

**UTILIZACIÓN DE AGUA SUBCRÍTICA
PARA RECUPERAR Y FRACCIONAR LA
FRACCIÓN PROTEICA Y LOS
COMPUESTOS FENÓLICOS DEL BAGAZO
DE CERVEZA**

P. Alonso-Riaño*, M. T. Sanz, O. Benito-Román, S. Beltrán, E. Trigueros

Área de Ingeniería Química

Universidad de Burgos



ÍNDICE

➤ RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

RESULTADOS

CONCLUSIONES

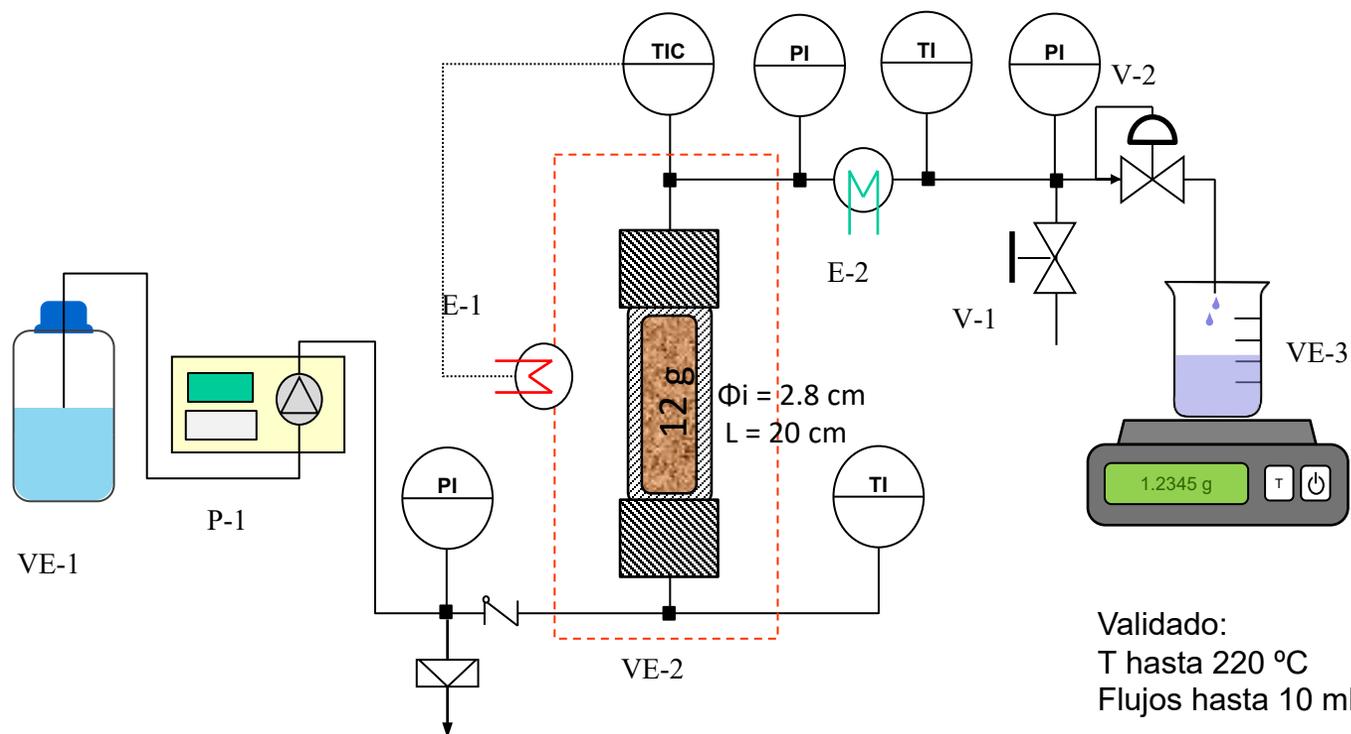
RESUMEN

Valorización de **bagazo de cerveza (BSG)** artesanal.



Agua Subcrítica (ASC)

Reactor **semicontinuo** de lecho fijo



Validado:
T hasta 220 °C
Flujos hasta 10 mL/min.

RESUMEN

□ Valorización de **bagazo de cerveza (BSG)** artesanal.



Agua Subcrítica (**ASC**)

Reactor **semicontinuo** de lecho fijo

Efecto de **temperatura** (125-185 °C)

F= 4 mL/min

✓ **Proteína:** 78 % de solubilizada a **185 °C**

✓ **Aminoácidos libres:** máximo a **160 °C**

✓ **Compuestos fenólicos totales:** máximo a **185 °C**

RESUMEN

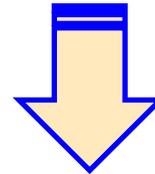
- Valorización de **bagazo de cerveza (BSG)** artesanal.



Agua Subcrítica (**ASC**)

Reactor **semicontinuo** de lecho fijo

Efecto de **temperatura** (125-185 °C)



✓ **Fraccionamiento selectivo de los compuestos bioactivos variando la temperatura.**

ÍNDICE

❑ RESUMEN

➤ **INTRODUCCIÓN**

❑ OBJETIVOS

❑ RESULTADOS

❑ CONCLUSIONES

INTRODUCCIÓN

Agua Subcrítica (ASC)

El **agua** es considerada el disolvente verde por excelencia

El **agua subcrítica (ASC)** es agua a presión en estado líquido entre 100 °C y 374 °C

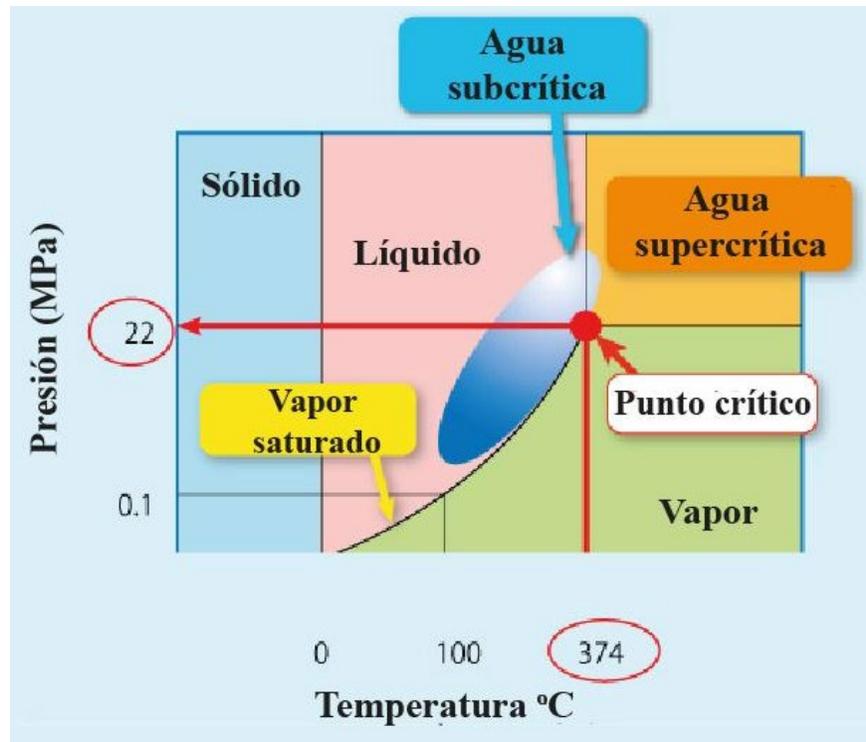


Diagrama de fases del agua. Recuperado de:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15014>

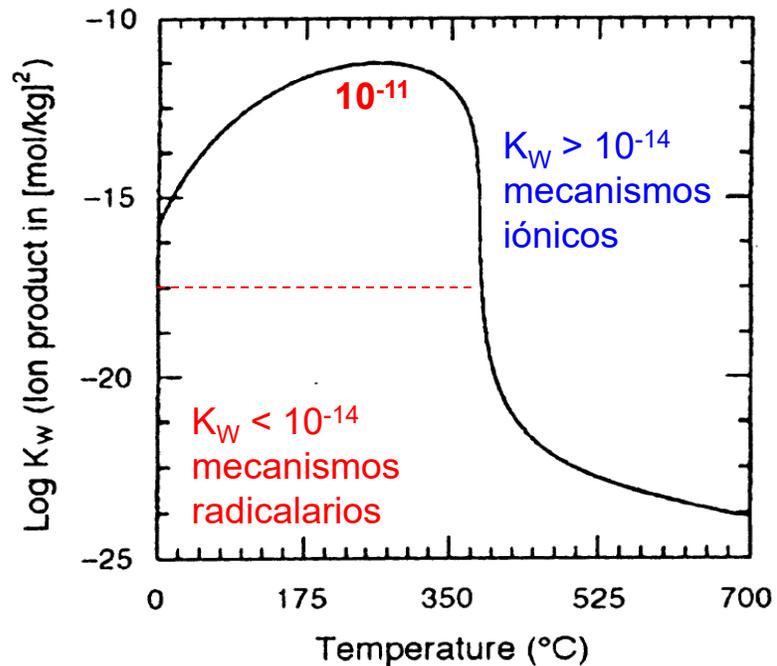
INTRODUCCIÓN



Agua Subcrítica (ASC)

