfoca en el control de variables como temperatura, pH y concentración enzimática para evaluar el rendimiento en la determinación de β -glucanos, facilitando su eventual escalamiento y transferencia tecnológica dentro de la región.

4.2 Ámbito de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), en la ciudad del Cusco, Perú. Se utilizaron diversas instalaciones especializadas, entre ellas los laboratorios de Hidrocarburos y de Tecnología pertenecientes a la Escuela Profesional de Ingeniería Química, así como el laboratorio de Química Analítica Cuantitativa de la Escuela Profesional de Ciencias Químicas. Estos laboratorios contaron con los equipos, materiales, reactivos y condiciones básicas necesarias para llevar a cabo los experimentos de hidrólisis enzimática y análisis de β -glucanos.

4.3 Tipo y nivel de investigación

La presente investigación es de tipo aplicada, ya que busca generar conocimiento científico orientado a la solución de un problema práctico, mediante el estudio controlado en laboratorio de la hidrólisis enzimática del residuo líquido *LFC* para la determinación de

β -glucanos. Asimismo, también se considera de tipo experimental, dado que se manipulan deliberadamente las variables independientes: temperatura, pH y concentración de la enzima Corolase® 8000, con el fin de observar su efecto sobre el rendimiento del proceso. En cuanto al nivel, la investigación es de carácter correlacional, ya que se analiza la relación entre dichas variables y el rendimiento de β -glucanos. Finalmente, se clasifica como una investigación de corte transversal, puesto que la recolección de datos se realiza en un solo momento o periodo específico.

4.4 Población de estudio

El estudio está conformado por el residuo líquido *LFC* proveniente de los decantadores cónicos de levadura gastada de la empresa Backus y Johnston S.A.A. – Planta Cusco, donde se acumulan más de 10 m³ cada 2 días. Este residuo líquido presenta variabilidad en su composición, al no estar sometido a condiciones industriales estables ni parámetros controlados. Por ello, no se trabajó con muestras a escala industrial, sino con cantidades mínimas y definidas del residuo preparadas en laboratorio, bajo un enfoque cuantitativo y experimental. Esta estrategia permitió realizar mediciones precisas y reproducibles de las variables que influyen en la determinación de β -glucanos mediante hidrólisis enzimática.

4.5 Unidad de análisis

Las células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) presentes en el residuo *LFC* constituyen la unidad de análisis de esta investigación, la cual se centró en la determinación de β -glucanos a partir de dicho subproducto, mediante el proceso de hidrólisis enzimática asistida con la enzima Corolase® 8000. Durante este proceso se evaluaron sistemáticamente los parámetros críticos de operación: temperatura, pH y concentración enzimática, con el

objetivo de determinar las condiciones óptimas que permitieran maximizar el rendimiento de β -glucanos. Este enfoque permitió analizar el efecto individual y combinado de cada variable sobre la cantidad de β -glucanos liberados desde las paredes celulares.

4.6 Diseño experimental

Se empleó un diseño factorial completo de 2^3 , correspondiente a 8 tratamientos, combinando dos niveles para cada uno de los tres factores: temperatura, pH y concentración de enzima. Este diseño es adecuado ya que permite evaluar de manera simultánea los efectos principales de cada factor y sus interacciones, lo cual es esencial en un proceso multifactorial como la hidrólisis enzimática.

El diseño factorial 2^3 representa una estrategia eficiente y sistemática para investigar el comportamiento del sistema con un número reducido de ensayos, en comparación con estudios univariados o diseños más complejos. Al establecer dos niveles por factor (alto y bajo), se puede identificar qué variables tienen un mayor impacto sobre la determinación de β -glucanos, y si existe alguna sinergia o antagonismo entre ellas.

Asimismo, se realizó 3 repeticiones por tratamiento con el objetivo de determinar el rendimiento de β -glucanos, totalizando 24 unidades experimentales, lo que permite aumentar la precisión de los resultados, evaluar la variabilidad experimental y garantizar la validez estadística del análisis.

A continuación, se presenta la Tabla 7, con la codificación de los tratamientos y sus respectivas repeticiones.

Tabla 7.*Diseño experimental*

Tratamiento	Temperatura	pH	Concentración enzimática	Respuesta repetición 1	Respuesta repetición 2	Respuesta repetición 3
1	T1	pH1	C1	R1	R1	R1
2	T1	pH1	C2	R2	R2	R2
3	T1	pH2	C1	R3	R3	R3
4	T1	pH2	C2	R4	R4	R4
5	T2	pH1	C1	R5	R5	R5
6	T2	pH1	C2	R6	R6	R6
7	T2	pH2	C1	R7	R7	R7
8	T2	pH2	C2	R8	R8	R8

4.7 Tipo de muestreo

Dado el enfoque experimental orientado a la determinación de β -glucanos, se empleó un muestreo no probabilístico de tipo intencional o por conveniencia, también conocido como selección subjetiva. Esta decisión respondió a la naturaleza heterogénea del residuo líquido *LFC*, que incluye una fracción importante de levadura gastada suspendida en agua. Las muestras se seleccionaron de forma dirigida, tomando porciones representativas de los fondos de los tanques decantadores (previamente homogenizada) de la planta cervecera, donde se concentra la levadura.

Materias primas

La materia prima utilizada en esta investigación fue el residuo líquido *LFC*, el cual contiene una alta proporción de levadura gastada, subproducto rico en polisacáridos como los β -glucanos. Este residuo fue suministrado por la empresa JMC Soluciones Ambientales S.A.C., responsable de la recolección, transporte y disposición de los residuos líquidos

generados por la planta cervecera Backus & Johnston S.A.A., ubicada en la Av. La Cultura 725, ciudad del Cusco.

Insumos.

En este estudio, se empleó la proteasa comercial Corolase® 8000 (actividad ≥ 300 U/g, suministrada por AB Enzymes; Apéndice A) para hidrolizar las proteínas del residuo *LFC*, optimizando así la liberación de β -glucanos. Su selección se basó en su perfil de pH-temperatura compatible dentro del rango con las condiciones experimentales (60–80°C, pH 6–8), su capacidad para minimizar interferencias en la determinación posterior de polisacáridos y su reconocida eficacia en aplicaciones industriales. Para la determinación específica de los β -glucanos, también se utilizó el kit K-YBGL (Yeast Beta-Glucan Assay Kit) de Megazyme International Ireland Ltd., diseñado para determinar β -glucanos de levadura con enlace β -(1,3) glucano por el método oficial AOAC 995.16.

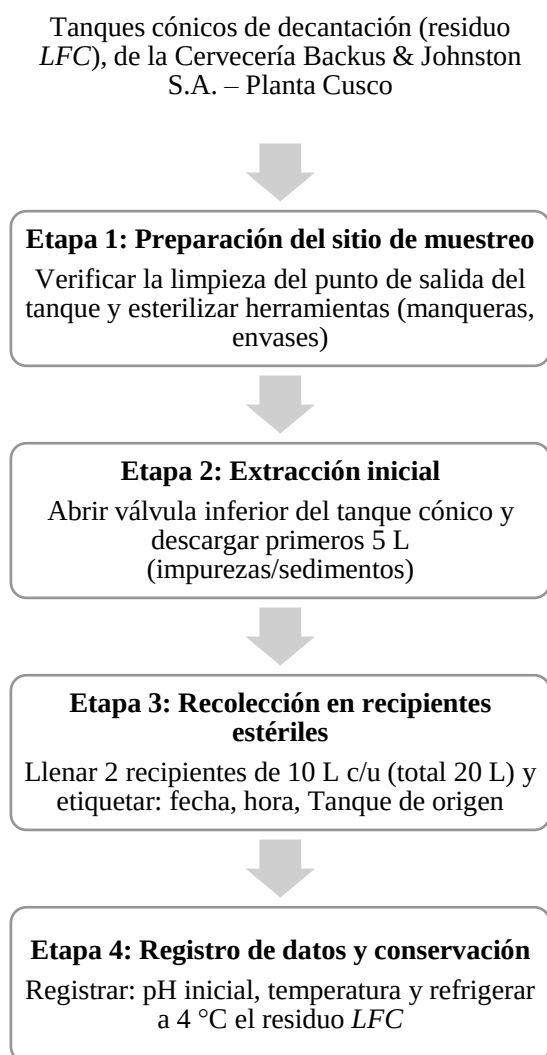
Toma de muestra

La muestra de estudio corresponde al residuo *LFC*, el cual es recolectado directamente del fondo del tanque precipitador de la cervecería Backus & Johnston S.A.A. – Planta Cusco. Se recolectó en dos recipientes estériles de polietileno con capacidad de 10 L cada uno (total 20 L), asegurando condiciones asépticas durante el proceso. La muestra presentó un contenido de humedad inicial del 82.75%, determinado mediante secado a 105°C hasta peso constante. Del volumen total recolectado, se destinaron 12 L (equivalentes a 24 alícuotas de 500 mL cada una) para los procesos posteriores de hidrólisis enzimática, mientras que los 8 L restantes se reservaron para caracterización fisicoquímica, prueba en blanco y como stock de reserva, almacenándose a 4°C para su conservación a corto plazo. La homogeneización inicial se realizó manualmente durante 5 minutos para garantizar la uniformidad de la

muestra antes de su división y procesamiento, como se muestra en la Figura 13, las etapas del proceso de recolección de muestra del residuo *LFC*.

Figura 13.

Etapas de toma y recolección de muestra



Almacenamiento y subdivisión de la muestra: Volumen total recolectado: 20 L (divididos en tres lotes):

- Lote A (12 L): Para hidrólisis enzimática (24 tratamientos × 500 mL) refrigerado a 4°C, ≤7 días.

- Lote B (5 L): Para la caracterización y análisis proximal, refrigeración a 4°C, ≤ 5 días.
- Lote C (3 L): Stock preventivo, congelación a -20°C , ≤ 3 meses.

4.8 Caracterización y análisis proximal del residuo *LFC*

La preparación de las muestras se realizó en dos etapas con el fin de garantizar un adecuado rendimiento. Del lote B (5 L) de residuo *LFC*, en la primera etapa se utilizó 3 litros, sin alteraciones para realizar una caracterización preliminar, donde se determinó el porcentaje de alcohol por destilación simple, el pH mediante potenciómetro calibrado, la temperatura con termómetro digital, el contenido de sólidos totales por gravimetría (105°C hasta peso constante) y la humedad inicial mediante el método AOAC 925.10.

En la segunda etapa del lote B (5 L) del residuo *LFC*, se utilizó el volumen restante (2 litros) para el análisis proximal. Para ello, se prepararon las muestras; primero, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para concentrar el residuo *LFC* (que contiene levadura gastada), asegurando suficiente material para los análisis posteriores. Luego, se realizó una dilución con agua destilada en una proporción 1:3 (g/g) de sólidos:agua, respectivamente, optimizando la separación de componentes. Posteriormente, la suspensión fue nuevamente centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos para recuperar la biomasa de levadura húmeda.

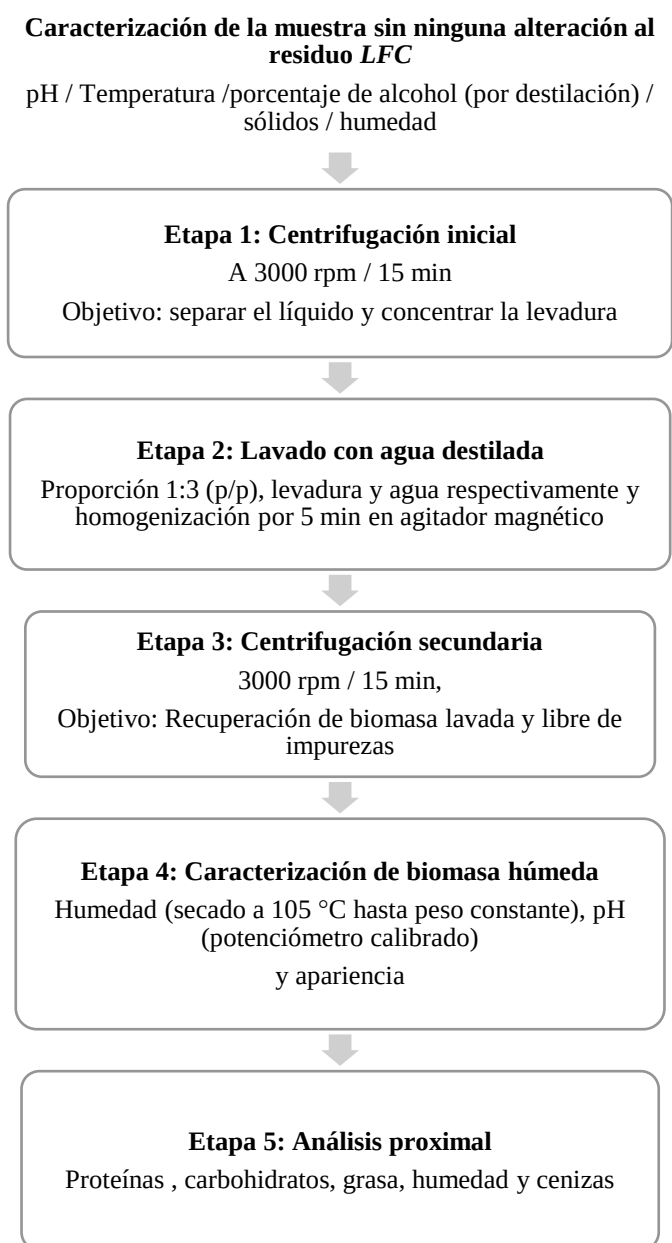
La levadura concentrada obtenida fue caracterizada mediante un análisis químico proximal, con el objetivo de determinar su contenido de proteínas, humedad, cenizas, fibra, carbohidratos y grasas presentes en el residuo *LFC*. Estos análisis se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados, utilizando metodologías estandarizadas

(AOAC 970.22 para proteínas, AOAC 925.10 para humedad, AOAC 945.38 para cenizas, AOAC 978.10 para fibra, AOAC 986.25 para carbohidratos y AOAC 996.06 para grasas).

A continuación, se muestra la Figura 14 de las etapas de preparación de la muestra para la caracterización y análisis proximal del residuo *LFC*.

Figura 14.

Diagrama de flujo de caracterización y análisis proximal.



4.9 Hidrólisis enzimática de residuo *LFC*

1. Preparación y acondicionamiento de las muestras:

a) Subdivisión: El residuo *LFC* previamente filtrado se homogenizó (sin ninguna alteración en su composición), se dividió en alícuotas de 500 mL utilizando envases de 1 L de vidrio graduado (vaso precipitado), permitiendo un 50% de espacio libre para evitar derrames durante la agitación.

b) Desgasificación: Cada alícuota fue sometida a una agitación constante a 60 rpm en equipo de prueba de jarras (Dathan Scientific de 6 unidades por lote) y tiempo mínimo de 15 minutos hasta cese de efervescencia visible

2. Ajuste de condiciones de reacción:

a) Modificación de pH: Se ajusto con NaOH 1M (adición gota a gota) con control continuo por medidor de pH Hanna HI2211 (calibrado con buffers pH 4.01, 7.01 y 10.01). No se utilizó soluciones buffer para la estabilización, porque la hidrólisis se limitó a 2 horas, donde la variación de pH es mínima en la hidrólisis enzimática del residuo *LFC* (McCleary y Mugford, 2007). Rangos establecidos:

Grupo A: pH 5.64 $\rightarrow$ 6.00 (± 0.05)

Grupo B: pH 5.64 $\rightarrow$ 8.00 (± 0.05)

b) Control de temperatura: Se Mantuvo a 60 y 80°C en los diferentes tratamientos, con plancha calefactora IKA RCT basic y monitoreando con termómetros digital TP101 (precisión $\pm 0.2^\circ\text{C}$). Tiempo de estabilización: 5 minutos previos a adición enzimática

3. Proceso de hidrólisis:

a) Dosificación enzimática: Cálculo basado en contenido de sólidos presentes en el residuo *LFC* (como indica el fabricante de la enzima Corolase 8000), el pesado se realizó con balanza analítica Euro Tech:

- Masa de referencia: 62.1 g de sólidos (12.42% de sólidos en 500 mL)
- Rangos de adición: 0.31-1.24 g de enzima (0.5-2%)
- La enzima empleada: Proteasa (Corolase 8000, actividad ≥ 300 U/g)

b) Parámetros operativos:

Tiempo total de reacción: 120 minutos y Agitación constante a 40 rpm (control digital)

4. Finalización del proceso:

a) Finalización de la reacción: Inactivación enzimática a 90°C por 5 minutos y enfriamiento rápido en agua fría (~ 17 °C).

b) Sub división de la muestra hidrolizada: se extrajo un aproximado de 10 ml (en tubo de ensayo con tapa) del tratamiento hidrolizado (previamente homogenizado), suficiente cantidad para su posterior determinación de β -glucanos.

c) Preparación de la muestra hidrolizada: se centrifugo la muestra de 10 ml a 4000 rpm (en tubo de ensayo con tapa) por 15 minutos (suficiente tiempo y velocidad para que precipite todos los sólidos, para su posterior determinación de β -glucanos, según Yuan *et al.*, 2022). Después se obtuvo la masa precipitada con rango de humedad 19,98 a 21,72 %, que varió dependiendo del tipo de tratamiento aplicado.