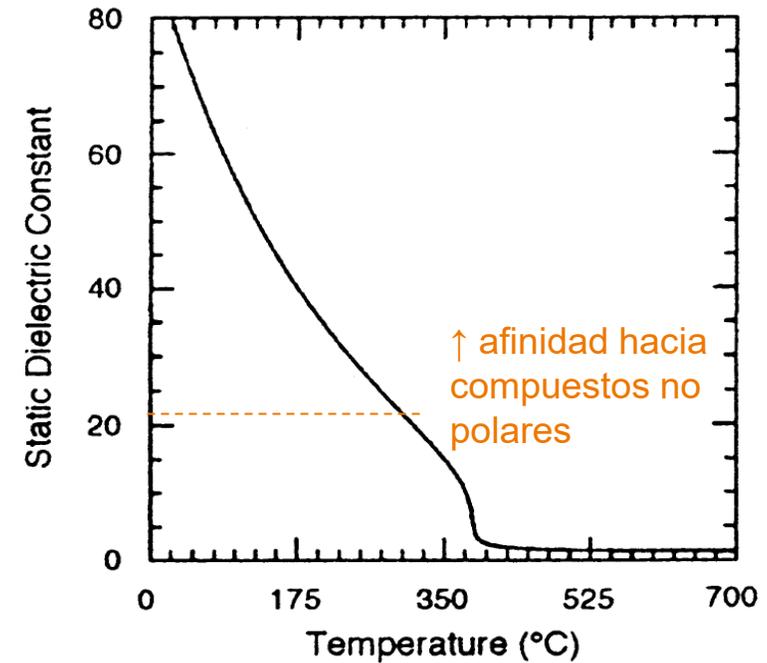
Propiedades únicas con la temperatura

↑ Producto iónico



Producto iónico

↓ Constante dieléctrica

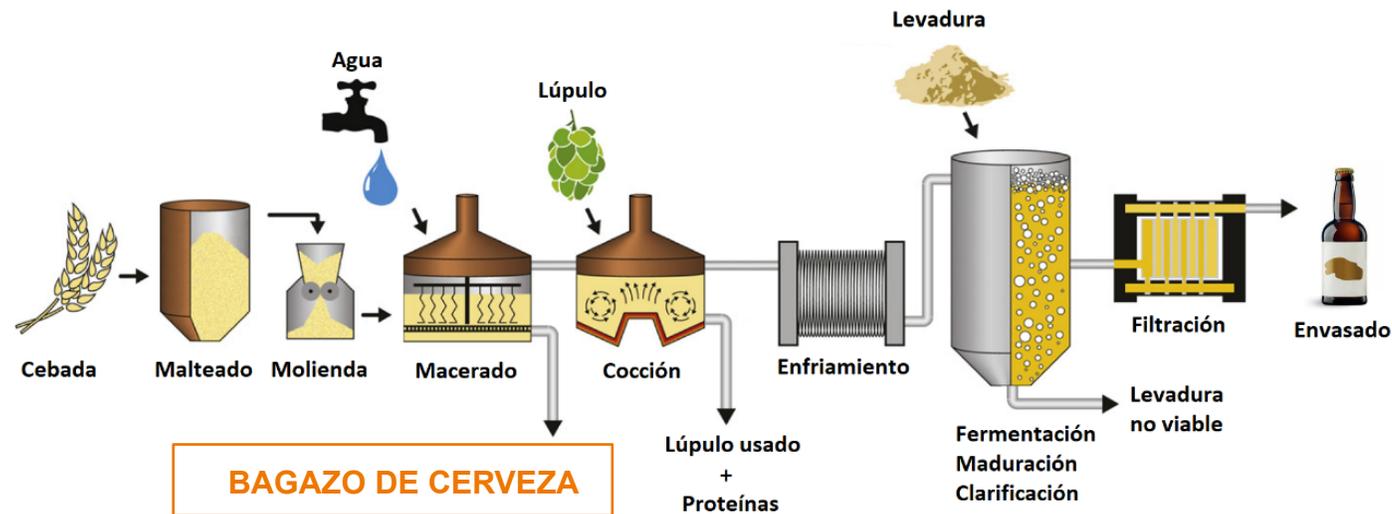


Constante dieléctrica

INTRODUCCIÓN



Bagazo de cerveza (BSG)



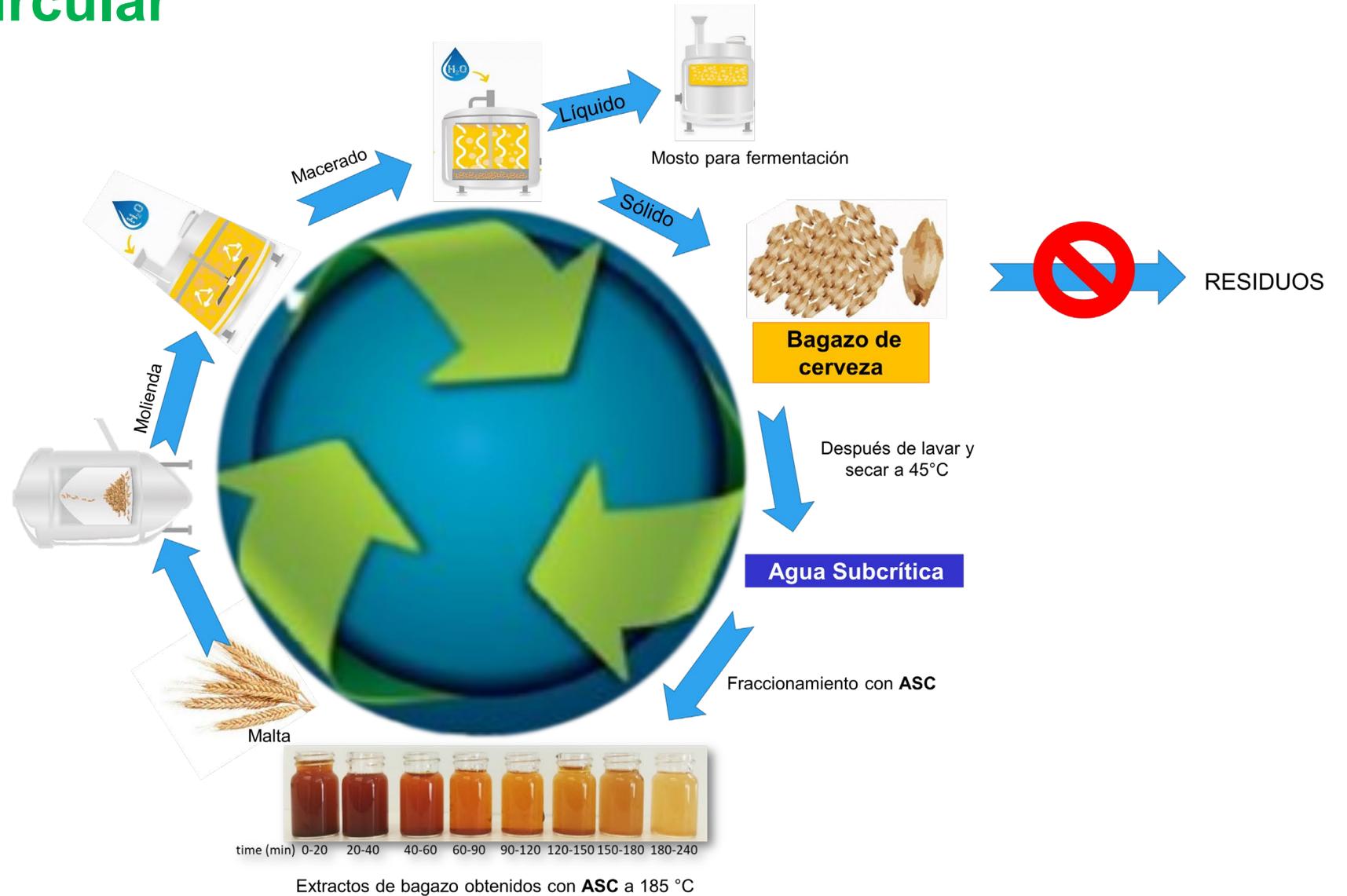
85% de los subproductos

- ✓ 20 kg de bagazo / 100 L de cerveza. 40 millones de toneladas/año
- Bagazo procedente de una cervecera **artesanal local**
 - ✓ Cerveza artesanal en Europa → 42.52 millones de dólares en 2020

INTRODUCCIÓN

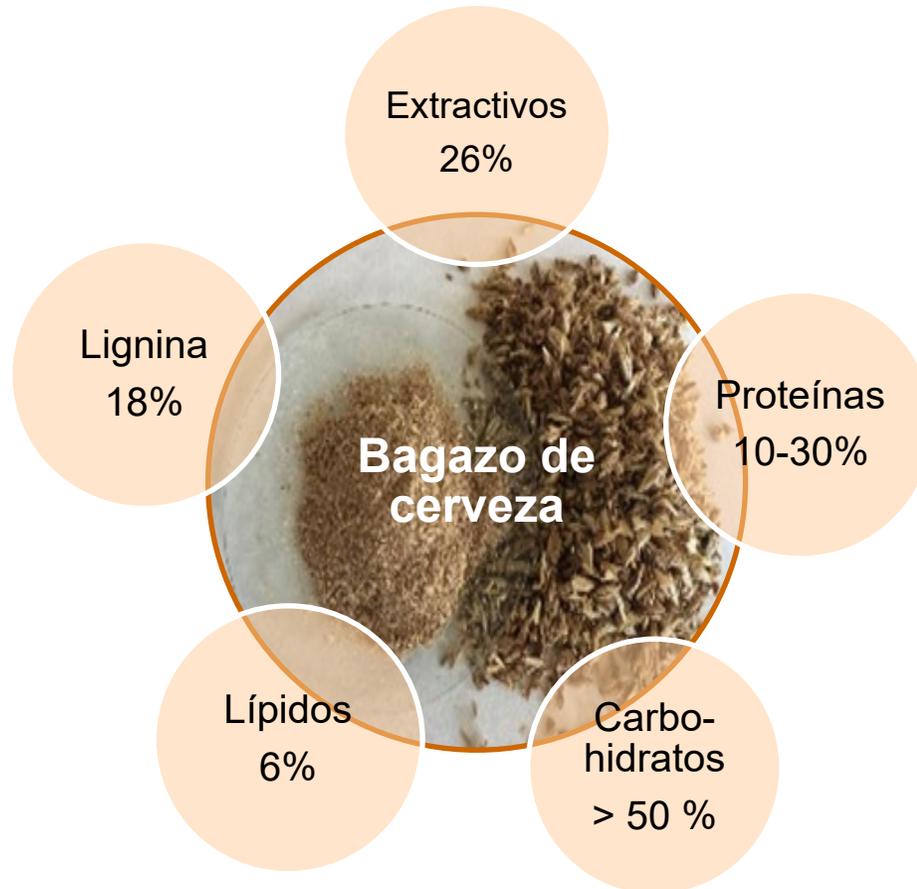


Economía circular





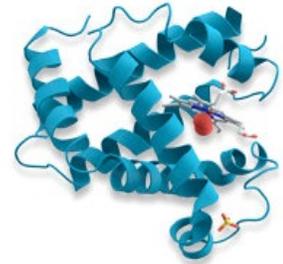
Bagazo de cerveza (BSG)



BSG es un candidato para ser incorporado dentro del concepto de **bioeconomía** y **economía circular**

INTRODUCCIÓN

● ● ● Aminoácidos libres



Proteínas

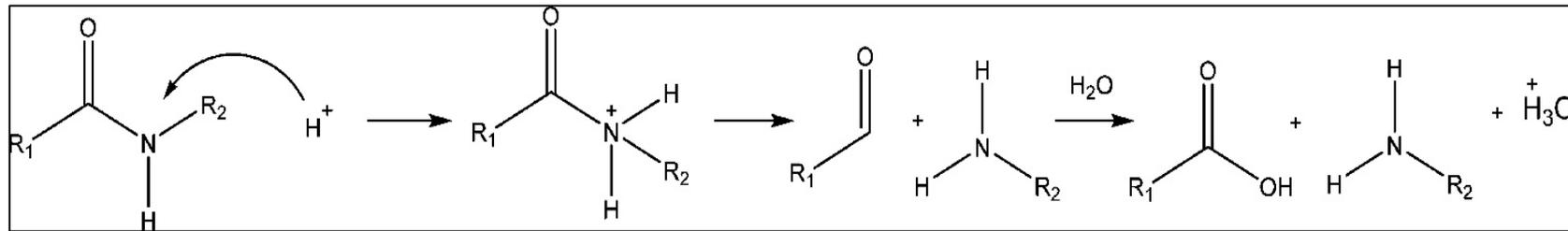


Polipéptidos



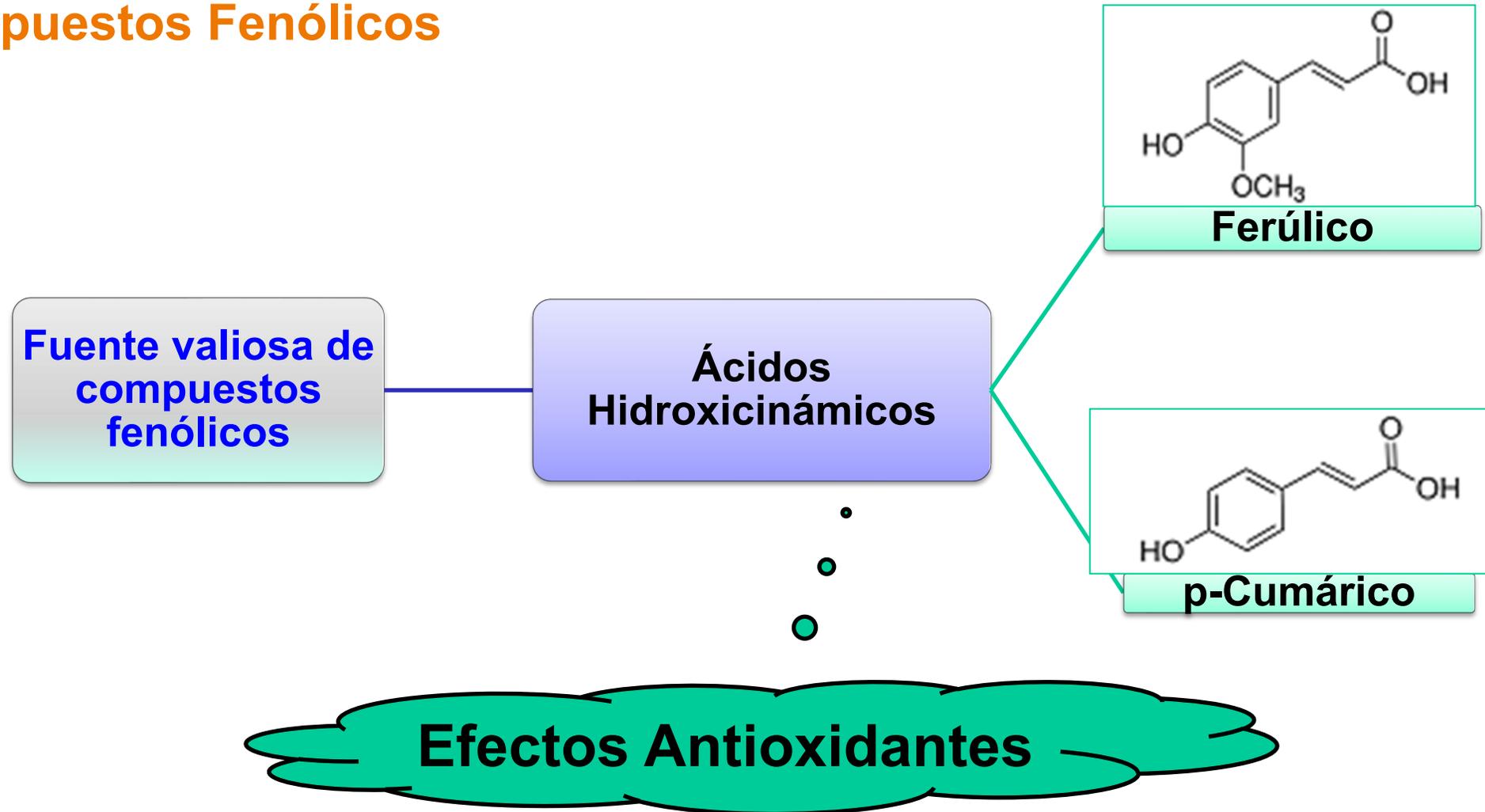
Aminoácidos

Hidrólisis del enlace peptídico



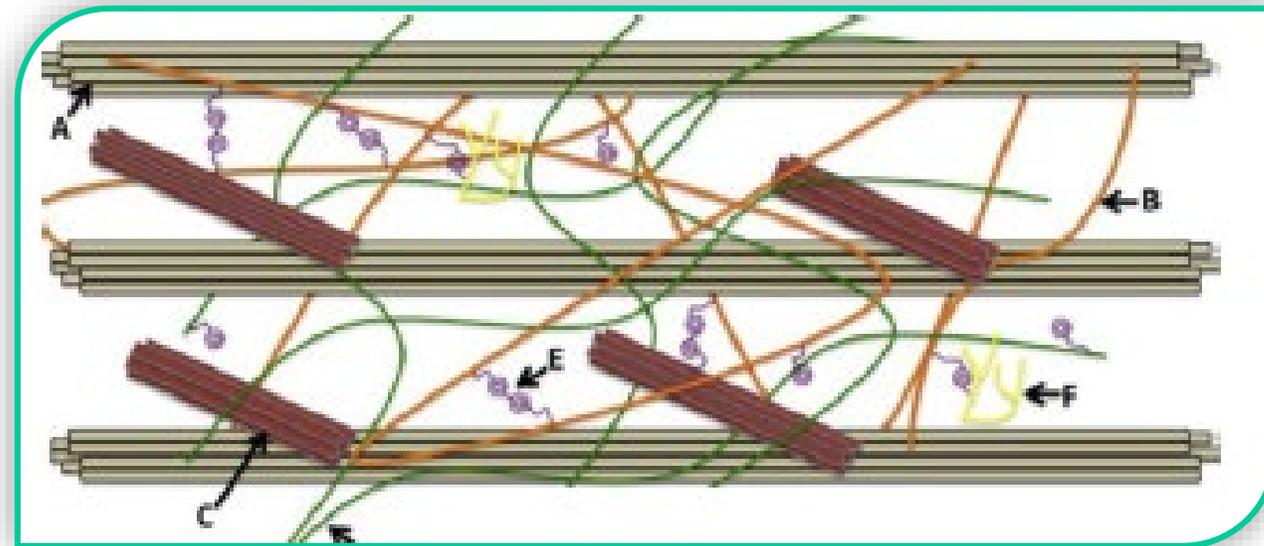
INTRODUCCIÓN

✓ Compuestos Fenólicos



INTRODUCCIÓN

✓ Compuestos Fenólicos



ÍNDICE

❑ RESUMEN

❑ INTRODUCCIÓN

➤ **OBJETIVOS**

❑ RESULTADOS

❑ CONCLUSIONES

OBJETIVOS



¿ASC capaz de extraer/hidrolizar la fracción proteica del BSG?