En la Tabla 8 se presenta el diseño experimental aplicado, con sus respectivos tratamientos y repeticiones.

Tabla 8.

Diseño experimental para la hidrólisis enzimática

Tratamientos	Temperatura (°C)	pH	Enzima (%)	β -glucanos (g/100g)
T1	60	6	0.50	--
	60	6	0.50	--
	60	6	0.50	--
T2	60	6	2.00	--
	60	6	2.00	--
	60	6	2.00	--
T3	60	8	0.50	--
	60	8	0.50	--
	60	8	0.50	--
T4	60	8	2.00	--
	60	8	2.00	--
	60	8	2.00	--
T5	80	6	0.50	--
	80	6	0.50	--
	80	6	0.50	--
T6	80	6	2.00	--
	80	6	2.00	--
	80	6	2.00	--
T7	80	8	0.50	--
	80	8	0.50	--
	80	8	0.50	--
T8	80	8	2.00	--
	80	8	2.00	--
	80	8	2.00	--
Ref. Muestra Sin hidrólisis Enzimática	--	--	0	--

Donde: (g/100 g) se refiere a los gramos de β -glucanos contenidos en 100 gramos del residuo LFC. Ref. Muestra sin hidrólisis enzimática: Sirve para conocer el contenido de β -glucanos antes de la hidrólisis enzimática.

4.9.1 Preparación de los reactivos

Como primer paso se preparó los reactivos del Kit de ensayo β -glucan, se siguió las instrucciones del manual del kit de Megazyme International (Anexo A4) que es complemento para la determinación de β -glucanos.

1. Preparación de la solución 1 (Liquenasa Diluida)

- **Materiales y reactivos necesarios:** Frasco N°1 del kit (liquenasa), Buffer fosfato de sodio 20 mM (pH 6.5), envases de 5 y 20 mL.
- **Procedimiento:** Se disolvió todo el contenido del frasco N°1 en 20.0 mL con buffer fosfato de sodio 20 mM (pH 6.5), se homogenizó suavemente por inversión (10 veces) sin agitación brusca para evitar desnaturalización, luego se subdividió en volúmenes de 5 mL/tubo (para evitar ciclos de congelación-descongelación) y se almacenó el restante a $\leq -10^{\circ}\text{C}$.

2. Preparación de la solución 2 (β -Glucosidasa Diluida)

- **Materiales y reactivos necesarios:** Frasco N°2 del kit (β -glucosidasa), Buffer acetato de sodio 50 mM (pH 4.0), envases de 5 y 20 mL.
- **Procedimiento:** Se disolvió todo el contenido del frasco N°2 en 20.0 mL con buffer acetato de sodio 50 mM (pH 4.0), luego se homogenizo por inversión (5 veces) hasta disolución completa, después se subdividió en volúmenes de 5 mL/tubo y se almacenó el restante a $\leq -10^{\circ}\text{C}$

3. Preparación de la solución 3 (Tampón GOPOD Base)

- **Materiales y reactivos necesarios:** Frasco N°3 reactivo GOPOD (contiene NaN_3 azida de sodio a 0.09% p/v), Agua destilada y matraz aforado de 1 L.
- **Procedimiento:** Se disolvió todo el contenido de la botella de tampón GOPOD en 1 L de agua destilada, después de homogenizó, para después mezclarse con el siguiente reactivo GOPOD y esté estable.

4. Preparación del reactivo GOPOD Final

Materiales y reactivos necesarios: Frasco N° 4 reactivo enzimático GOPOD, frasco de vidrio con tapa (4 ud. de 250ml) y papel aluminio para cubrir el frasco

Procedimiento: Se disolvió el contenido del frasco de reactivo enzimático GOPOD todo en la solución 3, luego se transfirió cuantitativamente a la misma solución 3 (1 L total), después se subdividió en 4 frascos de vidrio con tapa después se ha envuelto con papel aluminio para proteger de la luz (Estabilidad: 6 meses a -10°C).

4.9.2 Determinación de β -glucanos del residuo LFC hidrolizado

Todos los procedimientos en la determinación de β -glucanos se siguió las instrucciones del manual del kit de Megazyme International (Método AOAC 995.16, Apéndice A4). Que también los investigadores Vaithanomsat *et al.* (2022); Gautério *et al.* (2022) y Marinescu *et al.*, (2010), usaron este kit para determinar β -Glucanos en su trabajo de investigación.

1. Preparación de la muestra:

Pesado: Se pesaron de 80–120 mg (Apéndice A4) de residuo *LFC* hidrolizado (previamente centrifugado y el residuo presentó un contenido de humedad entre 19,98 y 21,72 %, el cual varió según el tratamiento aplicado), en tubos de centrífuga de vidrio (16 × 120 mm; capacidad 17 mL con tapa), asegurando que la muestra quedara en el fondo del tubo.

Humidificación: Se agregaron 0.2 mL de etanol acuoso (50% v/v) para facilitar la dispersión.

2. Tratamiento Térmico e Hidrólisis Enzimática

Baño isotérmico: Los tubos con la muestra de levadura hidrolizada del residuo *LFC* se sumergieron en agua hirviendo (aprox. a 90 °C, correspondiente al punto de ebullición en la ciudad del Cusco) durante 60 segundos, y posteriormente fueron agitados en vórtex.

Incubación: A 90°C durante 2 min (con agitación intermedia) y 50°C durante 5 min para equilibrar la temperatura.

a) Primera adición enzimática del kit:

Se agregaron 0.2 mL de solución de liquenasa (previamente diluida según especificaciones del kit K-YBGL, Megazyme) a cada tubo que contenía la muestra suspendida en buffer fosfato (4 mL, 20 mM, pH 6.5).

La incubación fue controlada; los tubos se sellaron para evitar evaporación y se incubaron a 50 °C durante 60 min en un baño María termorregulado, con agitación intermitente cada 15 min en vórtex durante 10 segundos para garantizar homogeneidad.

b) Neutralización y preparación para la segunda hidrólisis del kit

Interrupción de la reacción anterior: Se agregaron 5.0 mL de buffer acetato de sodio (200 mM, pH 4.0) para detener la actividad de la liquenasa. la homogeneización se realizó en vórtex durante 30 segundos, después se dejó en reposo a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 5 min. Luego se centrifugó a 1000 rpm por 10 min.

Distribución de alícuotas: Se distribuyeron con precisión 0.1 mL del sobrenadante a tres tubos de ensayo (12 mL), marcados: para cada tratamiento como reactivo 1 y reactivo 2: Para cada hidrólisis enzimática y Blanco (sin enzima).

Adición enzimática: A los tubos de reacción se añadieron 0.1 mL de β -glucosidasa (diluida según la guía del kit) y al blanco se agregó 0.1 mL de buffer acetato (50 mM, pH 4.0).

Incubación: A $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 10 min (por baño María termorregulado) y una agitación manual suave después de 5 min para evitar sedimentación.

c) **Reacción GOPOD**

Se agregó 3.00 mL de reactivo GOPOD fresco, luego se incubó a 50°C por 20 minutos y después se enfrió a temperatura ambiente por 60 minutos antes de usar

3. Determinación por espectrofotométrica (GOPOD)

Lectura: Se midió la absorbancia a 510 nm (espectrofotómetro UV-Vis, Thermo) dentro de 3° minutos, usando el blanco de reactivo como referencia.

Cálculo de β -Glucanos: Los cálculos de la concentración de β -glucanos en las muestras hidrolizadas se realiza utilizando el software (Excel, con los parámetros de Tabla 9), proporcionado en el kit de ensayos lo que permite automatizar los cálculos y reducir posibles errores en la conversión de la absorbancia a g/100 g de β -glucanos (ver Apéndice A2).

Cálculo de β -glucanos

El rendimiento se realizó de acuerdo a la relación de cantidades determinadas de β -glucanos, por la ecuación matemática (Mixed Linkage, 2023).

$$\text{Glucanos total (+ oligómeros, y otros)} \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{\Delta E \times F}{W \times 90} \quad (1)$$

$$\alpha - \text{Glucanos (+ oligómeros, y otros)} \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{\Delta E \times F}{W \times 9.27} \quad (2)$$

$$\beta\text{-glucanos} \left(\% \frac{w}{w} \right) = \text{glucanos totales} \left(\% \frac{w}{w} \right) - \alpha\text{-Glucanos} \left(\% \frac{w}{w} \right) \quad (3)$$

donde:

ΔE = absorbancia de reacción - absorbancia en blanco

F = factor para convertir la absorbancia a μg de D-glucosa

W = peso de la muestra analizada

También se puede usar la ecuación matemática más detalla planteada por Megazyme, (2018). Para poder cuantificar la concentración de β -glucanos presente en cada una de las muestras analizadas según el valor de absorbancia obtenida.

$$\beta - \text{glucanos} (\% \text{ p p}) = \Delta E * F * \frac{FV}{0,1} * \frac{100}{W} * \frac{1}{1000} * \frac{162}{180} * D \quad (4)$$

Donde, todos los parámetros asociados a la ecuación 4, se muestra en la tabla 9, con su respectiva descripción.

Cálculo matemático del rendimiento de β -glucanos

Para determinar el mejor rendimiento en la determinación de β -glucanos se usó las informaciones que nos proporciona datos científicos de contenido de β -glucanos en la pared celular de la levadura (Tabla 2), el porcentaje de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cereivisae* (Klis y De Groot, 2006) y también el contenido de humedad y carbohidratos en el análisis proximal.

$$\text{Rendimiento (\%)} = (X * H) / Z * 100\% \dots\dots\dots (5)$$

Donde:

X: Contenido de β -glucanos experimental

H: Humedad de la muestra

Z: Contenido de β -glucanos teórico [Z= (25% pared celular) * (45% contenido de β -glucanos) * (----% carbohidratos de la levadura)]

Tabla 9.

Parámetros asociados de la ecuación 4, para determinar los β -glucanos.

Parámetros	Descripción
ΔA	Diferencia de concentraciones de absorbancia con recepto al reactivo blanco.
F	Factor para la conversión de valores de absorbancia a μg de glucosa.
D	100 (μg de D-glucosa) / absorbancia de 100 μg de D-glucosa
FV	Volumen de la muestra a analizar
0.1	Corrección de volumen tomado desde el volumen de la muestra.
$\frac{100}{W}$	Factor para presentar β -glucanos como porcentaje del peso de la muestra.
$\frac{1}{1000}$	Conversión de μg a mg.
W	El peso de la muestra analizada en mg.
$\frac{162}{180}$	Factor responsable de la conversión de D-glucosa libre a D-glucosa anhidro, tal como se produce en los glucanos.

Para el cálculo de conversión de la absorbancia por espectrofotometría UV al contenido de β -Glucanos, se hace el uso del paquete de cálculo en MS Excel (Apéndice A2) proporcionado por el proveedor del β -Glucan Assay Kit (Mixed Linkage, 2023) que permite procesar los datos del ensayo de manera eficiente y precisa. Este software hoja de cálculo contiene fórmulas preestablecidas que minimizan los errores de cálculo, garantizando la correcta interpretación de los resultados. Además, al emplear un método validado por el

fabricante, se facilita la reproducibilidad y comparación de los datos con otros estudios, asegurando el rigor científico del trabajo de investigación.

4.10 Técnicas de análisis e interpretación de datos

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados mediante estadística inferencial, lo que permitió interpretar los efectos de las variables independientes (temperatura, pH y concentración enzimática) sobre el rendimiento de la determinación de β -glucanos. Esta técnica facilita la identificación de diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

Los datos fueron representados a través de tablas, utilizando medidas de tendencia central como el promedio aritmético, la mediana y la media, con el objetivo de identificar el valor central y promedio de la concentración de β -glucanos determinadas en los diferentes tratamientos. Asimismo, se calcularon medidas de dispersión como la desviación estándar y el coeficiente de variación, con el fin de evaluar la consistencia y variabilidad de los resultados. Este tratamiento estadístico permitió una mejor interpretación del comportamiento de las variables de respuesta bajo distintas condiciones experimentales.

En la representación gráfica, se emplearon histograma, gráficos de barras, efectos principales, interacciones de variables, dispersión, de residuos, diagrama de Pareto y bloques de caja para visualizar la distribución de las concentraciones de β -glucanos, así como la presencia de valores atípicos. Estas herramientas gráficas permiten interpretar de manera más clara los datos obtenidos, identificando cómo se distribuye las concentraciones de β -glucanos en función de los distintos niveles de las variables independientes evaluadas, tales como temperatura, pH y concentración de enzima en el proceso de hidrólisis enzimática.

En el análisis de tendencias, se examinó cómo variaron las concentraciones de β -glucanos a medida que cambiaron las condiciones de tratamiento, identificándose patrones claros en los

datos que permitieron determinar las mejores condiciones para su obtención de β -glucanos. Se realizaron comparaciones entre diferentes niveles de las variables independientes, como la temperatura frente a distintas concentraciones de enzima, o el pH en relación con la obtención promedio de β -glucanos, y viceversa. Para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre tratamientos, se aplicaron pruebas t de Student y análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 5 %. El procesamiento y análisis de los datos se realizaron con los programas estadísticos Minitab v21 y MS Excel 2019.

4.11 Técnicas para la comprobación de hipótesis

Para evaluar si existen diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) factorial de tres factores, considerando la interacción entre:

- **Factor A:** Temperatura de hidrólisis (dos niveles)
- **Factor B:** pH de hidrólisis (dos niveles)
- **Factor C:** Concentración de enzima Corolase 8000 en la hidrolisis (dos niveles)

El modelo incluyó también una fuente de variación atribuida al error experimental. El diseño factorial 2^3 con repeticiones permitió evaluar no solo los efectos principales de cada factor, sino también las posibles interacciones dobles (AB, AC, BC) y la triple interacción (ABC). El modelo estadístico general utilizado para el análisis fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

- **Y_{ijkl} :** Valor observado de la variable dependiente (rendimiento de β -glucano)
- **μ :** Media general

- ε_{ijkl} : Error experimental aleatorio, asumido con distribución normal $N(0, \sigma^2)$
- $ijkl \in \{1,2\}$ (nivel bajo 1 y nivel alto 2)

A partir de este enfoque, se plantean las siguientes hipótesis estadísticas para cada efecto:

Hipótesis nula (H_0): Ninguno de los factores (A, B y C), ni sus interacciones tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de β -glucanos mediante hidrólisis enzimática del residuo líquido *LFC*.

$$H_0: \mu_{ijk} = \mu, \text{ para todos los niveles de A (i), B (j) y C (k)}$$

Hipótesis alterna (H_a): Al menos uno de los factores, o una de sus interacciones, tiene un efecto significativo sobre el rendimiento de β -glucanos mediante hidrólisis enzimática del residuo líquido *LFC*.

$$H_a: \mu_{ijk} \neq \mu, \text{ para todos los niveles de A (i), B (j) y C (j)}$$

Para evaluar la validez de las hipótesis planteadas, se empleó el análisis de varianza (ANOVA) como prueba estadística principal, acompañado del análisis del valor p (probabilidad). Si el valor p fue menor que el nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), se consideró que existía suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula (H_0) en favor de la hipótesis alternativa (H_a). Por si el valor p fue mayor que α , no se tuvo evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula. Adicionalmente, cuando el ANOVA resultó significativo, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para identificar cuáles tratamientos presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí.

El nivel de significancia se estableció en 5 % ($\alpha = 0.05$), y se utilizó el siguiente criterio:

- Si $p \leq 0.05$, se rechaza la hipótesis nula (H_0).
- Si $p > 0.05$, no se rechaza la hipótesis nula (H_0).

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del residuo líquido de la fermentación de cerveza.

En la Tabla 10, se muestra los resultados de la caracterización realizada a la materia prima que es el residuo *LFC* (residuo líquido de la fermentación de cerveza). Como dato, se tiene un contenido de sólidos totales de 12.42 % p/p (dentro de los cuales se encuentran las levaduras gastadas, junto con otros sólidos), porcentaje de alcohol 6.08% v/v Gay Lussac, pH de 5.64, contenido de humedad 82.75 % p/p y a la temperatura de 4.60 °C.

Tabla 10.

Caracterización del residuo LFC.

Parámetros	Unidades	Cantidad
pH	--	5.64 ± 0.008
Temperatura	°C	4.60 ± 0.082
Contenido de alcohol	% V/V	6.08 ± 0.016
Solidos totales	% P/P	12.42 ± 0.033
Humedad	% P/P	82.75 ± 0.052

Los resultados presentados en la Tabla 10 muestran que algunas características del residuo LFC se encuentran fuera de los rangos reportados en otros trabajos de investigación, lo cual se debe a la composición variable de este residuo. En términos generales, los sólidos presentes en el residuo líquido de fermentación representan entre el 0.5 y el 10 % en peso, correspondientes principalmente a biomasa sedimentada de *Saccharomyces cerevisiae*, remanente del proceso de fermentación alcohólica (Mussatto *et al.*, 2006). El pH del residuo se encuentra entre 4.10 y 4.6, un rango que contribuye a inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos. Sin embargo, el contenido de alcohol se encuentra entre 1 % y 8 % v/v, lo cual está dentro de los rangos mencionados por otros estudios (Mendoza, 2023).

Asimismo, la Tabla 10 registra un 12.42 % de sólidos totales (compuestos por levadura y otros sólidos) en peso respecto al volumen del residuo LFC, valor que supera al reportado en otros estudios. Este mayor contenido favorece una mayor disponibilidad de levadura, lo que contribuye a un mayor rendimiento de β -glucanos durante el proceso de hidrólisis enzimática del residuo. También el pH es ligeramente mayor a otros estudios realizados, que también favorece a las condiciones del proceso de hidrólisis enzimática. La caracterización del residuo LFC permite determinar el contenido de carbohidratos presentes, lo que contribuye a su evaluación como materia prima para mejorar el rendimiento en la determinación de β -glucanos.

5.2 Análisis proximal del Residuo LFC.

El análisis proximal del residuo LFC, que contiene levadura gastada como principal subproducto. En este sentido, la Tabla 11 presenta los resultados obtenidos del análisis de los sólidos totales, cuyo componente mayoritario corresponde a células de *Saccharomyces cerevisiae*. Las muestras, originalmente en estado húmedo, fueron sometidas a un pretratamiento que incluyó centrifugación para concentrar la biomasa, seguido de lavado con agua destilada para eliminar compuestos solubles no deseados, y finalmente una deshidratación controlada a 65 °C durante 8 horas, en concordancia con el procedimiento reportado por Mejía-Barajas et al. (2016). Como resultado de la caracterización, se obtuvo una composición en base seca de 41.43 g/100 g de proteínas, lo que confirma el alto contenido proteico del residuo, seguido de 35.69 g/100 g de carbohidratos, donde se incluyen los β -glucanos de interés funcional. Asimismo, se registraron 7.11 g/100 g de cenizas, representando el contenido mineral, 4.01 g/100 g de grasas, y 2.27 g/100 g de fibra cruda, asociada a componentes estructurales de la pared celular. El contenido de humedad residual fue de 9.49 g/100 g, adecuado para su conservación y posterior manipulación.

Tabla 11.*Análisis proximal de la levadura gastada*

Composición	Unidades	Cantidad ($\pm s$)
Proteínas	g/100g	41.43 $\pm$ 0.0062
Carbohidratos	g/100g	35.69 $\pm$ 0.0092
Grasas	g/100g	4.01 $\pm$ 0.0081
Fibra cruda	g/100g	2.27 $\pm$ 0.0108
Humedad	g/100g	9.49 $\pm$ 0.0040
Cenizas	g/100g	7.11 $\pm$ 0.0012

Fuente: Laboratorio de servicios de análisis químico - UNSAAC, 2025 (Apéndice B1), ($\pm s$) desviación estándar

Los resultados obtenidos en la Tabla 11, sobre el análisis proximal de la levadura gastada del residuo LFC pueden ser comparados con lo reportado por Perdomo *et al.*, (2004), quienes indican que la levadura presenta una alta proporción de macronutrientes, siendo la proteína el componente mayoritario, con un rango típico entre 35 % y 55 % en base seca. En este estudio, se determina un contenido proteico de 41,43 g/100g, lo que confirma su elevado valor nutricional, característico de las levaduras del género *Saccharomyces*. Asimismo, puede representar una fuente relevante de péptidos bioactivos y aminoácidos esenciales, lo que refuerza su aplicabilidad en el desarrollo de alimentos funcionales.

El contenido de carbohidratos en la levadura gastada fue de 35,69 g/100g, la alta concentración convierte al residuo *LFC* en un excelente beneficio para la determinación de β -glucanos por hidrólisis enzimática, en la Tabla 11 representa una fracción significativa del y esta cantidad supera ligeramente el rango reportado por Perdomo *et al.*, (2004), quienes indican que los carbohidratos en levaduras generalmente se encuentran entre el 20 % y 30 %, incluyendo polisacáridos como los glucanos y mananos. Estos polisacáridos son conocidos por sus propiedades prebióticas, inmunomoduladoras y antioxidantes. En particular, la presencia de β -glucanos en la pared celular de la levadura indica el creciente

interés en su extracción y purificación, dado su potencial como ingrediente funcional o nutracéutico en alimentos con valor agregado (Vetvicka y Vetvickova, 2020). En cuanto al contenido de grasa, el residuo LFC presentó un valor de 4.01 g/100g, sigue siendo relevante desde el punto de vista biotecnológico, este valor se encuentra ligeramente por debajo del rango señalado por Perdomo *et al.*, (2004), quienes reportan un contenido lipídico entre 5 % y 15 % en levaduras. Respecto a la humedad, la levadura deshidratada mostró un contenido de 9.49 g/100g, lo cual, si bien indica una condición “seca”, se considera un valor moderado. De acuerdo con los criterios de almacenamiento, es importante que la humedad se mantenga por debajo del 10 %, ya que valores superiores podrían favorecer el crecimiento microbiano o acelerar la degradación del material durante el almacenamiento (Cáceres, 2022). Finalmente, el contenido de cenizas fue de $7,11 \pm 0,0012$ g/100g, lo que refleja la fracción mineral presente en la muestra, la presencia de estos minerales refuerza el potencial de residuo LFC (Torrente, 2019)

5.3 Datos de la determinación de β -glucanos

Tabla 12.

Datos recolectados en la determinación de β -glucanos

No. Tratamiento	pH	T (°C)	E (%)	H (%)	Absorbancia (<i>Abs</i>)				β glucanos (%p/p)
					Abs (B)	Abs (1)	Abs (2)	Abs (T)	
T1	6.00	60	0.5	20.42	0.003	0.263	0.262	0.260	2.977
	6.00	60	0.5	20.81	0.002	0.255	0.256	0.253	2.984
	6.00	60	0.5	20.65	0.002	0.252	0.253	0.250	2.976
T2	8.00	60	0.5	21.02	0.002	0.283	0.285	0.282	2.985
	8.00	60	0.5	20.92	0.003	0.253	0.252	0.250	2.984
	8.00	60	0.5	21.72	0.002	0.309	0.309	0.307	2.992
T3	6.00	80	0.5	20.17	0.002	0.249	0.247	0.246	3.014
	6.00	80	0.5	20.51	0.002	0.280	0.280	0.278	3.020
	6.00	80	0.5	20.22	0.002	0.261	0.263	0.260	3.001
T4	8.00	80	0.5	20.42	0.003	0.273	0.272	0.270	3.093
	8.00	80	0.5	20.31	0.002	0.271	0.272	0.269	3.080
	8.00	80	0.5	20.52	0.002	0.280	0.281	0.278	3.088
T5	6.00	60	2.0	21.11	0.002	0.397	0.396	0.394	3.646
	6.00	60	2.0	20.91	0.002	0.336	0.336	0.334	3.644
	6.00	60	2.0	20.98	0.003	0.316	0.315	0.313	3.653
T6	8.00	60	2.0	20.63	0.002	0.331	0.332	0.329	3.739
	8.00	60	2.0	19.98	0.002	0.304	0.304	0.302	3.737
	8.00	60	2.0	20.73	0.002	0.368	0.368	0.366	3.739
T7	6.00	80	2.0	20.92	0.003	0.325	0.325	0.322	3.803
	6.00	80	2.0	20.81	0.002	0.321	0.321	0.319	3.802
	6.00	80	2.0	20.96	0.003	0.336	0.336	0.334	3.806
T8	8.00	80	2.0	21.01	0.002	0.363	0.363	0.361	3.819
	8.00	80	2.0	20.88	0.002	0.360	0.360	0.358	3.819
	8.00	80	2.0	20.89	0.002	0.401	0.401	0.399	3.816
Ref. Muestra									
Sin hidrólisis	5.64	20	0	9.48	0.002	0.289	0.289	0.287	2.782
Enzimática									

Donde: (E) enzima, (H) humedad, (Abs B) Absorbancia de patrón blanco, (Abs 1) Absorbancia de la muestra, (Abs 2) Absorbancia de la muestra por duplicado y (Abs T) Absorbancia total de la muestra, (Apéndice B2).

Nota: El resultado de la muestra sin hidrólisis enzimática de 2.782 g (9.48% H), está relacionado a los β -glucanos de los polisacáridos de los granos (cebada y otros cereales) en la elaboración de la cerveza, como restos de residuos contenidos en la muestra. También este dato contribuye para determinar el rendimiento del mejor tratamiento.

La Tabla 12, presenta los datos recolectados durante el desarrollo experimental de la hidrólisis enzimática del residuo *LFC*, con el objetivo de evaluar el rendimiento en la determinación de β -glucanos. Se analizaron ocho tratamientos (T1–T8) bajo distintas combinaciones de pH, temperatura y concentración de enzima, registrando también la humedad del residuo tratado. Se incluyen las lecturas de absorbancia correspondientes al patrón blanco, las réplicas de cada muestra y el promedio total, lo cual permitió calcular el contenido final de β -glucanos por tratamiento.

La muestra de referencia sin someterse a la hidrólisis enzimática, incluida en la Tabla 12, representa el contenido de β -glucanos presente en el residuo *LFC* bajo condiciones naturales, es decir, sin adición de enzima, a temperatura ambiente (20 °C), contenido de humedad (9.48 %) y con el pH propio del residuo. En estas condiciones, se obtuvo un contenido de β -glucanos de 2,782 % (si fuera a la humedad de ~20% como los demás tratamientos se obtendría solo 1.321% de β -glucanos), lo que constituye el valor base frente al cual se comparan los tratamientos aplicados. Esta muestra blanca permite evidenciar que, sin intervención enzimática, la liberación de β -glucanos es limitada.

5.4 Determinación de β glucanos

En la Tabla 13 se reportan las concentraciones de β -glucanos determinadas en los distintos tratamientos (T) aplicados durante la hidrólisis enzimática del residuo *LFC*, evidenciándose diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$, Apéndice B5). Asimismo, se presentan los coeficientes de variabilidad (%) de cada tratamiento, la variabilidad de los datos C.V(%) indican que los coeficientes de variación son bastante bajos en general, indicando buena repetibilidad en los experimentos, observándose que T3 mostró el mayor valor (0.3244), seguido por T4 (0.2193), T2 (0.1413), T1 (0.1403), T5 (0.1302), T7 (0.0500), T8 (0.0451) y T6 con el menor valor (0.0334) que indica una menor variabilidad, lo que

sugiere la alta precisión. Además, se aprecia que los tratamientos T8 y T7 presentan valores similares de β -glucanos, lo cual también se observa entre T2 y T1; Mientras que los tratamientos restantes (T6, T5, T4 y T3) presentan diferencias más marcadas entre sí.

A continuación, se presenta la Tabla 13, que muestra los resultados del análisis de los diferentes tratamientos aplicados para la obtención de β -glucanos a partir del residuo del LFC.

Tabla 13.

Determinación del contenido de β glucanos (% p/p)

Tratamientos	X	$\pm s$	C.V(%)	Dif. Sig. (*)
T8	3.818	0.0017	0.0451	A
T7	3.804	0.0019	0.0500	A
T6	3.738	0.0013	0.0334	B
T5	3.647	0.0048	0.1302	C
T4	3.087	0.0068	0.2193	D
T3	3.011	0.0098	0.3244	E
T2	2.987	0.0042	0.1413	F
T1	2.979	0.0042	0.1403	F

Donde: (x) promedio aritmético, ($\pm s$) desviación estándar, (C.V.) coeficiente de variabilidad (%).

* Indican diferencias significativas, evaluada a través del test de Tukey al 5% de significancia (Apéndice B4).

Las diferencias significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$. Apéndice B5), los tratamientos T8 a T7 forman un grupo estadístico (A), indicando que no hay diferencias significativas entre ellos en cuanto al contenido de β -glucanos. También los tratamientos T2 y T1 forman un grupo diferente (F), con menor contenido de β -glucanos respecto al grupo A y los T6, T5, T4 y T3 son los único que no forman ningún grupo, con un contenido significativamente intermedio que los demás.

También se observa que los tratamientos T8 a T7 tienen los mayores valores de β -glucanos, lo que indica condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de enzima para su obtención. La diferencia significativa entre los grupos sugiere que hay un umbral en las condiciones experimentales donde la hidrólisis enzimática es más eficiente. El tratamiento T1, con el menor contenido de β -glucanos, está en condiciones desfavorables para la hidrólisis, como un pH inadecuado y la baja concentración enzimática, la baja variabilidad en la mayoría de los tratamientos indica que los ensayos fueron reproducibles y confiables.

También en la Tabla 13, del residuo *LFC* contiene cantidades significativas de β -glucanos en sus paredes celulares, con valores promedio que varían según el tratamiento aplicado. El tratamiento T8 presentó la mayor concentración con 3.818 g/100g, seguido por T7 (3.804 g/100g), T6 (3.738 g/100g), T5 (3.647 g/100g), T4 (3.087 g/100g), T3 (3.011 g/100g), T2 (2.987 g/100g) y T1 (2.979g/100g). Los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos reportados en estudios previos sobre la extracción de β -glucanos. Según la literatura, este polisacárido constituye entre el 40 y 45 % del peso de la pared celular de levadura (Vázquez *et al.*, 2019). Con base en los datos del análisis proximal de la levadura cruda (Tabla 11), se determinó que el tratamiento T8 presentó el mayor rendimiento, alcanzando un $76.073\% \pm 0.0092$ de β -glucanos obtenidos mediante hidrólisis enzimática proteica del residuo *LFC*, lo que lo posiciona como la opción más eficiente entre los evaluados. Estos resultados concuerdan con reportes previos, donde los rendimientos de extracción oscilan entre 68 y 72 %, reportados por: Romero, 2021; Hernández, 2023; Tãm *et al.*, 2013 e incluso alcanzan valores máximos de 81.15 % (Vaithanomsat *et al.*, 2022).

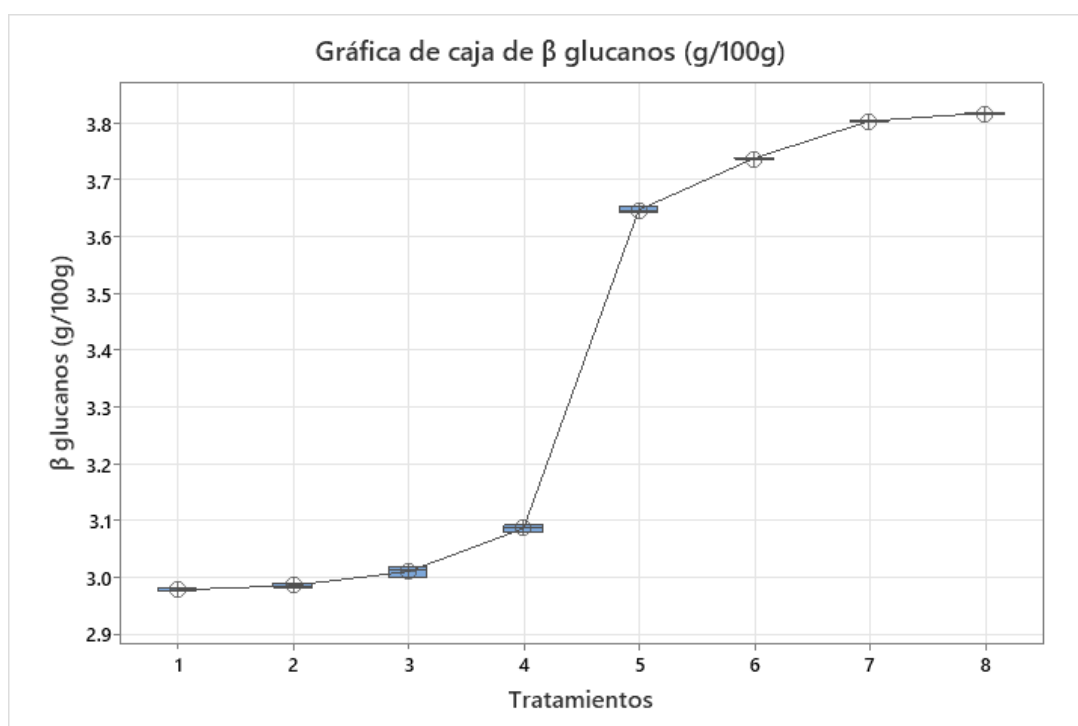
Asimismo, las condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática (pH 8, concentración enzimática del 2% [p/p] y 80°C) influyeron en la eficiencia del proceso. El tratamiento T8 presentó el mayor rendimiento de β -glucanos (3.818 g/100 g de peso seco), cuyos valores se

encuentran dentro de los rangos reportados por Vaithanomsat *et al.* (2022), lo que valida los parámetros empleados en este estudio.

5.4 Análisis de cajas de tratamientos en la determinación de β glucanos

Figura 15.