Caracterizar Compuestos Fenólicos

Capacidad antioxidante de los extractos

Comparar con métodos convencionales

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

RESULTADOS

CONCLUSIONES

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

• **Caracterización del bagazo de cerveza**

• **Extracción de Proteínas**

• **Aminoácidos libres**

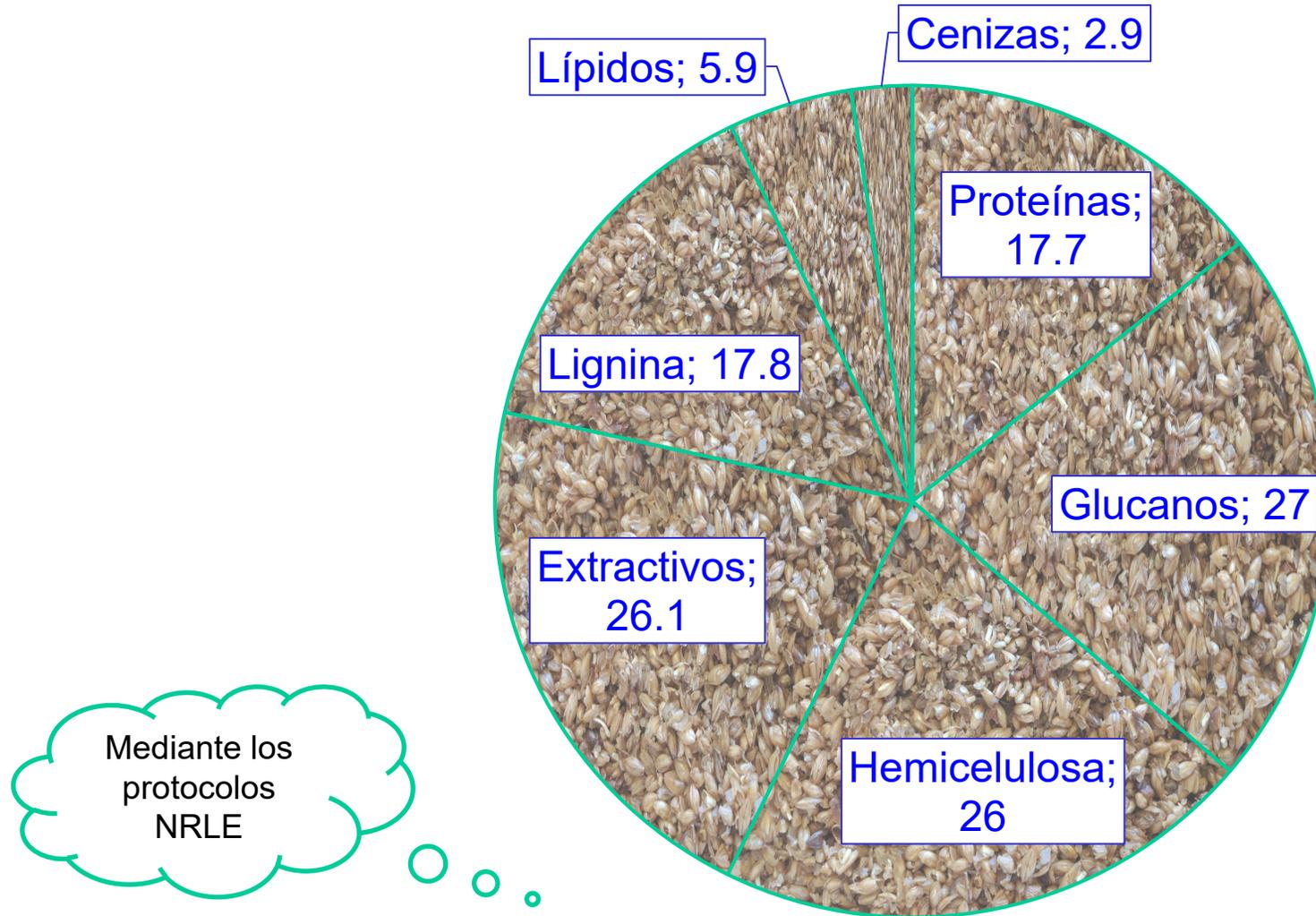
• **Contenido fenólico total y actividad antioxidante**

CONCLUSIONES

RESULTADOS



Caracterización del bagazo de cerveza

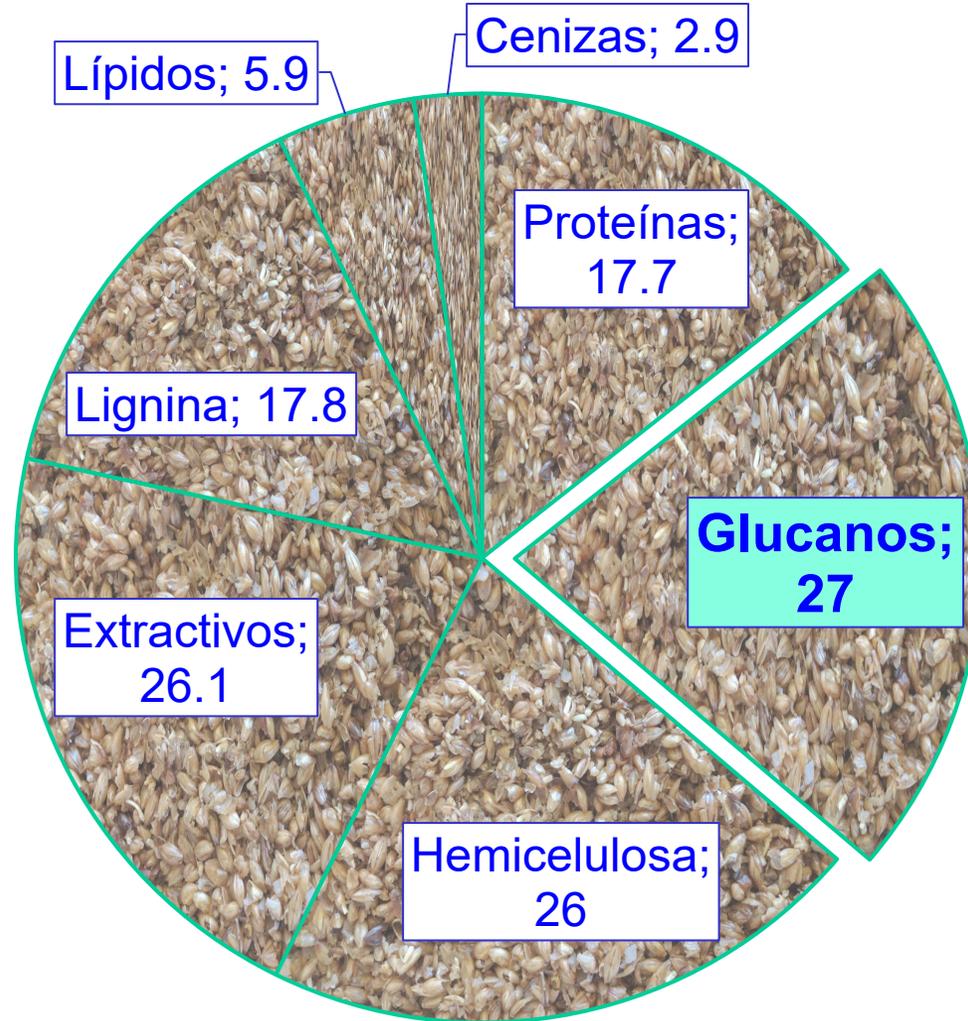


Composición BSG, g/100g_{BSG seco}

RESULTADOS



Caracterización del bagazo de cerveza



Glucanos:

Celulosa
18,5 %

Almidón:
7,9 %

β -Glucanos:
0,6 %

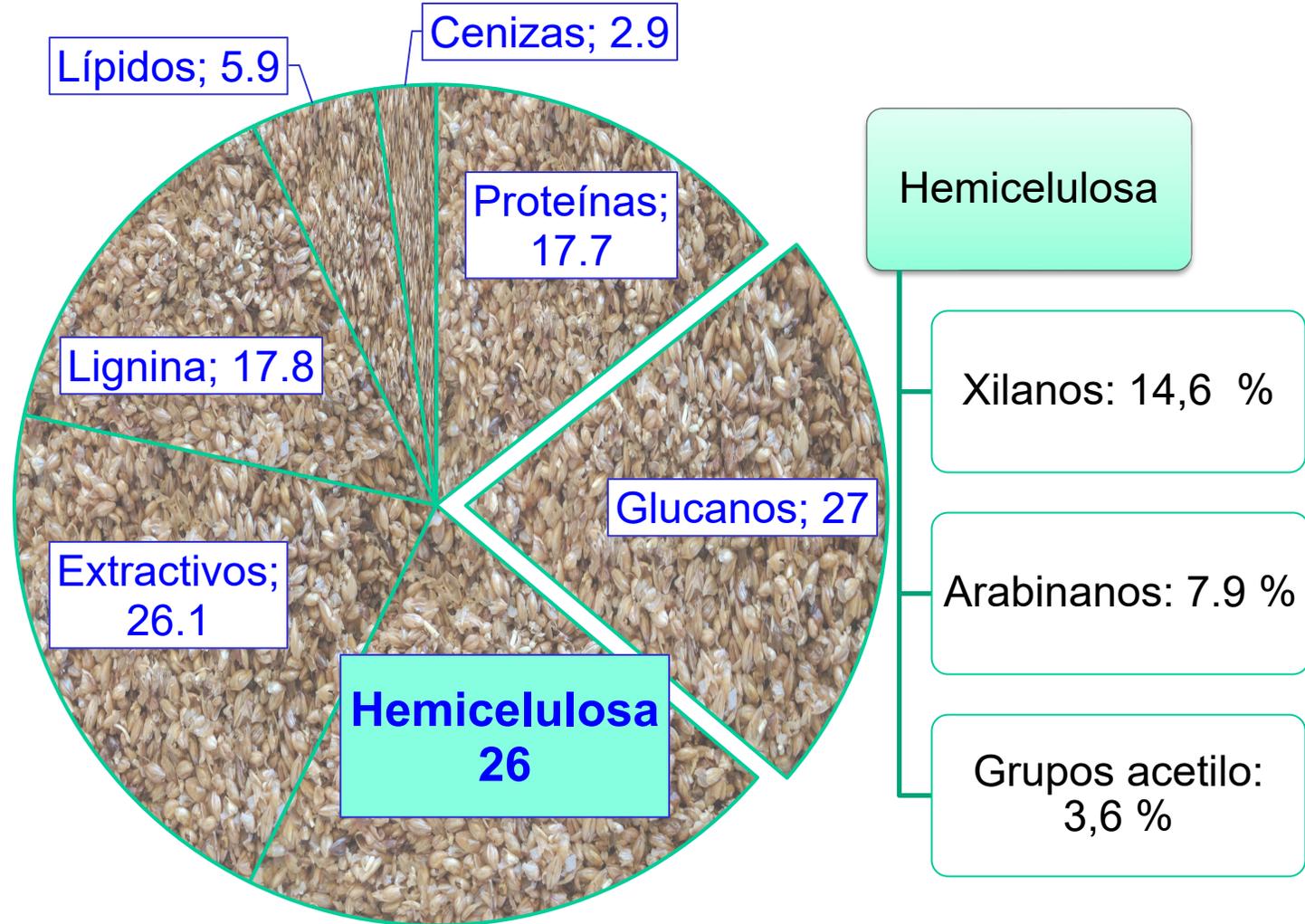
Mediante los
protocolos
NRLE

Composición BSG, g/100g_{BSG seco}

RESULTADOS



Caracterización del bagazo de cerveza



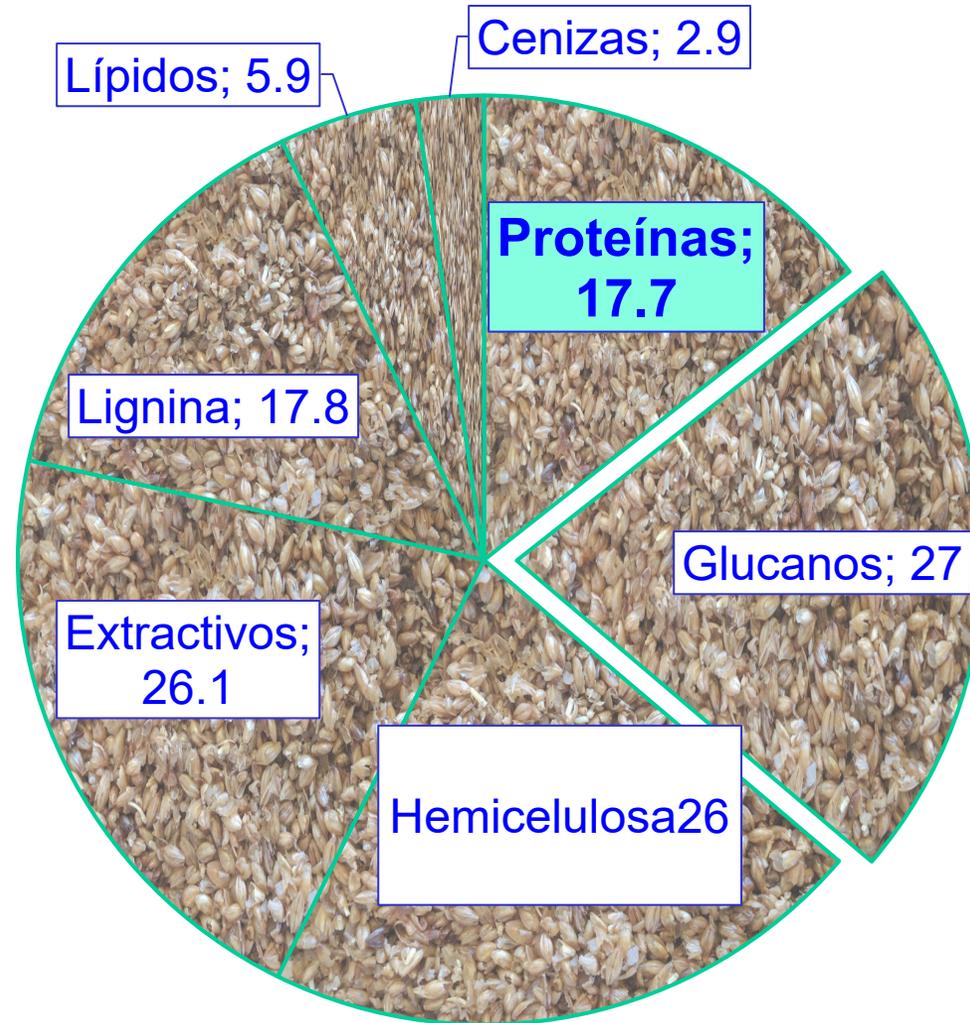
Mediante los protocolos NRLE

Composición BSG, g/100g_{BSG seco}

RESULTADOS



Caracterización del bagazo de cerveza



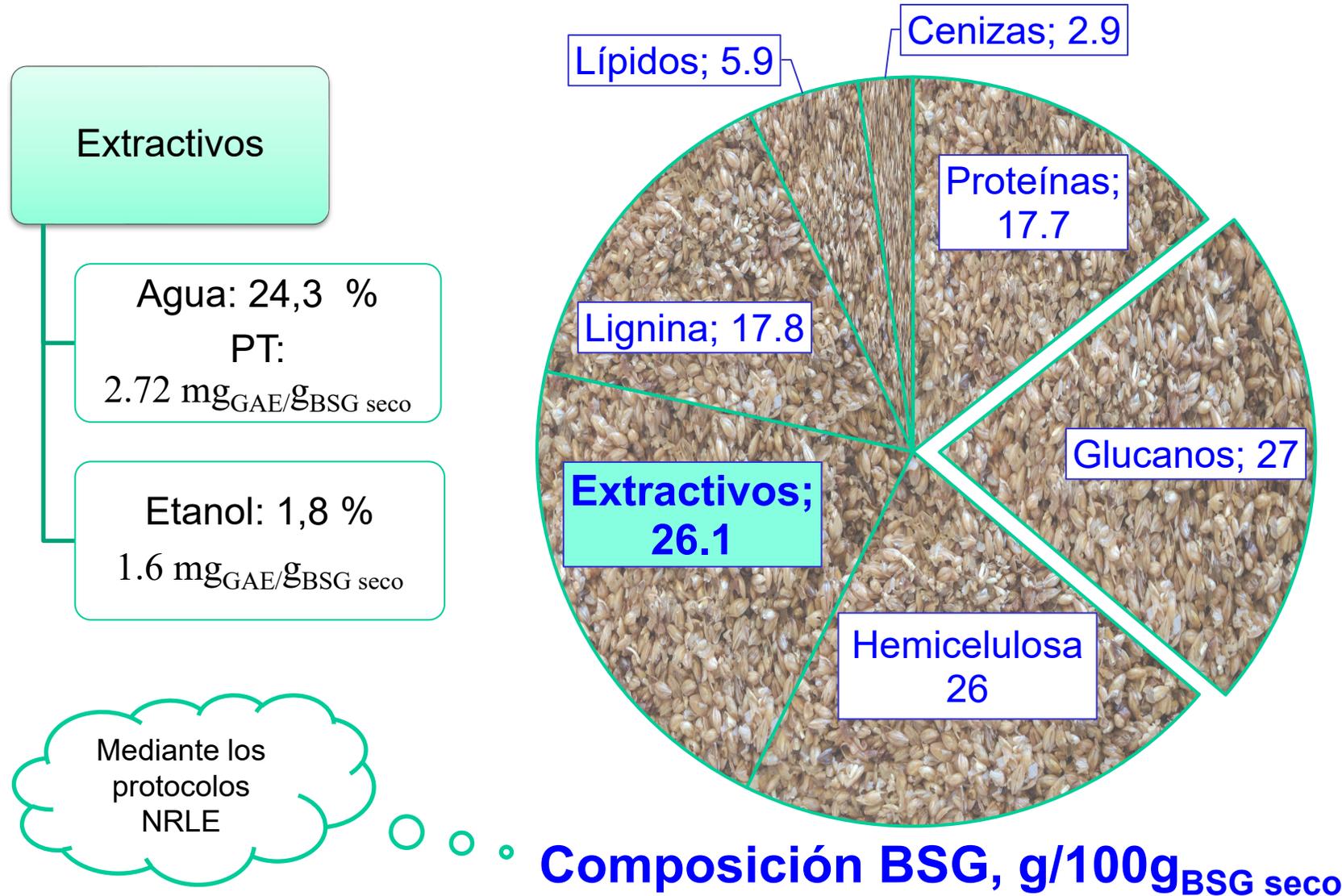
Mediante los
protocolos
NRLE

Composición BSG, g/100g_{BSG seco}

RESULTADOS



Caracterización del bagazo de cerveza



ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

RESULTADOS

• Caracterización del bagazo de cerveza