Bloques de cajas de β -glucanos (g/100g)



La Figura 15, muestra una tendencia general de incremento progresivo en el contenido de β -glucanos conforme se avanza en la serie de tratamientos. Se identificaron tres grupos diferenciados según su rendimiento: (1) tratamientos T1-T4 con bajo rendimiento (2.98-3.09%), (2) tratamiento intermedio T4-T5, y (3) tratamientos T5-T8 con alto rendimiento (3.65-3.82%). El mayor incremento se observó entre T4 y T5 en la concentración de β -glucanos, lo cual responde directamente al cambio en la concentración de enzima Corolase 8000 empleada. Mientras que en el tratamiento T4 se aplicó una concentración de 0.5 %, en el tratamiento T5 esta se incrementó a 2.0 %, lo que representa

una variación de cuatro veces la cantidad de biocatalizador. Este cambio sustancial en la concentración enzimática favorece de manera significativa la hidrólisis de las paredes celulares de la levadura gastada, incrementando la liberación de β -glucanos hacia el medio. El comportamiento observado es consistente con la cinética enzimática, donde un aumento considerable de la enzima, incrementa la velocidad de reacción y la eficiencia en la conversión del sustrato. Esta concentración enzimática es un factor determinante en el rendimiento del proceso. También esta tendencia indica que las condiciones empleadas en los tratamientos superiores (T5-T8) favorecen la hidrólisis enzimática del residuo *LFC*, mejorando la extracción de β -glucanos.

También se observa la baja dispersión en T1, T2, T6, T7 y T8 que indica alta consistencia y estabilidad enzimática, lo que sugiere condiciones óptimas sin desnaturalización ni inhibición. Sin embargo, T3 y T4, muestran mayor dispersión, por una mayor sensibilidad a cambios experimentales o por encontrarse en una fase de eficiencia enzimática intermedia, donde variaciones pequeñas en temperatura o sustrato generan diferencias notables en el rendimiento, propias de una etapa cercana a la saturación parcial de la enzima.

Además, se observa la comparación con la Tabla de Tukey (Tabla 13, de diferencias significativas), con los tratamientos T8 y T7 que están en el grupo A, mostrando las mayores concentraciones de β -glucanos, el T1 fue significativamente menor (grupo F), lo cual es consistente con la gráfica de cajas, que muestra el menor valor y mayor separación del resto de los tratamientos.

Asimismo, en la Figura 15 muestra el rendimiento en la determinación de β -glucanos, es fundamental alcanzar las condiciones de los tratamientos T8 y T7, muestra que la combinación de temperatura alta (80°C) y alta concentración enzimática (2,0%) es la clave

para estos resultados. La consideración de la variabilidad en el aumento de dispersión en T3 sugiere que, aunque el rendimiento es ligeramente alto, puede haber ciertos factores que afectan la estabilidad del proceso.

A continuación, se presenta la Tabla 14, que muestra los resultados del análisis de Test de Tukey, $p < 0.05$; de las diferentes variables aplicadas para la obtención de β -glucanos a partir del residuo del LFC.

Tabla 14.

Determinación de varianza de las variables

Fuente	Valor p
Modelo	0.000
Lineal	0.000
pH	0.000
[E] (%p/p)	0.000
Temperatura (°C)	0.000

Síntesis de los datos del Apéndice B6

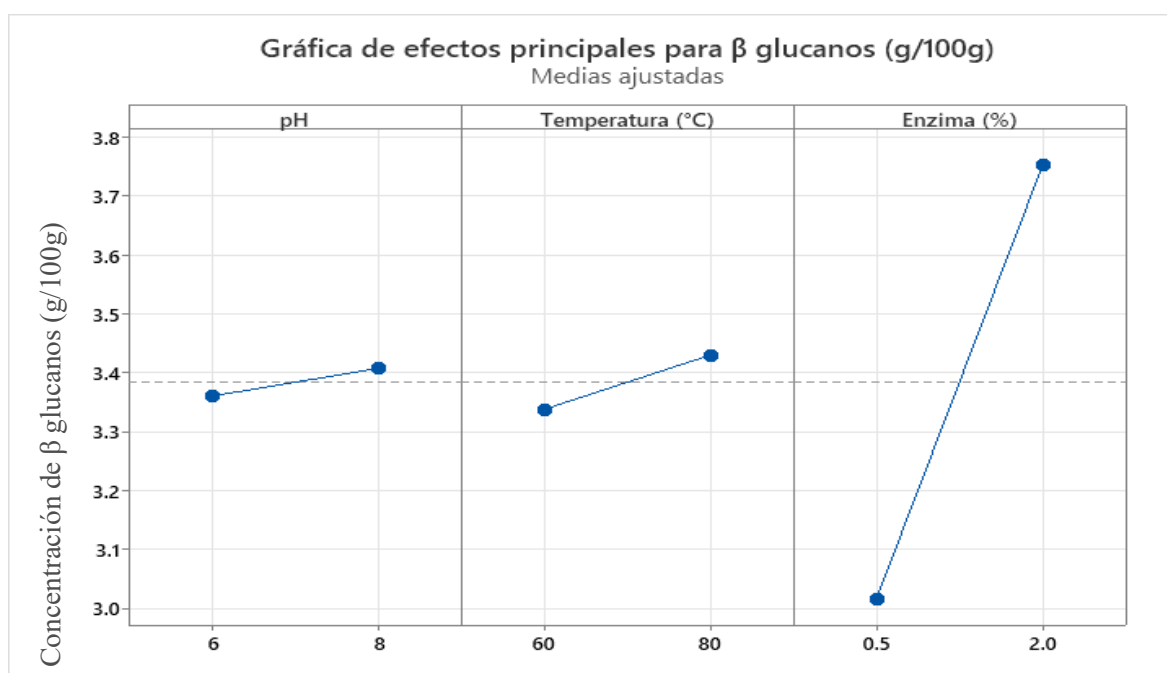
5.5 Análisis de parámetros principales en la determinación de β glucanos

En la siguiente Figura 16, se observa que el pH tuvo un efecto significativo en el rendimiento de β -glucanos (valor $p < 0.05$, Tabla 14), mostrando un incremento en los niveles de β -glucanos a medida que el pH de la hidrólisis enzimática aumenta. Se evidencia un ligero aumento del rendimiento a pH 8, dentro del rango alcalino. De manera similar, la concentración de enzima también presentó un amplio efecto significativo (valor $p < 0.05$, Tabla 14), favoreciendo la obtención de β -glucanos conforme la concentración enzimática se incrementaba y el mayor rendimiento se obtuvo con una concentración de 2,0% de enzima. Asimismo, se aprecia que el aumento de la temperatura también influyó de manera

significativa (valor $p < 0,05$, Tabla 14), mejorando la obtención de β -glucanos. Cabe destacar que todas las evaluaciones se realizaron con un tiempo de reacción de 120 minutos en todos los tratamientos. También en la Figura 16, se muestra la gráfica de efectos de los parámetros principales, en el cual la determinación de β glucanos por la hidrólisis enzimática del residuo *LFC* (que contiene las levaduras), son mayores para las condiciones de pH 8, de temperatura 60° C, y pH 8, temperatura 80° C ambos con la misma concentración de 2.0 % de enzima tal como se observó en la Tabla 11, para los tratamientos T8 y T7; esto se debe a la enzima utilizada que tiene un rango amplio de pH y temperatura en la actividad enzimática. También se conoce que la baja concentración enzimática (0,5%), la conversión de sustrato es menor, ya que la cantidad de sitios activos de la enzima disponibles es limitada y A mayor concentración enzimática (2%), la hidrólisis es más eficiente, lo que justifica el incremento en la producción de β -glucanos (Nelson y Cox, 2021).

Figura 16.

Gráfica de variables principales en la determinación de β glucanos



También en la Figura 16, se observa el efecto del pH un ligero aumento en la media de β -glucanos al pasar de pH 6 a 8, esto sugiere que un pH más alto favorece ligeramente la hidrólisis enzimática y la liberación de β -glucanos. El efecto de la temperatura se nota un aumento moderado en el contenido de β -glucanos cuando la temperatura sube de 60°C a 80°C, esto indica que la enzima podría ser más eficiente. También el efecto de la concentración de enzima, este es el factor con el mayor impacto, ya que al aumentar la concentración de enzima de 0.5% a 2.0%, el contenido de β -glucanos se incrementa de manera considerable. Esto sugiere que una mayor cantidad de enzima específica mejora significativamente la hidrólisis y la determinación de β -glucanos.

5.6 Análisis de interacciones de variables para la determinación de β -glucanos

En la siguiente Figura 17, se observa las interacciones (A) de pH y temperatura, a 60°C (línea azul), el contenido de β -glucanos aumenta ligeramente con el pH, a 80°C (línea roja), también se observa un aumento, pero con valores más altos en general; también se observa que no hay una interacción fuerte (las líneas son casi paralelas), lo que sugiere que estos factores afectan de manera dependiente en la producción de β -glucanos.

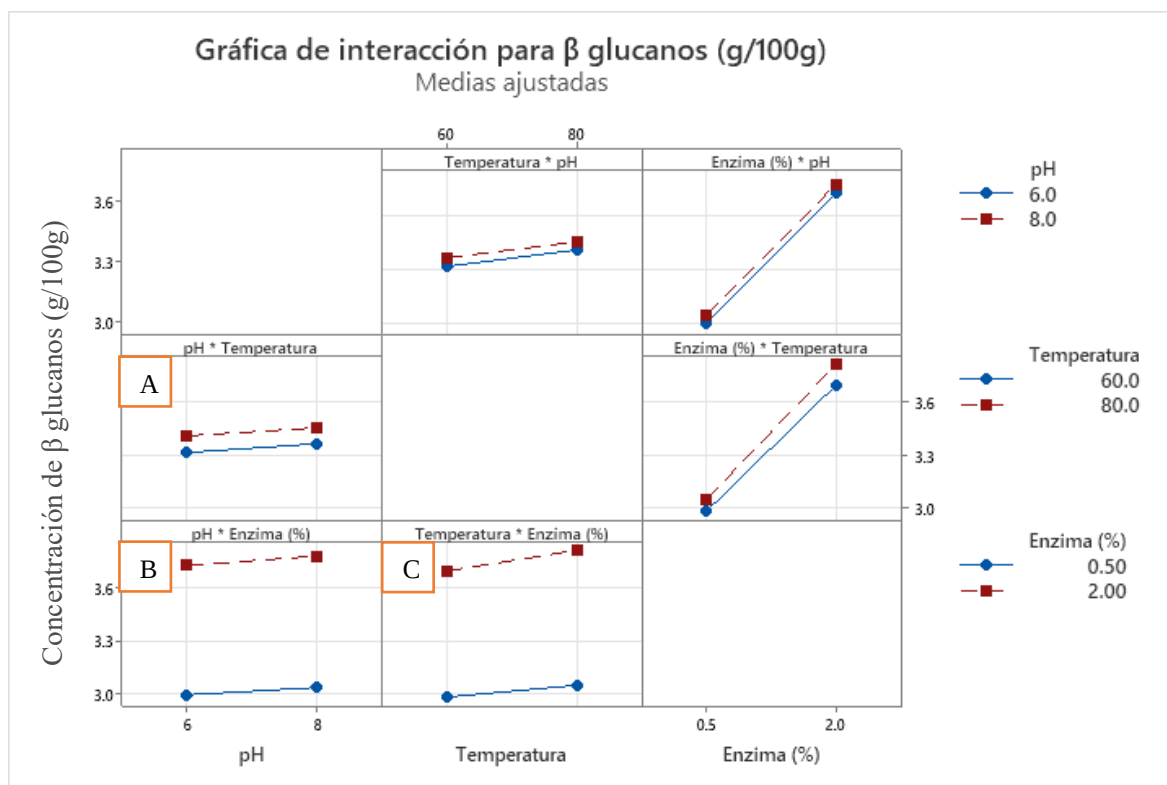
La interacción (B) pH y Enzima (%), para 0,5% de enzima (línea azul), el β -glucanos aumenta con el pH, pero muy poco para 2.0% de enzima (línea roja), también hay un aumento, pero con valores más altos en general. La interacción es débil, lo que indica que el pH no afecta mucho cuando se usa más enzima.

La interacción (C) de la temperatura y enzima (%), a 0,5% de enzima (línea azul), el β -glucanos aumenta con la temperatura y a 2.0% de enzima (línea roja), también hay un aumento, pero con valores más altos en general. En estas variables si hay una interacción

más marcada, ya que el efecto de la temperatura es más notable cuando hay más enzima (mayor sitio activo).

Figura 17.

Interacción de las variables vs β -glucanos



También la interacción muestra cómo las variables independientes de pH, temperatura y concentración de enzima (%) influyen en la media ajustada del contenido de β -glucanos (g/100g) obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática del residuo líquido de LFC. Se observan tanto efectos principales como interacciones entre pares de factores.

El efecto de la concentración de enzima es claramente significativo, mostrando un incremento sustancial en la obtención de β -glucanos al aumentar la dosis de enzima de 0,5% a 2,0%. Esta tendencia se mantiene en todas las combinaciones con pH y temperatura, lo que indica una fuerte dependencia del rendimiento con respecto a la disponibilidad de la enzima.

Respecto al pH, se aprecia un ligero incremento del rendimiento al pasar de pH 6.0 a 8.0, lo cual sugiere que un entorno ligeramente alcalino, la cual favorece la actividad enzimática o la accesibilidad del β -glucanos en la matriz celular de la levadura. Sin embargo, la pendiente de esta variación es menor comparada con la enzima, lo que indica un efecto menos pronunciado. En relación con la Temperatura, se nota un efecto positivo al elevarla de 60 °C a 80 °C, aunque la interacción con la concentración de enzima revela que este incremento es más eficaz a mayor nivel enzimático, lo que apunta a una sinergia entre temperatura y concentración de enzima posible. Este efecto conjunto se refleja en el panel de enzima (%) * Temperatura (°C), donde la pendiente de crecimiento es más pronunciada con la enzima al 2.0%.

En la anterior Figura 17, las interacciones pH*Temperatura y pH*Enzima también sugieren influencias conjuntas, aunque de menor intensidad. En estos casos, las líneas paralelas y de pendiente leve sugieren que no existe una interacción estadísticamente significativa fuerte entre estos factores. En conjunto, también permite observar que la variable más determinante en la obtención de β -glucanos es la concentración de enzima, seguida por la temperatura. Las condiciones óptimas están en el rango de pH 8.0, 80 °C y 2.0% de enzima, alineándose con los tratamientos que reportaron mayores valores de rendimiento, que se muestran en la Tabla 12. Este tipo de análisis visual refuerza los resultados obtenidos en la ANOVA y permite una mejor comprensión de las sinergias entre variables experimentales.

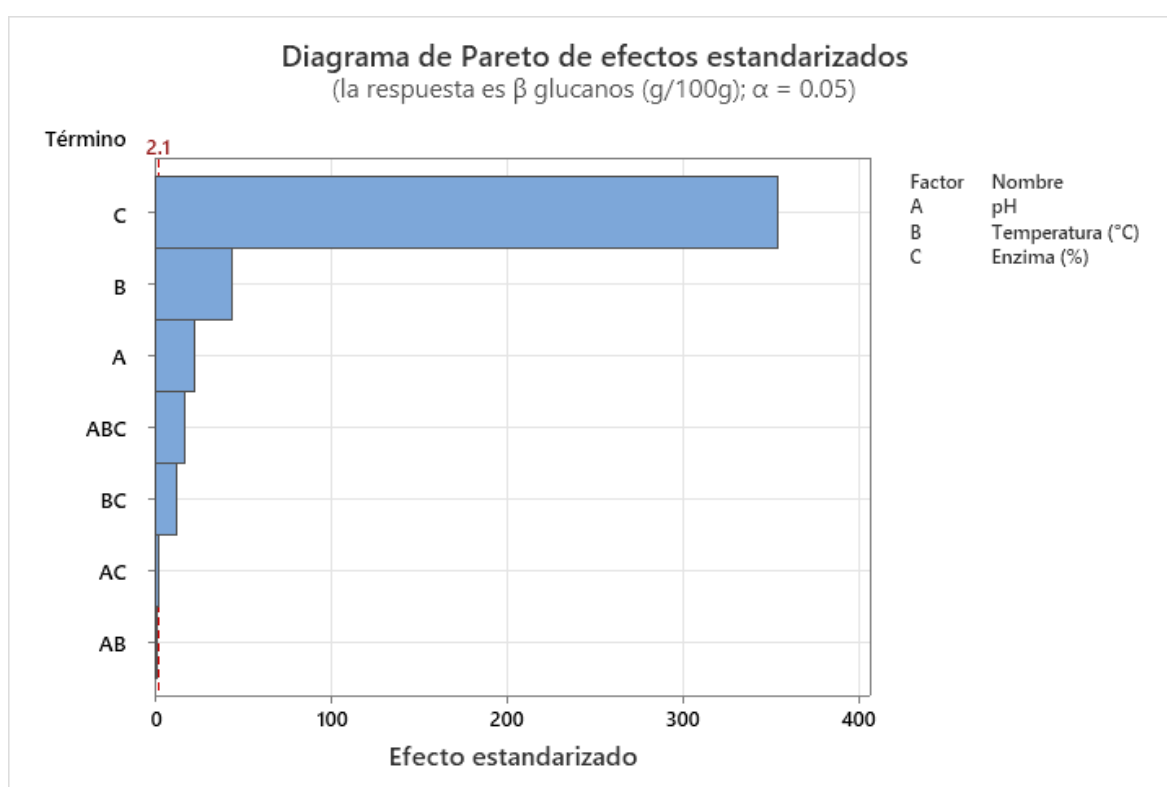
5.7 Análisis de Pareto de efectos principales en la determinación de β glucanos

En la Figura 18, se muestra el diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el análisis de los tratamientos en el rendimiento de la determinación de β -glucanos, que nos permite identificar qué factores tienen un impacto significativo en la respuesta de interés

(Chávez *et al.*, 2024), en el contenido de β -glucanos (% p/p) se muestra las cajas que permite analizar la distribución, dispersión y tendencias en el rendimiento de β glucanos para cada tratamiento, proporcionando una visión clara de la variabilidad y el impacto de los factores estudiados.

Figura 18.

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados



En la Figura 17, se observa la identificación de los factores más importantes, como el factor C (Concentración de enzima [%]) es el más influyente en la determinación de β -glucanos, con un efecto estandarizado muy superior al resto, El factor B (Temperatura [°C]) también tiene un efecto significativo, aunque mucho menor que el de la enzima, el factor A (pH) tiene un impacto mínimo en comparación con C y B, las interacciones entre factores (ABC y BC) tienen efectos pequeños y son significativos y las interacciones entre factores (AB y AC) tienen efectos pequeños y no son significativos, ya que están próximo o por

debajo de la línea de referencia de significancia (Apéndice B6). La concentración de la enzima es el factor determinante para mejorar la producción de β -glucanos, la temperatura tiene un efecto moderado, lo que indica que puede influir en la actividad enzimática, pero no tanto como la cantidad de enzima, el pH tiene un efecto ligeramente significativo, lo que sugiere que, dentro del rango estudiado de pH 6 y 8, la hidrólisis enzimática se ve afectada significativamente y se observan interacciones moderadas, lo que indica que los efectos de cada factor son ligeramente independientes entre sí.

Dando lugar a que el pH tenga efectos significativos en la actividad de la enzima comercial *Corolase 8000* se encuentra en el rango de pH alcalino, producido por la bacteria *trichoderma reesei* genéticamente modificado, este rango de pH también contribuye al inicio de la autólisis de la levadura gastada. Este comportamiento fue observado en la hidrólisis de proteínas de origen vegetal y animal (Vega, 2006 y *COROLASE® 8000*, 2024)

El efecto de la concentración de la enzima muestra una influencia significativa en el proceso, ya que existe un límite a partir del cual aumentar la cantidad de enzima no incrementa la velocidad de reacción, debido a la falta de saturación de los sitios activos del sustrato según Báez *et al.*, (2016). Por otro lado, una concentración enzimática adecuada, combinada con un tiempo de hidrólisis suficiente, favorece que la enzima actúe de manera más efectiva sobre todo el sustrato disponible. Además, el rendimiento de la hidrólisis proteica depende de la combinación óptima de concentración enzimática, temperatura y pH, factores que actúan en conjunto para maximizar la eficiencia del proceso según Romero, (2021).

Los efectos principales de la Figura 16 y la Tabla 13 de Tukey, confirma que la concentración de enzima tuvo el mayor impacto en la producción de β -glucanos, en concordancia con el diagrama de Pareto. Los tratamientos con mayor rendimiento (como

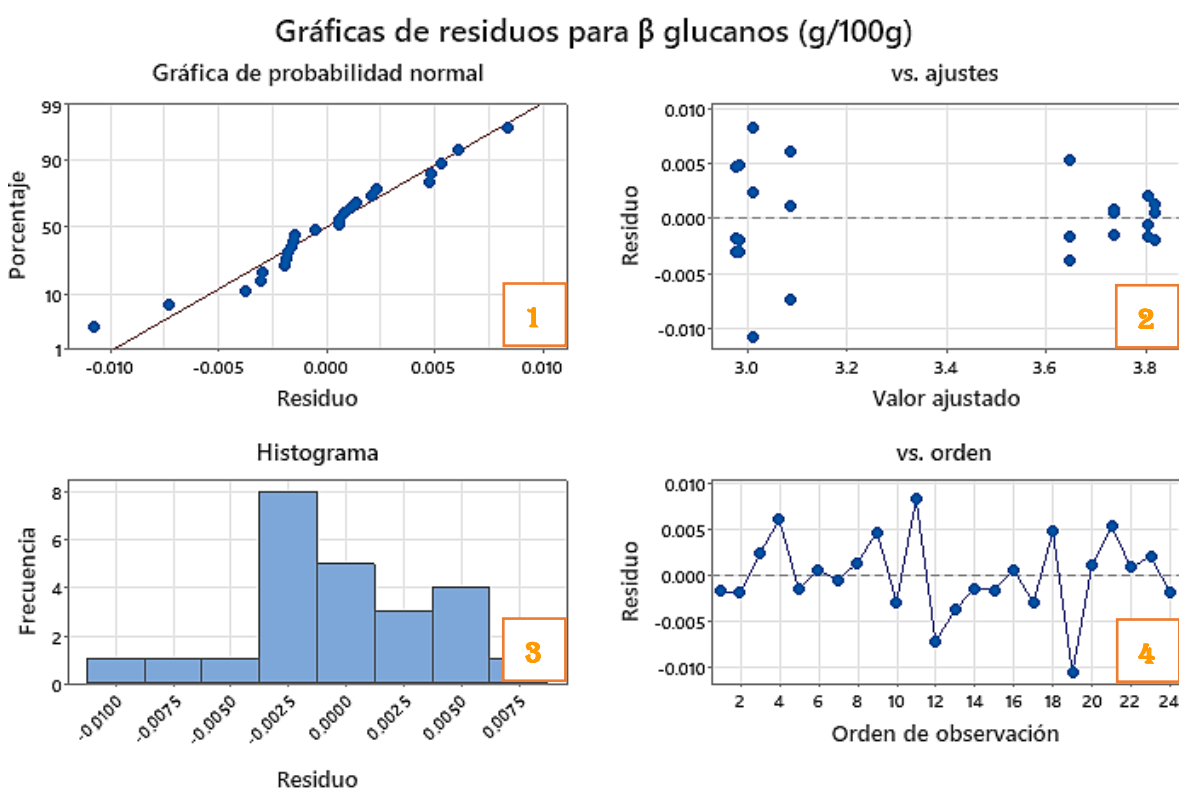
T8) coinciden con altos niveles de enzima y temperatura. El pH mostró una influencia mínima, lo que también se refleja en la Figura 16 y el diagrama de Pareto. La temperatura tiene un efecto relevante pero secundario, mientras que el pH puede ajustarse dentro de un rango sin afectar significativamente el rendimiento. Además, la ausencia de interacciones fuertes permite optimizar cada factor de forma independiente.

5.8 Análisis de residuos para la determinación de β glucanos

En la Figura 19 de las gráficas de los residuos permiten evaluar la validez de los supuestos estadísticos del modelo ajustado. En la gráfica de probabilidad normal (1), los puntos siguen una línea recta, lo que indica que los residuos se distribuyen normalmente, cumpliendo con uno de los supuestos básicos de la regresión.

Figura 19.

Residuos para β glucanos



Los valores ajustados (2), los residuos se distribuyen aleatoriamente alrededor de cero sin un patrón evidente, lo que sugiere homocedasticidad (varianza constante) y la ausencia de errores sistemáticos. Esta aleatoriedad indica que el modelo no presenta sesgo y se ajusta adecuadamente a los datos. El histograma de residuos (3) muestra una distribución aproximadamente simétrica y centrada cerca de cero, reforzando la evidencia de normalidad en los errores. También la gráfica de residuos vs. orden de observación (4) no muestra tendencias o patrones cíclicos, estos gráficos indican que los errores son independientes entre sí.

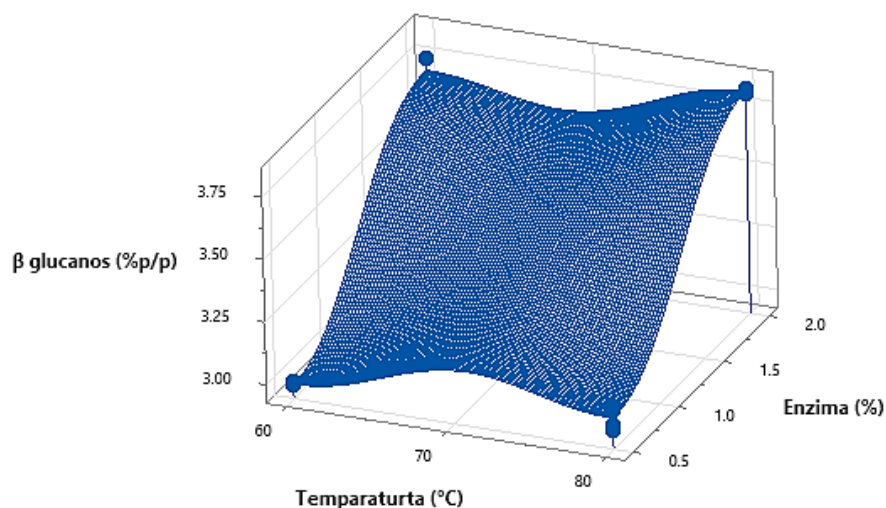
5.9 Rendimiento de β -glucanos

En la Figura 20, se observa el comportamiento de la superficie de respuesta y su impacto en el rendimiento de β -glucanos. Este diseño se basó en las variables con mayor importancia: temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y concentración de enzima (%). El gráfico tridimensional (3D) permite visualizar simultáneamente cómo ambas variables influyen en el rendimiento de β -glucanos durante la hidrólisis enzimática del residuo *LFC*, evidenciando su efecto combinado en el proceso.

El diagrama de 3D de la Figura 20, se observa la superficie que muestra una tendencia ascendente hacia los extremos superiores cuando la temperatura y la concentración de enzima aumentan, se observa una zona de máxima respuesta (mayor rendimiento de β -glucanos) en los valores más altos de temperatura (80°C) y enzima (2.0%), la zona de menor rendimiento se encuentra en la parte inferior izquierda del gráfico, donde la temperatura es más baja (60°C) y la concentración de enzima es mínima (0,5%) y existe una interacción notable entre la temperatura y la concentración de enzima, lo que sugiere que ambas variables deben estar en niveles altos para maximizar el rendimiento de β -glucanos.

Figura 20.

*Gráfico 3D de β -glucanos (%p/p) vs Enzima (%) * Temperatura (°C)*



La baja temperatura limita la eficiencia enzimática, lo que puede deberse a una menor movilidad molecular y a una actividad reducida de la enzima en condiciones subóptimas (Nelson y Cox, 2021). También se observa que el rendimiento de β -glucanos mejora significativamente a temperaturas elevadas (80 °C) y mayor concentración enzimática (2,0%), esto confirma que la enzima es el factor dominante, como ya se observa en el Diagrama de Pareto, donde su efecto estandarizado fue el más alto. La actividad enzimática aumenta con la temperatura hasta cierto límite, mejorando la hidrólisis de la pared celular de la levadura y liberando más β -glucanos, la concentración de enzima del 2.0% asegura una cantidad suficiente de catalizador para acelerar la reacción sin estar limitada por la disponibilidad enzimática, facilitando la acción de la enzima sobre los β -glucanos.

Los β -glucanos constituyen entre el 40-45% del peso de la pared celular de levadura (Vázquez et al., 2019), de 20 a 25% del peso total de la célula de *Saccharomyces cerevisiae* (Klis y De Groot, 2006), la tabla 11 del análisis proximal de contenido de carbohidratos (35.69 ± 0092) y de acuerdo a la ecuación 5 escrita en la metodología, se determina como el

mejor tratamiento T8, que mostró el mayor rendimiento de $76.073\% \pm 0.0092$ mediante hidrólisis enzimática del residuo LFC (Tabla 13), superando los rangos reportados de 68-72% (Romero, 2021; Hernández, 2023; Tãm *et al.*, 2013) y acercándose al máximo de 81.15% (Vaithanomsat *et al.*, 2022). Estos resultados se validan al compararlos con las condiciones óptimas documentadas (75-85°C y 1.5-2.5% de enzima), donde la sinergia temperatura-concentración enzimática resulta crítica para la eficiencia del proceso (Romero, 2021; Valerio *et al.*, 2023; Corolase 8000, 2024).

5.10 Confirmación de la Hipótesis Experimental

La confirmación de la hipótesis experimental, La gráfica de cajas y la gráfica de Pareto son consistente con los resultados estadísticos de Tukey, confirmando que hay diferencias significativas en la producción de β -glucanos entre los tratamientos. Esto respalda la idea de que la combinación óptima de temperatura y concentración de enzima es clave para determinar el máximo rendimiento.

La hipótesis experimental planteada en esta investigación postula que la variación en las condiciones de pH, temperatura y concentración de enzima. tiene un efecto significativo en el rendimiento de obtención de β -glucanos a partir del residuo *LFC* mediante hidrólisis enzimática. Para evaluar esta hipótesis, se analizaron los coeficientes codificados obtenidos en el procesamiento estadístico de los datos experimentales. Los resultados muestran que los efectos individuales de pH ($p = 0.000$), temperatura ($p = 0.000$) y concentración de enzima ($p = 0.000$) presentan valores de $p < 0.05$ (Tabla 14, Apéndice B6), lo que indica que cada una de estas variables tiene una influencia estadísticamente significativa sobre el rendimiento de β -glucanos. En particular, la concentración de enzima muestra el mayor impacto en el rendimiento, con un coeficiente de efecto de concentración de enzima 0.7357, seguido por la temperatura 0.0921 y el pH 0.0471 (Apéndice B6).

Además, se evaluaron las interacciones entre las variables, encontrándose que la interacción pH * Temperatura * Enzima tiene un efecto significativo ($p = 0.0078$), lo que indica que la combinación de estos factores influye en la eficiencia del proceso de hidrólisis enzimática. No obstante, la interacción binaria pH * Temperatura ($p = 0.309$) no fue estadísticamente significativa. En el caso de la interacción pH * Enzima ($p = 0.019$), se observará un efecto ligeramente significativo. Por el contrario, la interacción Temperatura * Enzima ($p = 0.000$) resultó estadísticamente significativa, lo que sugiere que esta combinación de factores tiene un impacto relevante en el rendimiento de β -glucanos, más allá de sus efectos individuales (Apéndice B6).

Dado que la hipótesis nula (H_0) postula que la variación en estas condiciones no afecta significativamente a la determinación de β glucanos, y los resultados experimentales demuestran lo contrario, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa (H_a). Esto confirma que el rendimiento de estas variables es crucial para maximizar la obtención de β -glucanos a partir del residuo *LFC*. Estos hallazgos coinciden con los estudios realizados por los investigadores Yuan *et al.*, (2022); Hernández, (2023); Gautério *et al.*, (2022); Yuan *et al.*, (2022) y Vaithanomsat *et al.* (2022) quienes reportaron un aumento en el rendimiento de β -glucanos bajo condiciones óptimas de pH alcalino, temperatura elevada y concentración adecuada de enzima. Asimismo, el presente estudio aporta nueva evidencia al demostrar que la interacción simultánea de los tres factores puede optimizar aún más el proceso, destacando la importancia de la selección de condiciones adecuadas para maximizar la eficiencia de la hidrólisis enzimática. También Esta investigación no solo permitió encontrar las condiciones del proceso de hidrólisis enzimática del residuo *LFC* a nivel de laboratorio, también la viabilidad técnica para el escalonamiento a planta piloto e industrial, utilizando parámetros de operación moderados y técnicamente accesibles como temperatura, pH y concentración enzimática.

Conclusiones

- Se determinó el máximo rendimiento de $76.07 \% \pm 0.0092$, equivalente a 3.818 g de β -glucanos, bajo las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza a pH 8, 80 °C y 2 % de concentración enzimática.
- La temperatura en la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza, presentó un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el rendimiento de β -glucanos, siendo 80 °C la condición favorable.
- El pH en la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza, influyó de manera significativa ($p < 0.05$) en el rendimiento de β -glucanos, siendo óptimo el pH 8 que favorece la actividad catalítica de la enzima.
- La concentración de la enzima Corolase 8000 presentó un efecto altamente significativo ($p < 0.05$) en la hidrólisis enzimática del residuo líquido de la fermentación de cerveza, siendo la concentración enzimática óptima de 2.0 %.