• **Extracción de Proteínas**

• Aminoácidos libres

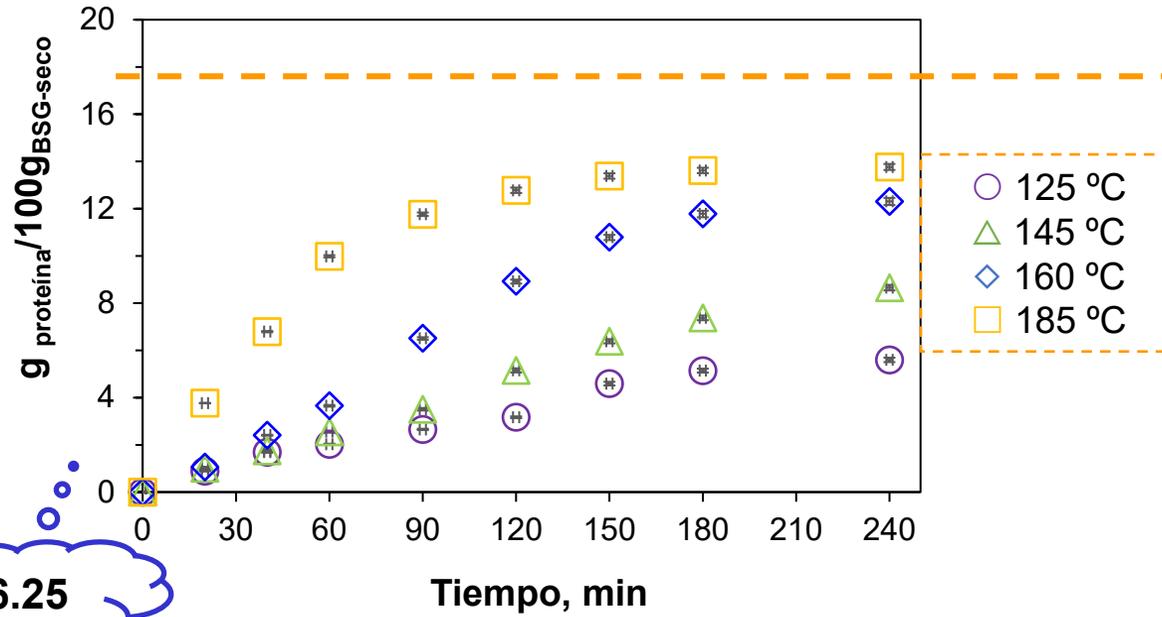
• Contenido fenólico total y actividad antioxidante

CONCLUSIONES

RESULTADOS



Extracción de Proteínas



17.7 g/100g_{BSG seco} (Proteína total)

Rendimiento

$$\% R = \frac{\text{Proteína en el extracto}}{\text{Proteína en la materia prima}} \cdot 100$$

NT-6.25

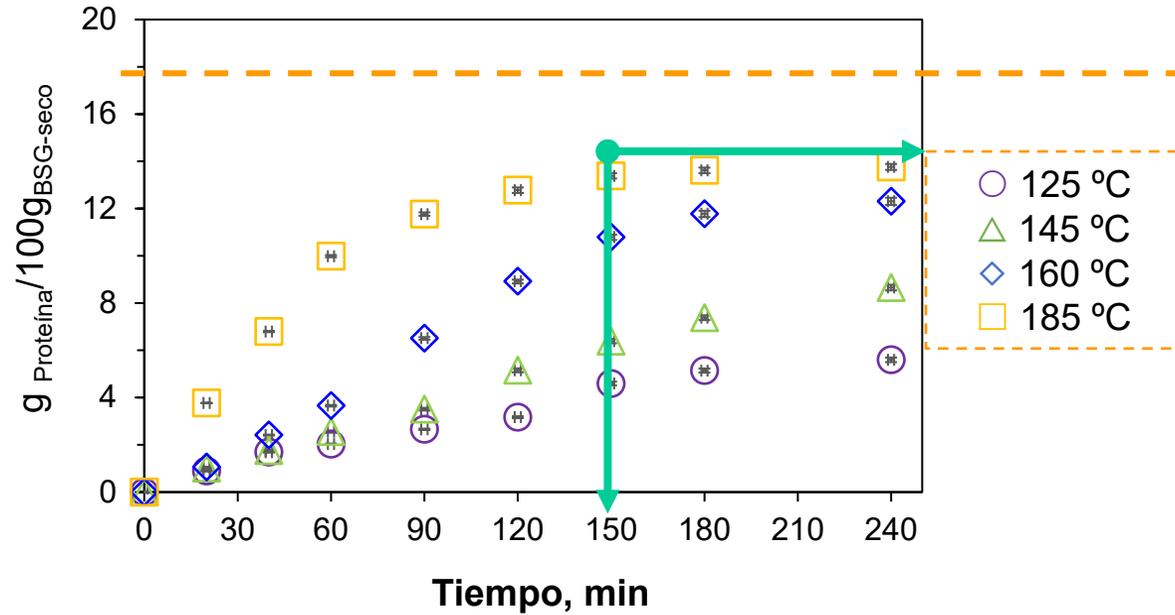
Curva acumulativa de proteína solubilizada

T, °C	R, %
185	77.7
160	69.5
145	52.6
125	31.6

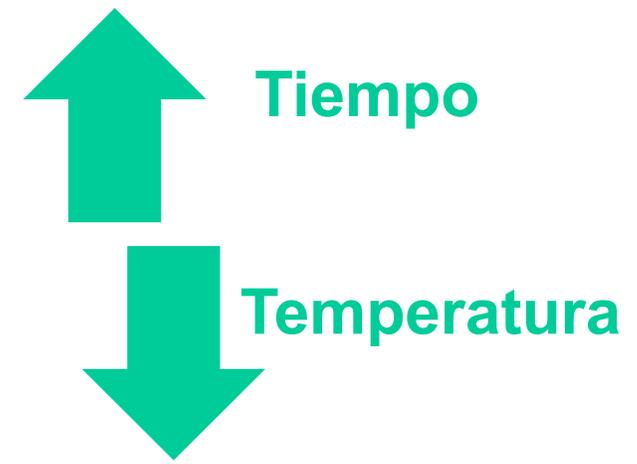
RESULTADOS



Extracción de Proteínas

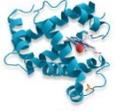


17.7 g/100g_{BSG-seco} (Proteína total)