Recomendaciones

- ✓ Realizar estudios estructurales mediante técnicas como FTIR, RMN o SEM para determinar la pureza, masa molecular y tipos de enlaces de los β -glucanos extraídos, con el fin de definir sus aplicaciones específicas en alimentos funcionales, farmacéuticos o biomateriales.
- ✓ Investigar la capacidad antioxidante, inmunomoduladora y prebiótica de los β -glucanos obtenidos, mediante pruebas in vitro o in vivo, para fortalecer su aplicabilidad en nutraceuticos y alimentos funcionales de alto valor agregado.
- ✓ Explorar el potencial del residuo LFC no solo para la extracción de β -glucanos, sino también para recuperar otros compuestos de valor agregado como proteínas funcionales, polifenoles o minerales, promoviendo una valorización integral bajo el enfoque de economía circular.
- ✓ Probar la combinación de la hidrólisis enzimática con tecnologías de intensificación de procesos, como ultrasonido, microondas o alta presión, para mejorar el rendimiento y reducir el tiempo de extracción, evaluando también su impacto ambiental mediante análisis de ciclo de vida.
- ✓ Evaluar la viabilidad técnica y económica del escalado del proceso de hidrólisis enzimática a nivel piloto e industrial, analizando el consumo energético, la eficiencia de purificación de β -glucanos y los costos asociados al uso de enzimas comerciales como Corolase® 8000.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AB Enzymes Gmbh. (s.f.). Corolase® 8000. (2024): Alkaline protease for protein hydrolysis.
<https://www.abenzymes.com/en/product-repository-food/corolase-8000/>
- Agrologia. (2015, marzo 23). *Las enzimas del suelo*.
<https://agrologia.wordpress.com/2015/03/23/las-enzimas-del-suelo/>
- Aguilar-Uscanga, B., & François, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 268–274. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>
- American Association of Cereal Chemists International (AACCI). (2023). Approved Method 32-23.01: Total Dietary Fiber in Foods Containing β -Glucans. *AACCI Methods*.
- AOAC International. (1995). Official Method 995.16: β -Glucans in Barley and Oats by Enzymatic Method. *Official Methods of Analysis of AOAC International*.
- Aravena, F.M.C. (2003). Estudio de los residuos industriales líquidos y evaluación de las alternativas de mejoras para la Industria Cervecera Valdivia [Tesis de licenciatura, Universidad Austral de Chile]. Cibertesis UACH.
<http://repositorio.ucv.cl/handle/10.4151/76929>
- Avramia, I., & Amariei, S. (2021). Spent Brewer's Yeast as a Source of Insoluble β -Glucans. *Applied Sciences*, 11(6), 2561. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/825>
- B-glucan assay kit (Mixed Linkage). (s/f). Megazyme. 2023, de <https://www.megazyme.com/beta-glucan-assay-kit>
- Bamforth, C. W. (2023). Beer: Tap into the Art and Science of Brewing (2.^a ed.). Oxford University Press. <https://academic.oup.com/book/51721>
- Bashir, K. M. I., y Choi, J. S. (2017). Perspectivas clínicas y fisiológicas de los β -glucanos: Pasado, presente y futuro. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 18(9), 1906.
<https://doi.org/10.3390/ijms18091906>
- Benito R. Ó., Martín C. A., Cocero, M. J., y Alonso, E. (2016). Dissolution of (1-3),(1-4)- β -Glucans in Pressurized Hot Water: Quantitative Assessment of the Degradation and the Effective Extraction. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2016, Article 2189837. <https://doi.org/10.1155/2016/2189837>

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., y Gatto, G. J. (2018). "Biochemistry" (8th edition). W. H. Freeman and Company. ISBN: 978-1464126109.
- Berger, C., Cohen, M., y Duboë-Laurence, P. (2005). El libro del amante de la cerveza. José J. de Olañeta. <https://www.olanetaeditor.com/titulos/el-libro-del-amante-de-la-cerveza/>
- Boulton, C. A., Quain, D. E., y Speers, R. A. (2017). "Brewing Yeast Fermentation Performance" (2nd edition). John Wiley y Sons. ISBN: 978-1118685383.
https://eprints.nottingham.ac.uk/68443/1/PhD%20Thesis_ChrisAlexander%20FINAL%202022.pdf
- Briggs, D., Boulton, C. A., Brookes, P. A., y Stevens, R. (2004). "Brewing Science: A Multidisciplinary Approach." Woodhead Publishing. ISBN: 978-1855734906.
<https://rexresearch1.com/BrewingLibrary/BrewingSciPract.pdf>
- Cáceres, B. N., (2022). Secado convectivo de alimentos y productos agrícolas. Editorial: Alpha servicios gráficos S.R.L., Cusco, Perú.
- Chan, G. C., Chan, W. K., & Sze, D. M. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2, 25. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-25>
- Chávez, L. F., De-La-Rosa, S. E., Manjarres, J. C., Valbuena, S. G., y Becerra-Torres, M. (2024). Diagrama de Pareto. Perspectiva de la Asignatura de Control de la Calidad. *Boletín de Innovación, Logística y Operaciones*, 6(1), 51-56.
- Colchado Tineo, M. R. D. M. (2023). Reaprovechamiento de algunos subproductos de la industria alimentaria como alimento funcional.
<https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/11399>
- Compañía Nacional de Levaduras Levapan S.A. (2021). *Proceso de obtención de beta-glucano a partir de levadura de panadería* (WO2021209959A2). Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. <https://patents.google.com/patent/WO2021209959A2/es>
- Corredor, Y. A. V., y Pérez, L. I. P. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 59-72.
<https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/3108>

- FAO. (2023). Guía para la gestión sostenible de los residuos agroindustriales. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
<https://www.fao.org/3/i3127s/i3127s.pdf>
- Gautério, G. V., Barbosa, A. M., Becker, A. M., Londero, L. R., y Campelo, P. H. (2022). Spent brewery yeast β -glucans: A review of their extraction, physicochemical characteristics, and potential food applications. *Frontiers in Food Science and Technology*, 2, 1074505. DOI: 10.3389/frfst.2022.1074505
- Gobierno Regional de Los Lagos. (2019). *Guía técnica: Economía Circular – Región de Los Lagos*. Gobierno Regional de Los Lagos.
<https://saowcsblobassets.blob.core.windows.net/assets/CONV/1476735799465/Guia%20Tecnica%20Final%20EC%20IR%20LOS%20LAGOS.pdf>
- Grand View Research. (2024). *Craft beer market size, share & trends analysis report* [Informe de investigación]. <https://www.grandviewresearch.com>
- Guarín Sánchez, S. F., & Sastoque Hernández, A. F. (2019). Extracción de β -glucano a partir de residuos de levadura producidos en la elaboración de cerveza y diseño de un producto nutracéutico [Trabajo de grado, Universidad de los Andes]. Repositorio Institucional Séneca.
<https://repositorio.uniandes.edu.co/entities/publication/a36129a2-4af8-4698-a6cc-576d0868eb6a>
- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., y Abecassis, J. (2007). Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 327-347. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.02.006>
- Hernández Hernández, H. A. (2023). Obtención de un extracto enriquecido de β -glucanos a partir de levadura agotada de cerveza mediante microondas y ultrasonido, asistido enzimáticamente y evaluación de su actividad biológica [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional UAQ. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/9910>
- Hettiarachchi, H., Meegoda, J. N., y Ryu, S. (2018). La recompra de residuos orgánicos como método viable para mejorar la gestión sostenible de residuos sólidos municipales en los países en desarrollo. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(11), 2483. <https://doi.org/10.3390/ijerph15112483>

- IWSR Drinks Market Analysis. (2024). *Peru beer market insights: Craft and premium growth*. <https://www.theiwsr.com>
- Jiang, X., Meng, X., & Xian, M. (2020). Enzymatic hydrolysis of β -glucan for functional food applications. *Food Chemistry*, 312, 126045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126045>
- Klis, F. M., Boorsma, A., y De Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3), 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>
- Kwiatkowski, S., Knapczyk, K., Wolska, J., y Szwed, M. (2021). Betaglucanos: Una revisión exhaustiva de su presencia, química y aplicaciones de alto valor. *Molecules*, 26(13), 3991. <https://doi.org/10.3390/molecules26133991>
- Latgé, J.-P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66(2), 279–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>
- Lazaridou, A., y Biliaderis, C. G. (2007). Aspectos moleculares de la funcionalidad del β -glucanos de cereales: Propiedades físicas, aplicaciones tecnológicas y efectos fisiológicos. *Cereal Chemistry*, 46(2), 101-118. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-46-2-0101>
- Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L, Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H., y Luque, R. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials, and fuels. *Energy y Environmental Science*, 6(2), 426-464. <https://doi.org/10.1039/c2ee23440h>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Martin, K. C. (2021). *Molecular Cell Biology* (9ª ed.). W. H. Freeman.
- Maheshwari, G., Sowrirajan, S., & Joseph, B. (2017). Extraction and Isolation of β -Glucan from Grain Sources—A Review. *Journal of Food Science*, 82(9), 2172–2179. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13765>
- Marson, G. V., de Castro, R. J. S., Belleville, M.–P., & Hubinger, M. D. (2020). *Spent brewer's yeast as a source of high added value molecules: A systematic review on its characteristics, processing and potential applications*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 95. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02866-7>
- Martínez, J. (2020). Producción de harina de bagazo a partir de un residuo de la industria cervecera. (s/f). Gob.Ar.

https://repositoriosdigitales.mincyt.gob.ar/vufind/Record/RDUUNC_b2616ef56bd86635a6bd6d172c6ee652

- McCleary, B. V., & Mugford, D. C. (2007). Improved quantitative analysis of oligosaccharides from lichenase-hydrolyzed water-soluble barley β -glucans by high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1656–1662. <https://doi.org/10.1021/jf062603l>
- Mejía-Barajas, J. A., Montoya-Pérez, R., Cortés-Rojo, C., y Saavedra-Molina, A. (2016). Levaduras termotolerantes: aplicaciones industriales, estrés oxidativo y respuesta Antioxidante. *Información tecnológica*, 27(4), 03-16.
- Mendoza Intusca, P. A. (2023). *Elaboración de alcohol desinfectante a partir del residuo líquido de la fermentación de cerveza* (Tesis de pregrado). [Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco].
- Montgomery, J., & Carlberg, T. (2021). *Scale-up in chemical engineering*. Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9783527824845>
- Murphy, E. J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N. J., y Laffey, J. G. (2020). Propiedades metabólicas e inmunomoduladoras del β -glucanos y potencial de aplicación clínica. *Journal of Fungi*, 6(4), 356. <https://doi.org/10.3390/jof6040356>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Roberto, I. C., y Silva, J. P. (2006). The use of response surface methodology for the production optimization of β -glucosidase by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 28(1), 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.07.008>
- Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2021). "Lehninger Principles of Biochemistry" (8ª ed.). W. H. Freeman and Company. ISBN: 978-0716771081.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *Plan de acción mundial sobre actividad física 2018–2030: personas más activas para un mundo más sano*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514187>
- Perdomo, M. C., Vargas, R. E., & Campos, J. (2004). Valor nutritivo de la levadura de cervecería (*Saccharomyces cerevisiae*) y de sus derivados, extracto y pared celular, en la alimentación aviar. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 90–97.
- Piermaria, J. A., Rivero, S. G. M., & Medrano, M. (2021). Caracterización estructural por ATR-FTIR de β -glucanos obtenidos de paredes de levaduras cerveceras. En 6º *Simposio Argentino*

- de Procesos Biotecnológicos: Transfiriendo biotecnología para el desarrollo* (pp. 102–103). Universidad Nacional de Misiones. <http://hdl.handle.net/11336/194543>
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78-82.
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2008.01.002>
- Romero Sosa, K. G. (2021). *Desarrollo de un proceso enzimático para la extracción y purificación de betaglucanos a partir de levadura de cerveza* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional UAQ. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/2975>
- Samaniego, J., Toro, E. R., Herrera Jiménez, J., y Santori, S. (2023). *Panorama de las hojas de ruta de economía circular en América Latina y el Caribe* [Documento de proyecto]. Comisión Económica para América Latina y el Caribe.
<https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/037778b3-04da-4351-a558-3dded786ab50/content>
- Sinnott, R. K. (2005). *Coulson and Richardson's chemical engineering: Volume 6 - Chemical engineering design* (4th ed.). Butterworth-Heinemann.
<https://www.elsevier.com/books/coulson-and-richardsons-chemical-engineering/sinnott/978-0-7506-6538-4>
- Skendi, A., Biliaderis, C. G., Papageorgiou, M., y Izydorczyk, M. S. (2010). Effects of two barley β -glucan isolates on wheat flour dough and bread properties. *Food Chemistry*, 119(3), 1159-1167. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.059>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., y Nieman, T. A. (2018). *Principios de análisis instrumental* (Vol. 5, pp. 614-633). Madrid: McGraw-Hill.
- Statista. (2024). *Market value of beer worldwide from 2023 to 2028* [Dataset]. <https://www.statista.com>
- Tâm, T. M., Duy, N. Q., Minh, N. P., y Dao, D. T. A. (2013). Optimización de la extracción de β -glucanos a partir de residuos de levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* mediante autólisis, tratamiento enzimático, ultrasónico y combinado enzimático-ultrasonido. *American Journal of Research Communication*, 1(11), 149-158.
- Tammela, P. (2021). *Circular economy in brewing industry: From waste to value* (Tesis doctoral, Tampere University). <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-03-1846-1>

- Tian, X., Yang, P., & Jiang, W. (2019). Effect of alkali treatment combined with high pressure on extraction efficiency of β -D-glucan from spent brewer's yeast. *Waste and Biomass Valorization*, 10(5), 1131–1140. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0130-8>
- Torrente, S. (2019). Aprovechamiento de los subproductos generados en la industria cervecera. *Facultad de farmacia, Universidad Complutense, Madrid, España*.
- Towler, G., & Sinnott, R. K. (2013). *Chemical engineering design: Principles, practice and economics of plant and process design* (2nd ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-61179-5>
- Vaithanomsat, P., Boonlum, N., Trakunjae, C., Apiwatanapiwat, W., Janchai, P., Boondaeng, A., Phalinphattharakit, K., Nimitkeatkai, H., & Jarerat, A. (2022). Functionality of yeast β -glucan recovered from *Kluyveromyces marxianus* by alkaline and enzymatic processes. *Polymers*, 14(8), 1582. <https://doi.org/10.3390/polym14081582>
- Valerio, J. R., Pandia, S. E., Gallo, M. E., & Pizardi, C. A. (2023). Optimización de la hidrólisis enzimática de anchoveta (*Engraulis ringens*) para minimizar el amargor. *Información Tecnológica*, 34(1), 31–46. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642023000100031>
- Vázquez-Odériz, L., Muñoz, M., Romero-Soto, I., Varela, J., Barrio, E., Sánchez-Vioque, R., Santamaría, G., López, A., y Caride, A (2019). Recuperación y concentración de proteína de levadura y β -glucanos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*. *Biociencia de los alimentos*, 29, 54-59.
- Vega, A. A. S. (2006). Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp Alcalofílico. *Ingeniería y ciencia*, 2(3), 29-38.
- Vetvicka, V., y Vetvickova, J. (2020). β -Glucan: New trends in bioactivity and application in medicine and industry. *Molecules*, 25(3), 567. <https://doi.org/10.3390/molecules25030567>
- Vieira, E., Rocha, M. A. M., Coelho, E., Pinho, O. y Coimbra, M. A. (2020). Levadura cervecera usada como fuente de compuestos bioactivos: Un enfoque sostenible para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. *Revisiones exhaustivas en ciencia y seguridad alimentaria*, 19 (6), 2969-2991. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>
- Volman, JJ, Ramakers, JD y Plat, J. (2008). Modulación dietética de la función inmune por β -glucanos. *Fisiología y comportamiento*, 94 (2), 276-284.

- Whitehead, A., Beck, E. J., Tosh, S., y Wolever, TM (2014). Efectos reductores del colesterol del β -glucanos de avena: un metanálisis de ensayos controlados aleatorios. *La revista americana de nutrición clínica*, 100(6), 1413- 1421.
- Wood, Pj, Weisz, J. y Blackwell, BA (1994). Estudios estructurales de (1, 3), (1,4)- β -D-glucanos por espectroscopía de resonancia magnética nuclear ^{13}C y por análisis rápido de regiones similares a la celulosa usando cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento de oligosacáridos liberados por liquenasa. *Química de cereales*, 71 (3), 301-307.
- Yuan, H., Li, Y., Ma, Y., Han, J., Xu, Y., Zhang, X., & Li, B. (2022). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of yeast β -glucan catalyzed by β -glucanase: Chemical and microstructural analysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 86, 106012.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106012>
- Zhu, F., Du, B., y Xu, B. (2016). A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*, 52, 275-288.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.007>

VI APÉNDICE

Apéndice A: Métodos de recolección de datos

Apéndice A1: Matriz de consistencia

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variables	Indicadores	Unidad	Método	Técnica	Instrumento	Metodología
General. ¿Cuál es el rendimiento de la hidrólisis enzimática del residuo LFC para determinar β -glucanos? Específicos . ¿Cuál es el efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática del residuo LFC en el rendimiento de β -glucanos? . ¿Cuál es el efecto del pH en la hidrólisis enzimática del residuo LFC en el rendimiento de β -glucanos? . ¿En qué medida la concentración de la enzima afecta en la hidrólisis enzimática del residuo LFC en el rendimiento de β -glucanos?	General. Evaluar el rendimiento de la hidrólisis enzimática del residuo LFC para determinar β -glucanos. Específicos. . Evaluar el efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática del residuo LFC en el rendimiento de β -glucanos. . Evaluar el efecto del pH en la hidrólisis enzimática del residuo LFC en el rendimiento de β -glucanos. . Evaluar el efecto de concentración de la enzima en la hidrólisis enzimática del residuo LFC en el rendimiento de β -glucanos.	General. La hidrólisis enzimática del residuo LFC permite determinar β -glucanos con un rendimiento cuantificable y significativo, en función de la aplicación de condiciones específicas de temperatura, pH y concentración enzimática. Específicos. . El incremento de la temperatura en la hidrólisis enzimática, permite determinar el mayor rendimiento de β -glucanos. . El pH en medio alcalino en la hidrólisis enzimática, permite determinar el mayor rendimiento de β -glucanos. . A medida que aumenta la concentración de la enzima en la hidrólisis enzimática, se determina el mayor rendimiento de β -glucanos.	Independientes						Enfoque: Cuantitativo Tipo: Experimental causal. Muestra: Residuo líquido de la fermentación de cerveza (residuo LFC). Técnica: Laboratorial
			Temperatura de hidrólisis	Temperatura	°C	Termométrico	Térmica	Termómetro	
			pH de hidrólisis	pH	--	Electrométrico	Electrométrica	Potenciómetro	
			Concentración de la enzima	Porcentaje	%	Gravimétrico	Pesado	Balanza analítica	
			Dependiente						
			Rendimiento de la extracción de β -glucanos	Rendimiento	%	Espectrofotométrico	Espectrofotometría	Espectrofotómetro óptico	

Apéndice A2: Paquete de cálculo en Excel



Mega-Calc™ Data Calculator

Barley and Oat β -Glucan (K-BGLU) - Determination (Solids)

Setting New Standards in Test Technology



[Instructions](#)
[Contact Us](#)

Sample details

Absorbance values for 100 micrograms of D-glucose standard

Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Average
				0.0000

Factor: --

	Sample identifier	Absorbance values			Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Beta-Glucan (mg/L) "as is"	Sample weight (mg)	Extract volume (mL)	Beta-Glucan (g/100 g) "as is"	Moisture Content %	Beta-Glucan (g/100 g) "dwb"
		Blank	Sample	Δ Abs								
1					0.10	1		9.4				
2					0.10	1		9.4				
3					0.10	1		9.4				
4					0.10	1		9.4				
5					0.10	1		9.4				
6					0.10	1		9.4				
7					0.10	1		9.4				
8					0.10	1		9.4				
9					0.10	1		9.4				
10					0.10	1		9.4				
11					0.10	1		9.4				
12					0.10	1		9.4				
13					0.10	1		9.4				
14					0.10	1		9.4				
15					0.10	1		9.4				
16					0.10	1		9.4				
17					0.10	1		9.4				
18					0.10	1		9.4				

Apéndice A3: Ficha técnica de enzima Colorase 8000



COROLASE[®] 8000

Alkaline protease enzyme for protein hydrolysis applications

PRODUCT DESCRIPTION

COROLASE[®] 8000 is a thermotolerant food grade fungal alkaline protease enzyme preparation ideal for hydrolysing proteins under mildly alkaline conditions. Specifically, it is a serine endo-protease (thermomycin) and can also be described as an endopeptidase.

COROLASE[®] 8000 is produced by controlled fermentation of a genetically modified strain of *Trichoderma reesei*.

PRODUCT CHARACTERISTICS

COROLASE[®] 8000 has the following characteristics & specifications:

- Liquid formulation.
- Light brown colour with characteristic odour.
- Density: ~1.10 g/ml.
- Activity: Minimum 100.000 BPU/g. A method of analysis is available on request.
- IUB: 3.4.21.65
- CAS: 52233-31-5

COROLASE[®] 8000 complies with the recommended specifications of the FAO/WHO's Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC) for food-grade enzyme preparations.

APPLICATIONS

COROLASE[®] 8000 can be used for many sorts of protein hydrolysis whether from vegetal or animal origin. It can be used to achieve a high degree of hydrolysis.

COROLASE[®] 8000 is able to hydrolyse a broad range of proteins at and above neutral pH. It may be used either on its own or in combination with other proteases or other enzyme activities.

Typical applications include the hydrolysis of wheat gluten, soya protein, gelatine, milk proteins, recycling of meat off-cuts and recovery of fish protein from by-products.

The product can be used over a wide pH and temperature range:

- pH: 6.0 - 10.0
- Temperature: up to 80 °C

DOSAGE

The dosage of the enzyme depends on raw materials used, reaction conditions such as pH, temperature and time, and the desired degree of hydrolysis. The optimal dose rate should be determined in trials.

For initial trials, typical dosages are: 0.1 - 2.0% based on the protein content.

Apéndice A4: Manual de kit de determinacion de b glucanos

β-GLUCAN (Mixed Linkage) ASSAY PROTOCOL

K-BGLU

(100 Manual Assays per Kit)

**AACC Method 32-23.01
AOAC Method 995.16
EBC Methods 3.10.1, 4.16.1 and 8.13.1
ICC Standard Method No. 166
Codex Type II Method**



© 2023, Neogen Corporation; © 2023, Megazyme. All rights reserved.

Neogen is a registered trademark of Neogen Corporation. Megazyme is a registered trademark of Megazyme Ltd.

INTRODUCTION:

The Neogen β -glucan assay kit (K-BGLU) is an accurate, convenient, and reliable method for the measurement of mixed-linkage β -glucan in barley, malt, wort and beer. The method is straightforward allowing ~ 50-100 samples to be assayed in a day. An assay protocol for the measurement of β -glucan in oats and oat fiber products is also provided (Streamlined method, page 5).

PRINCIPLE:

Samples are suspended and hydrated in a buffer solution of pH 6.5 and then incubated with purified lichenase enzyme and filtered. An aliquot of the filtrate is then hydrolysed to completion with purified β -glucosidase. The D-glucose produced is assayed using a glucose oxidase/peroxidase reagent (Scheme 1, page 15).

ACCURACY:

Standard errors of $\pm 3\%$ are achieved routinely within our laboratory for oat and barley samples.

EVALUATION:

The Streamlined β -glucan method has been successfully evaluated by AOAC International (Method 995.16), AACC (Method 32-23.01) and ICC (Method No. 166). The original version of the method was also successfully evaluated by Analytical Committees of the Royal Australian Chemical Institute and the European Brewing Convention.

SPECIFICITY:

The assay is specific for mixed-linkage [(1-3)(1-4)]- β -D-glucan.

KITS:

Kits suitable for performing 100 assays are available from Neogen. The kits contain the full assay method plus:

- Bottle 1:** Lichenase [specific, *endo*-(1-3)(1-4)- β -D-glucan 4-glucanohydrolase] suspension (1 mL).
Store at 4°C. See individual label for expiry date.
- Bottle 2:** β -Glucosidase (1 mL) suspension.
Store at 4°C. See individual label for expiry date.
- Bottle 3:** **GOPOD Reagent Buffer.** Buffer (50 mL, pH 7.4), *p*-hydroxybenzoic acid and sodium azide (0.09% w/v).
Store at 4°C. See individual label for expiry date.
- Bottle 4:** **GOPOD Reagent Enzymes.** Glucose oxidase plus peroxidase and 4-aminoantipyrine. Freeze-dried powder.
Store below -10°C. See individual label for expiry date.

The absorbance of this solution should be less than 0.05 when read against distilled water.

BUFFERS (NOT SUPPLIED):

1. **20 mM Sodium phosphate buffer, pH 6.5.**
Dissolve 3.12 g of sodium dihydrogen orthophosphate dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in 900 mL of distilled water and adjust the pH to 6.5 by the addition of 100 mM sodium hydroxide (4 g/L) (approx. 50 mL is required). Adjust the volume to 1 L.
2. **50 mM Sodium acetate buffer, pH 4.0.**
Add 2.9 mL of glacial acetic acid to 900 mL of distilled water. Adjust to pH 4.0 by the addition of 1 M sodium hydroxide solution. Adjust the volume to 1 L.
3. **200 mM Sodium acetate buffer, pH 4.0.**
Add 11.6 mL of glacial acetic acid to 900 mL of distilled water. Adjust to pH 4.0 by the addition of 1 M sodium hydroxide solution. Adjust the volume to 1 L.

REAGENTS (NOT SUPPLIED):

Read the assay protocol carefully to determine the reagents required for the appropriate method (A/B/C).

1. **50 % Ethanol (v/v).**
Add 500 mL of ethanol (100% v/v) to 500 mL of distilled water. Store in a 1 L Duran bottle.
2. **95% Ethanol (v/v).**
95% Ethanol (v/v) reagent grade or similar

EQUIPMENT (RECOMMENDED):

1. Polypropylene tubes/containers with caps (35 mL capacity).
2. Glass test-tubes (12 mL capacity) [Plastic test tubes of the same dimension are also suitable for use].
3. Micro-pipettors, e.g. Gilson Pipetman® (100 μL and 200 μL).
4. Positive displacement pipettor, e.g. Eppendorf Multipette®
 - with 5.0 mL Combitip® (to dispense 0.1 mL aliquots of buffer and buffered β -glucosidase solution).
5. Adjustable-volume dispensers

0-5.0 mL (for phosphate buffer).
3.0 mL (for glucose oxidase/peroxidase reagent).
0-25.0 mL (for distilled water).
6. Laboratory oven.

- Bottle 5:** D-Glucose standard solution (5 mL, 1.0 mg/mL) in 0.2% (w/v) benzoic acid.
Store sealed at room temperature. See individual label for expiry date.
- Bottle 6:** Standardised barley flour control. β -Glucan content shown on vial label.
Store sealed at room temperature. See individual label for expiry date.
- Bottle 7:** Standardised oat flour control. β -Glucan content shown on vial label.
Store sealed at room temperature. See individual label for expiry date.

PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS:

1. Dilute the contents of **bottle 1** (lichenase) to 20.0 mL with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5). This is **solution 1 (diluted lichenase)**. Divide into appropriately sized aliquots and store in polypropylene tubes below -10°C between use and store on ice during use.
Stable for ≥ 2 years below -10°C .

NOTE: It is imperative that the lichenase is not cross contaminated with β -glucosidase.

2. Dilute the entire contents of **bottle 2** (β -glucosidase) to 20.0 mL with 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0). This is **solution 2 (diluted β -glucosidase)**. Divide into appropriately sized aliquots and store in polypropylene tubes below -10°C between use and store on ice during use.
Stable for ≥ 2 years below -10°C .
3. Dilute the contents of the **GOPOD Reagent Buffer** bottle to 1 L with distilled water (this is **solution 3**). Use immediately.

NOTE:

1. On storage, salt crystals may form in the concentrated buffer. These must be completely dissolved when this buffer is diluted to 1 L with distilled water.
2. This buffer contains 0.09% (w/v) sodium azide.
This is a poisonous chemical and should be treated accordingly.

4. Dissolve the contents of **GOPOD Reagent Enzyme** bottle in 20 mL of **solution 3** and quantitatively transfer this to the bottle containing the remainder of **solution 3**. Cover this bottle with aluminium foil to protect the enclosed reagent from light. This is **Glucose Determination Reagent (GOPOD Reagent)**.
Stable for ≥ 1 month at 4°C or ≥ 12 months below -10°C .

If this reagent is to be stored in the frozen state, preferably it should be divided into aliquots. Do not freeze/thaw more than once.

When the reagent is freshly prepared it may be light yellow or light pink in colour. The solution may develop a stronger pink colour upon storage at 4°C .

7. Analytical and top-pan balances.
8. Spectrophotometer set at 510 nm (see point 1 under Useful Hints, page 9).
9. Vortex mixer.
10. Thermostated water bath set at 50°C (or 40°C for the original version of the method, page 10).
11. Stopwatch.
12. Whatman No. 41 filter circles.
13. Centrifuge (in conjunction with preparation of malt, wort and beer).
14. Laboratory mill with 0.5 mm screen (e.g. Frisch pulverisette 14®).
15. Boiling water bath.

CONTROLS AND PRECAUTIONS:

1. With each set of determinations, reagent blanks and D-glucose standards of 100 µg should be included, in duplicate.

The **reagent blank** comprises 0.1 mL distilled water + 0.1 mL 200 mM sodium acetate buffer pH 4.0 + 3.0 mL of **GOPOD Reagent**.

The **glucose standard** comprises 0.1 mL 200 mM sodium acetate buffer pH 4.0 + 0.1 mL D-glucose standard (100 µg/0.1 mL) + 3.0 mL **GOPOD Reagent**.

2. With each set of determinations at least one standardised barley flour control should also be included.
3. It is imperative that the lichenase enzyme preparation is **not** cross-contaminated with the β-glucosidase preparation (the reverse is not a problem).

(A) ASSAY PROCEDURE FOR OAT AND BARLEY FLOUR AND FIBER SAMPLES - STREAMLINED METHOD (AOAC Method 995.16, AACC Method 32-23 and ICC Standard Method No. 166).

This procedure is ideal for all dry samples particularly those containing high levels of β-glucan (e.g. processed oat bran products).

METHOD:

1. Mill barley, oats or fiber sample (approx. 50 g) to pass a 0.5 mm screen using a centrifugal mill.
2. Add flour sample (80-120 mg; weighed accurately) to a glass centrifuge tube (16 x 120 mm; 17 mL capacity). Tap the tube to ensure that all sample falls to the bottom of the tube.

3. Wet the sample with 0.2 mL of aqueous ethanol (50% v/v) to aid dispersion. Add 4.0 mL of 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 and stir the contents on a vortex mixer.
4. On mixing, immediately place the tube in a boiling water bath and incubate for 60 sec. Vigorously stir the mixture on a vortex mixer, incubate at 100°C for a further 2 min and stir again.
5. Incubate the tube plus contents at 50°C and allow to equilibrate for 5 min.
6. Add 0.2 mL of **solution 1 (diluted lichenase)** and stir the tube contents. Seal the tube with parafilm and incubate for 1 h at 50°C, with regular vigorous stirring (i.e. 3-4 times) on a vortex mixer. Continuous stirring is recommended where possible.
7. Add 5.0 mL of 200 mM sodium acetate buffer pH 4.0 and vigorously mix the tube contents on a vortex mixer.
8. Allow the tube to equilibrate to room temperature (5 min) and centrifuge (1,000 *g*, 10 min). Carefully and accurately dispense aliquots (0.1 mL) into the bottom of three test tubes (12 mL capacity).
9. Add 0.1 mL of **solution 2 (diluted β -glucosidase)** to two of these tubes (the reaction). To the third (the reaction blank), add 0.1 mL of 50 mM acetate buffer pH 4.0. Incubate all tubes at 50°C for 10 min.
10. Add 3.0 mL **GOPOD Reagent** to each tube and incubate at 50°C for a further 20 min.
11. Remove the tubes from the water bath and measure the absorbance at 510 nm against reagent blank within 1 h.

NOTE: The amount of D-glucose present in the test tube (i.e. in the 0.1 mL of sample being analysed) should range between 4 and 100 μ g. The sample solution before the β -glucosidase treatment must be diluted sufficiently with 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) to yield a sugar concentration between 0.04 and 1.0 g/L, which is equivalent to approx. 0.35 and 8.5% of β -glucan in the original sample. For example, if a sample contains 20% of beta-glucan it should be diluted 3-fold with 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) before dispensing aliquots for incubation with β -glucosidase.

Alternatively for samples containing high β -glucan, e.g. Oatwell (> 50% β -Glucan), the sample size should be reduced to 50 mg and the volume should be adjusted to 100 mL with 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) after lichenase treatment.

CALCULATIONS:**For Solid samples:**

NOTE: These calculations can be simplified by using the **Mega-Calc™**, downloadable from where the product appears on the Megazyme website (www.megazyme.com).

$$\begin{aligned}\beta\text{-glucan (\% w/w)} &= \Delta A \times F \times \frac{FV}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \times D \\ \text{("as is")} &= \Delta A \times \frac{F}{W} \times FV \times D \times 0.9\end{aligned}$$

where:

- ΔA = absorbance after β -glucosidase treatment (reaction) minus reaction blank absorbance.
- F = factor for the conversion of absorbance values to μg of glucose.
- $= \frac{100 \text{ (}\mu\text{g of D-glucose)}}{\text{absorbance of } 100 \mu\text{g of D-glucose}}$
- FV = final volume (i.e. equals 9.4 mL for oat and barley flour in method (A); 6.4 mL for cooked, toasted and extruded cereal products in example (B); 100 mL for samples containing > 50% β -glucan, see note on page 6).
- 0.1 = volume of sample analysed.
- $\frac{1}{1000}$ = conversion from μg to mg.
- $\frac{100}{W}$ = factor to express β -glucan content as a percentage of sample weight.
- W = the weight in mg ("as is" basis) of the sample analysed.

162

180 = factor to convert from free D-glucose, as determined, to anhydro-D-glucose, as occurs in β -glucan.

D = further dilution prior to incubation with β -glucosidase (if required).

β -glucan % w/w (dry wt. basis):

$$= \beta\text{-glucan \% w/w (as is)} \times \frac{100}{100 - \text{moisture content (\% w/w)}}$$

For (Liquid samples; g/100 mL):

NOTE: These calculations can be simplified by using the Megazyme *Mega-Calc*[™], downloadable from where the product appears on the Megazyme website (www.megazyme.com).

$$\begin{aligned} \beta\text{-glucan (g/100 mL)} &= \Delta A \times F \times \frac{9.2}{3.0} \times 1000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180} \times D \\ &= \Delta A \times F \times D \times 0.00276 \end{aligned}$$

where:

ΔA = absorbance after β -glucosidase treatment (reaction) minus reaction blank absorbance.

F = factor for the conversion of absorbance values to μg of glucose.

$$= \frac{100 \text{ (}\mu\text{g of D-glucose)}}{\text{absorbance of 100 } \mu\text{g of D-Glucose}}$$

$\frac{9.2}{3.0}$ = volume correction factor: 3.0 mL aliquots of sample were treated with ethanol and volume was readjusted to 9.2 mL (i.e. 4.0 mL + 0.2 mL **solution 1 (diluted lichenase)** + 5.0 mL sodium acetate buffer).