Curva acumulativa de proteína solubilizada

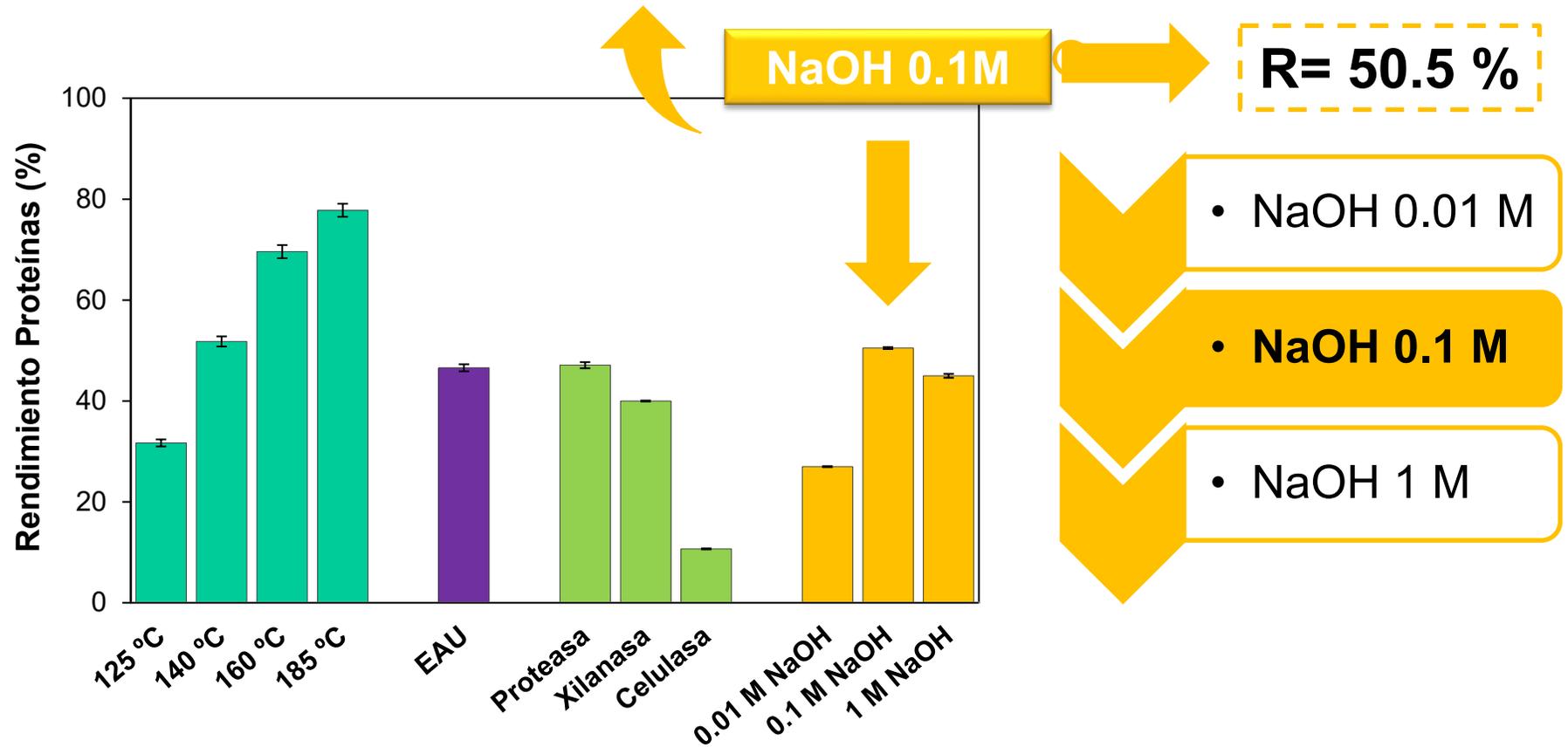
RESULTADOS



Extracción de Proteínas

Comparación con otros métodos

Extracción Alcalina

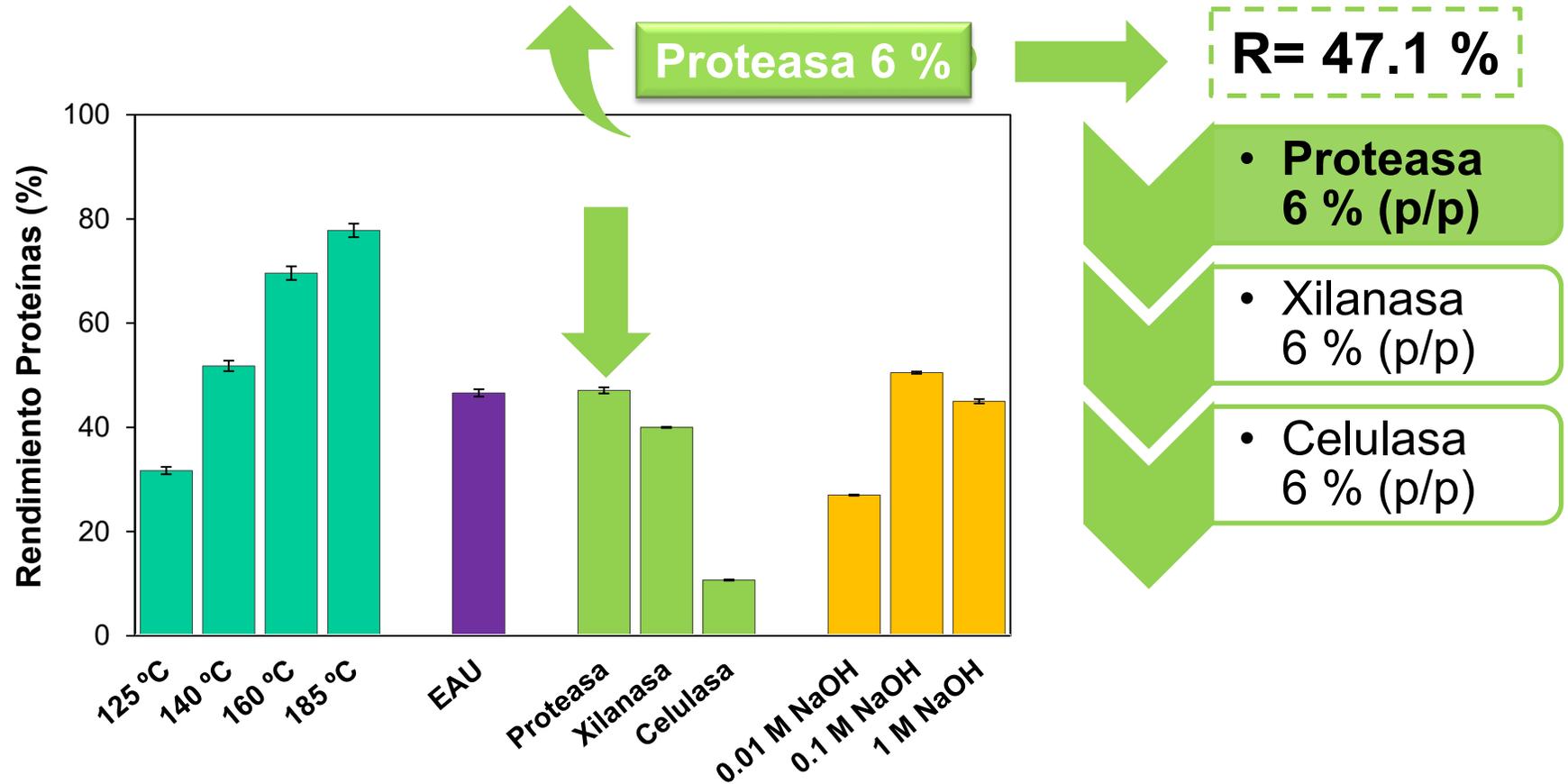


RESULTADOS



Extracción de Proteínas

Comparación con otros métodos



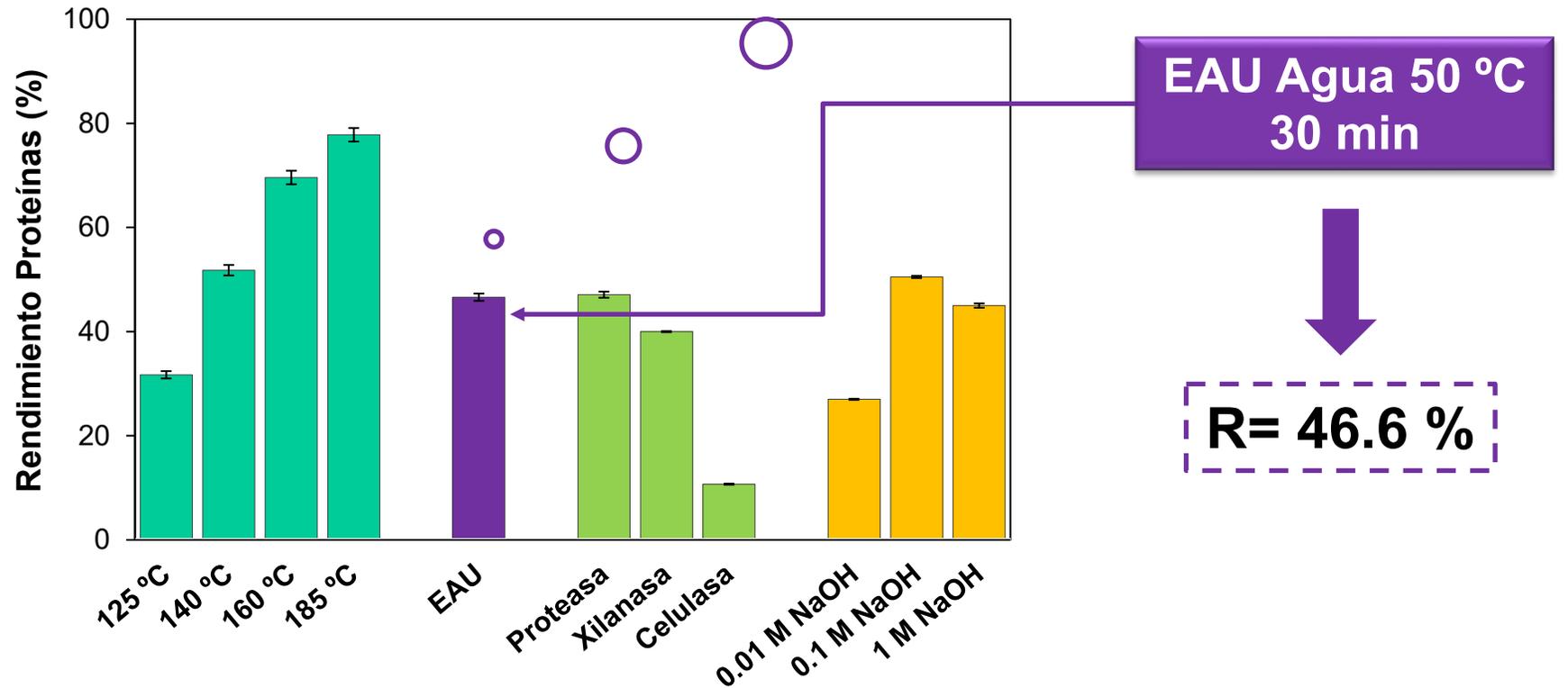
RESULTADOS