1000 = volume adjustment factor (0.1 mL was analysed but results are presented per 100 mL of sample)

$\frac{1}{1000}$ = conversion from μg to mg.

$\frac{1}{1000}$ = conversion from mg to g.

$\frac{162}{180}$ = factor to convert from free D-glucose, as determined, to anhydro-D-glucose, as occurs in β -glucan.

D = further dilution prior to incubation with β -glucosidase (if required).

(D) ASSAY PROCEDURE FOR BARLEY APPROVED BY EUROPEAN BREWING CONVENTION (EBC Method 3.10.1):

USEFUL HINTS:

1. After incubation of samples with **solution 1 (diluted lichenase)** it is suggested that the volume of the reaction mixture* be adjusted to 30.0 mL by the addition of 24.0 mL of distilled water via a dispenser.

* Assume the volume to be 6.0 mL; approx. 0.2 mL is lost during the heating step.

2. In step 5 of the assay procedure, if the solution becomes very viscous after the 5 min boiling step, add 5.0 mL of distilled water and stir well on a vortex mixer. After reaction with **solution 1 (diluted lichenase)** adjust the volume to 30.0 mL by the addition of 19.0 mL of distilled water.

NOTE: If the solution is very viscous there may be some problem with the diffusion of lichenase. Adding 5.0 mL of distilled water will alleviate this problem.

3. If glass, rather than polypropylene, tubes are used in step 5 of the assay procedure, reduce the time of incubation in the boiling water bath to 45 sec initially, vortex the contents and incubate for a further 45 sec in the boiling water bath (i.e. total of 1.5 min).

METHOD:

1. Mill barley to pass a 0.5 mm screen using a Tecator Cyclotec® mill (uniform, fine milling is essential).
2. Accurately weigh barley flour samples (approx. 0.5 g) of known moisture content* into polypropylene tubes (refer to Equipment, point 1, page 3).

* See footnote under Example Results Sheet on page 10.

3. Add an aliquot (1.0 mL) of aqueous ethanol (50% v/v) to each tube to aid in the subsequent dispersion of samples.
4. Add 5.0 mL of 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 and stir the tubes on a vortex mixer.

5. Incubate the tubes in a boiling water bath for approx. 2 min (see point 2 and 3 under Useful Hints). Remove the tubes and vigorously stir them on a vortex mixer. Heat the tubes for a further 3 min in the boiling water bath (mixing after 2 min prevents formation of a lump of gel material).
6. Cool the tubes to 40°C and add 0.2 mL of **solution 1 (diluted lichenase)** to each tube. Cap the tubes, stir and incubate at 40°C for 1 h.
7. Adjust the volume in each tube to 30.0 mL by the addition of distilled water (see point 1 under Useful Hints, page 9).
8. Thoroughly mix the contents of the tubes and filter an aliquot from each tube through a Whatman No. 41 filter circle (or centrifuge an aliquot at approx. 1,000 *g* for 10 min).
9. Carefully and accurately transfer aliquots (0.1 mL) from each filtrate to the bottom of three test tubes.
10. Add 0.1 mL of 50 mM sodium acetate buffer pH 4.0 to one of these (the reaction blank), while to the other two (the reaction) add 0.1 mL of **solution 2 (diluted β -glucosidase)**. Incubate the tubes at 40°C for 15 min.
11. Add **GOPOD Reagent** (3.0 mL) to each tube and incubate at 40°C for 20 min (see point 3 under Controls and Precautions, page 4).
12. Measure the absorbance at 510 nm for each reaction (EA) and reaction blank (EBI).

NOTE: With the **GOPOD Reagent** employed in this kit, the colour complex which is formed is stable for at least 2 h at room temperature.

EXAMPLE RESULTS SHEET:

Sample	Sample weight (mg)		Absorbances (510 nm)			β -Glucan
	Fresh	Dry (corrected)	EBI	EA	ΔA	% (w/w)
e.g. Clipper	495	420	0.012	0.460	0.448	2.86
				0.455	0.443	2.83

$$\text{Dry weight} = \text{fresh weight} \times \frac{100 - \text{moisture content (\%)*}}{100}$$

Apéndice B: Instrumentos de recolección de información

Apéndice B1: Análisis proximal del residuo LFC (levadura gastada)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS

Av. de la Cultura 733 - Pabellón "C" Of. 106 1er. piso - Telefax: 224831 - Apartado Postal 921 - Cusco Perú



UNIDAD DE PRESTACIÓN DESERVICIOS DE ANÁLISIS QUÍMICO
 DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE QUÍMICA

INFORME DE ANALISIS

N°0065-25-LAQ

SOLICITANTE : PABLO ALBERTO MENDOZA INTUSCA

MUESTRA : LEVADURA GASTADA DE CERVEZA (LEVADURA SECA)

OBJETIVO : DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA, CARBOHIDRATOS, CENIZAS, GRASAS Y HUMEDAD

FECHA : C/13/01/2025

ANALISIS FISICOQUIMICO:

Composición	Unidades	Levadura fresca
Proteína %	g/100g	41.43 ± 0.0062
Carbohidratos %	g/100g	35.69 ± 0.0092
Grasas %	g/100g	4.01 ± 0.0081
Fibra cruda %	g/100g	2.27 ± 0.0108
Humedad %	g/100g	9.49 ± 0.0040
Cenizas %	g/100g	7.11 ± 0.0012

Métodos: AOAC 970.22

Métodos: AOAC 986.25

Métodos: AOAC 996.06

Métodos: AOAC 978.10

Métodos: AOAC 925.10

Métodos: AOAC 945.38



Cusco, 17 de enero 2025

Apéndice B2: Datos completos obtenidos por software de Magazine por espectrofotometría.

Sample identifier	Absorbance values				Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Beta-Glucan (mg/L) "as is"	Sample weight (mg)	Extract volume (mL)	Beta-Glucan (g/100 g) "as is"	Moisture Content %	Beta-Glucan (g/100 g) "dwb"
	Blank	Sample		ΔAbs								
Muestra T1_1	0.003	0.263	0.262	0.260	0.10	1	221.8208	88	9.4	2.3694	20.42	2.977
Muestra T1_2	0.002	0.255	0.256	0.253	0.10	1	216.1878	86	9.4	2.3630	20.81	2.984
Muestra T1_3	0.002	0.252	0.253	0.250	0.10	1	213.5420	85	9.4	2.3615	20.65	2.976
Muestra T2_1	0.002	0.283	0.285	0.282	0.10	1	240.7681	96	9.4	2.3575	21.02	2.985
Muestra T2_2	0.003	0.253	0.252	0.250	0.10	1	213.3713	85	9.4	2.3596	20.92	2.984
Muestra T2_3	0.002	0.309	0.309	0.307	0.10	1	261.5932	105	9.4	2.3419	21.72	2.992
Muestra T3_1	0.002	0.249	0.247	0.246	0.10	1	209.8720	82	9.4	2.4058	20.17	3.014
Muestra T3_2	0.002	0.280	0.280	0.278	0.10	1	237.4822	93	9.4	2.4004	20.51	3.020
Muestra T3_3	0.002	0.261	0.263	0.260	0.10	1	221.5647	87	9.4	2.3939	20.22	3.001
Muestra T4_1	0.003	0.273	0.272	0.270	0.10	1	230.4410	88	9.4	2.4615	20.42	3.093
Muestra T4_2	0.002	0.271	0.272	0.269	0.10	1	229.7582	88	9.4	2.4542	20.31	3.080
Muestra T4_3	0.002	0.280	0.281	0.278	0.10	1	237.6102	91	9.4	2.4544	20.52	3.088
Muestra T5_1	0.002	0.397	0.396	0.394	0.10	1	336.5718	110	9.4	2.8762	21.11	3.646
Muestra T5_2	0.002	0.336	0.336	0.334	0.10	1	285.1067	93	9.4	2.8817	20.91	3.644
Muestra T5_3	0.003	0.316	0.315	0.313	0.10	1	267.1408	87	9.4	2.8863	20.98	3.653
Muestra T6_1	0.002	0.331	0.332	0.329	0.10	1	280.9673	89	9.4	2.9675	20.63	3.739
Muestra T6_2	0.002	0.304	0.304	0.302	0.10	1	257.6671	81	9.4	2.9902	19.98	3.737
Muestra T6_3	0.002	0.368	0.368	0.366	0.10	1	312.1622	99	9.4	2.9640	20.73	3.739

Muestra T7_1	0.003	0.325	0.325	0.322	0.10	I	275.1636	86	9.4	3.0076	20.92	3.803
Muestra T7_2	0.002	0.321	0.321	0.319	0.10	I	272.2617	85	9.4	3.0109	20.81	3.802
Muestra T7_3	0.003	0.336	0.336	0.334	0.10	I	284.8080	89	9.4	3.0081	20.96	3.806
Muestra T8_1	0.002	0.363	0.363	0.361	0.10	I	308.1081	96	9.4	3.0169	21.01	3.819
Muestra T8_2	0.002	0.360	0.360	0.358	0.10	I	305.3343	95	9.4	3.0212	20.88	3.819
Muestra T8_3	0.002	0.401	0.401	0.399	0.10	I	340.4211	106	9.4	3.0188	20.89	3.816
Muestra sin Hidrolisar	0.002	0.289	0.289	0.287	0.10	I	244.9502	93	9.4	2.4758	9.48	2.782

Apéndice B3: Concentración de β -glucanos por espectrofotometría.

No. Tratamientos	pH	T (°C)	E (%)	H (%)	Absorbancia (<i>Abs</i>)				β glucanos (%p/p)
					Abs (B)	Abs (1)	Abs (2)	Abs (T)	
T1	6.00	60	0.5	20.42	0.003	0.263	0.262	0.260	2.977
	6.00	60	0.5	20.81	0.002	0.255	0.256	0.253	2.984
	6.00	60	0.5	20.65	0.002	0.252	0.253	0.250	2.976
	8.00	60	0.5	21.02	0.002	0.283	0.285	0.282	2.985
T2	8.00	60	0.5	20.92	0.003	0.253	0.252	0.250	2.984
	8.00	60	0.5	21.72	0.002	0.309	0.309	0.307	2.992
	6.00	80	0.5	20.17	0.002	0.249	0.247	0.246	3.014
T3	6.00	80	0.5	20.51	0.002	0.280	0.280	0.278	3.020
	6.00	80	0.5	20.22	0.002	0.261	0.263	0.260	3.001
	8.00	80	0.5	20.42	0.003	0.273	0.272	0.270	3.093
T4	8.00	80	0.5	20.31	0.002	0.271	0.272	0.269	3.080
	8.00	80	0.5	20.52	0.002	0.280	0.281	0.278	3.088
	6.00	60	2.0	21.11	0.002	0.397	0.396	0.394	3.646
T5	6.00	60	2.0	20.91	0.002	0.336	0.336	0.334	3.644
	6.00	60	2.0	20.98	0.003	0.316	0.315	0.313	3.653
	8.00	60	2.0	20.63	0.002	0.331	0.332	0.329	3.739
T6	8.00	60	2.0	19.98	0.002	0.304	0.304	0.302	3.737
	8.00	60	2.0	20.73	0.002	0.368	0.368	0.366	3.739
	6.00	80	2.0	20.92	0.003	0.325	0.325	0.322	3.803
T7	6.00	80	2.0	20.81	0.002	0.321	0.321	0.319	3.802
	6.00	80	2.0	20.96	0.003	0.336	0.336	0.334	3.806
T8	8.00	80	2.0	21.01	0.002	0.363	0.363	0.361	3.819
	8.00	80	2.0	20.88	0.002	0.360	0.360	0.358	3.819

	8.00	80	2.0	20.89	0.002	0.401	0.401	0.399	3.816
Ref. Muestra									
Sin hidrólisis	5.64	20	0	9.48	0.002	0.289	0.289	0.287	2.782
Enzimática									

Apéndice B4: Prueba de Tukey y análisis confianza de 95%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%			
Tratamientos	N	Media	Agrupación
8	3	3.81793	A
7	3	3.8037	A
6	3	3.73823	B
5	3	3.64737	C
4	3	3.08697	D
3	3	3.01133	E
2	3	2.98687	F
1	3	2.97913	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Apéndice B5: Análisis de Varianza general

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	7	3.3241	0.47487	18332.69	0.00
Error	16	0.0004	0.000026		
Total	23	3.3245			

Apéndice B6: Análisis de varianza de coeficientes codificados

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	3.32409	0.47487	18332.69	0
Lineal	3	3.31202	1.10401	42620.9	0
pH	1	0.01332	0.01332	514.22	0
Temperatura (°C)	1	0.05088	0.05088	1964.1	0
Enzima (%)	1	3.24782	3.24782	125384.38	0
Interacciones de 2 términos	3	0.00424	0.00141	54.57	0
pH*Temperatura (°C)	1	0.00003	0.00003	1.1	0.309
pH*Enzima (%)	1	0.00018	0.00018	6.84	0.019
Temperatura (°C)*Enzima (%)	1	0.00404	0.00404	155.78	0
Interacciones de 3 términos	1	0.00783	0.00783	302.43	0
pH*Temperatura (°C)*Enzima (%)	1	0.00783	0.00783	302.43	0
Error	16	0.00041	0.00003		
Total	23	3.32451			

Apéndice B7: Coeficientes codificados

Coeficientes codificados						
Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		3.38394	0.00104	3257.27	0	
pH	0.04712	0.02356	0.00104	22.68	0	1
Temperatura (°C)	0.09208	0.04604	0.00104	44.32	0	1
Enzima (%)	0.73573	0.36787	0.00104	354.1	0	1
pH*Temperatura (°C)	-	-0.00109	0.00104	-1.05	0.309	1
pH*Enzima (%)	0.00543	0.00272	0.00104	2.61	0.019	1
Temperatura (°C)*Enzima (%)	0.02593	0.01297	0.00104	12.48	0	1
pH*Temperatura (°C)*Enzima (%)	-	-0.01807	0.00104	-17.39	0	1

3. Materiales fotográfico de medición de humedad y pH



4. Materiales fotográfico del equipo de destilación flash



5. Materiales fotográfico de centrifugación en tubos de ensayos.



6. Materiales fotográfico de hidrólisis en prueba de Jarras



7. Materiales fotográfico de pesados



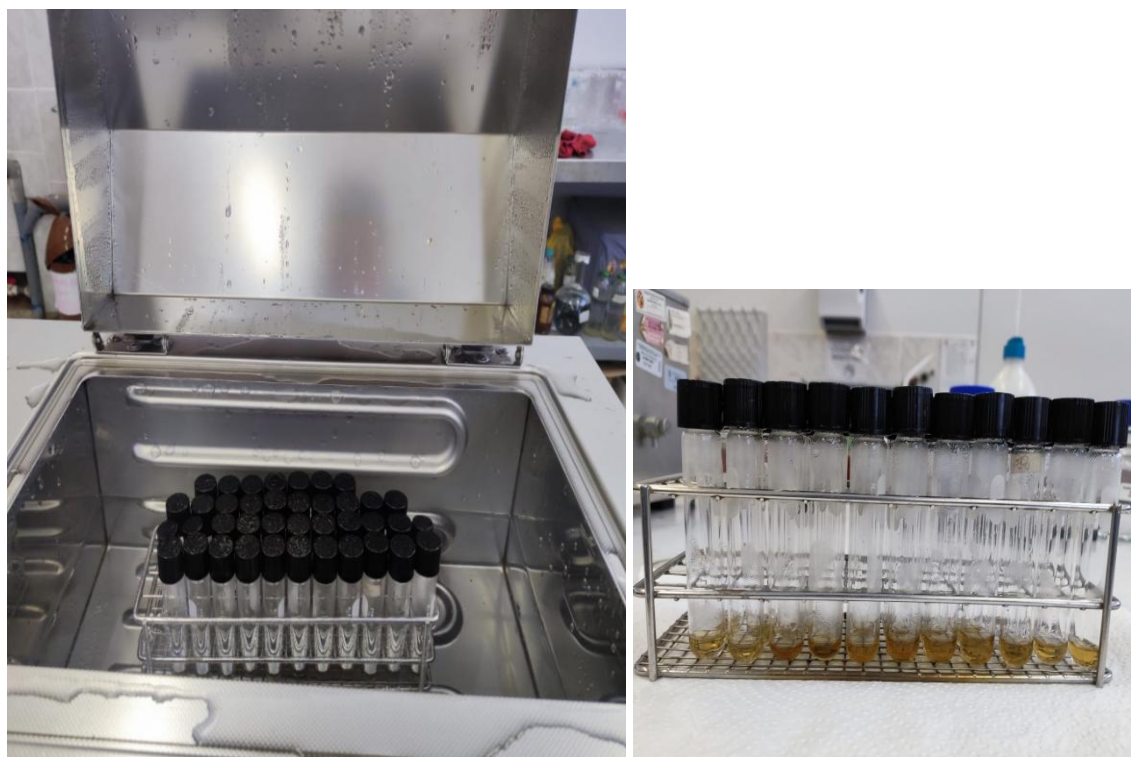
8. Materiales fotográfico de muestras hidrolizas y el deshidratador.



9. Fotográfico de caracterización del residuo LFC después del deshidratador.



10. Materiales fotográfico de muestras hidrolizas para la obtención de β -glucanos



11. Materiales fotográfico de absorción en Espectrofotómetro uv-vis y muestras