Extracción de Proteínas

Comparación con otros métodos

Extracción Asistida por Ultrasonidos



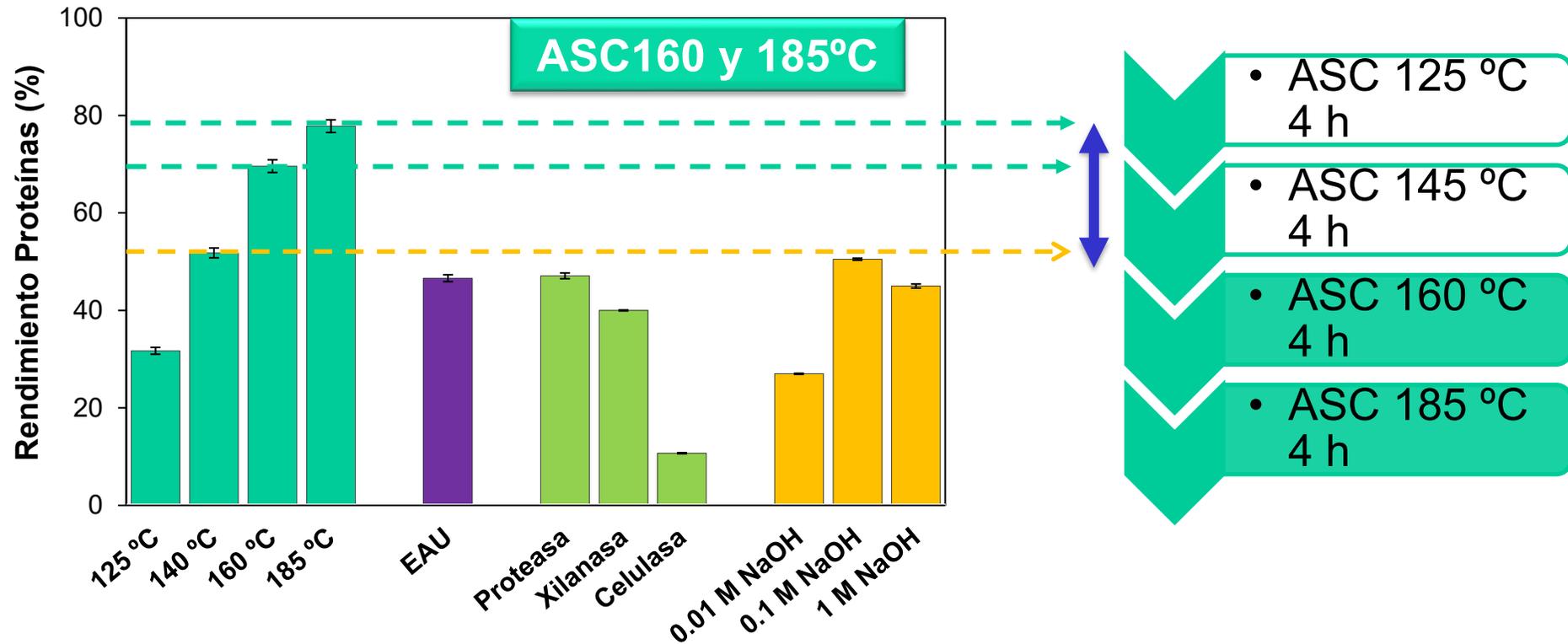
RESULTADOS



Extracción de Proteínas

Comparación con otros métodos

Extracción
ASC



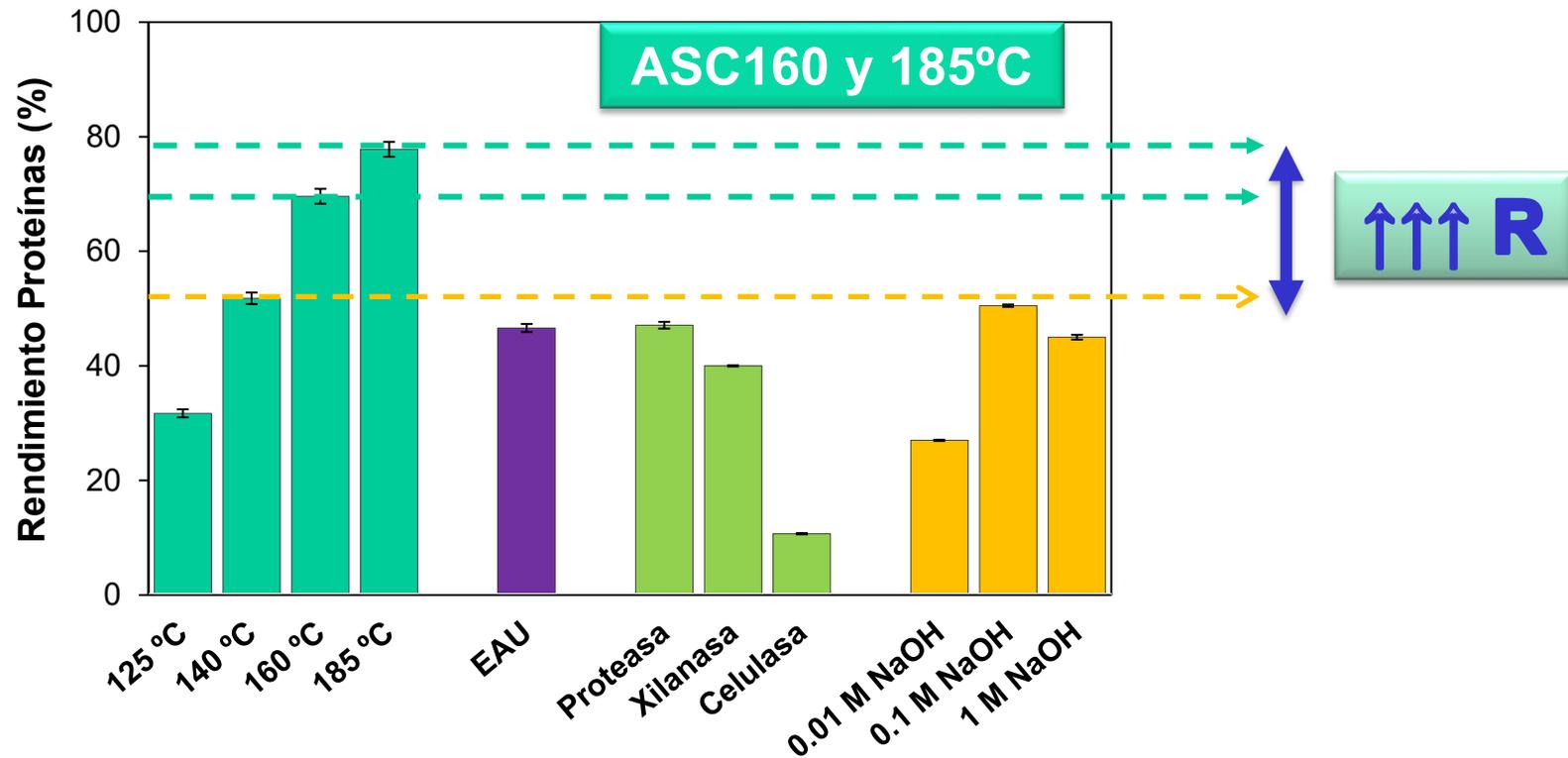
RESULTADOS



Extracción de Proteínas

Comparación con otros métodos

Extracción
ASC



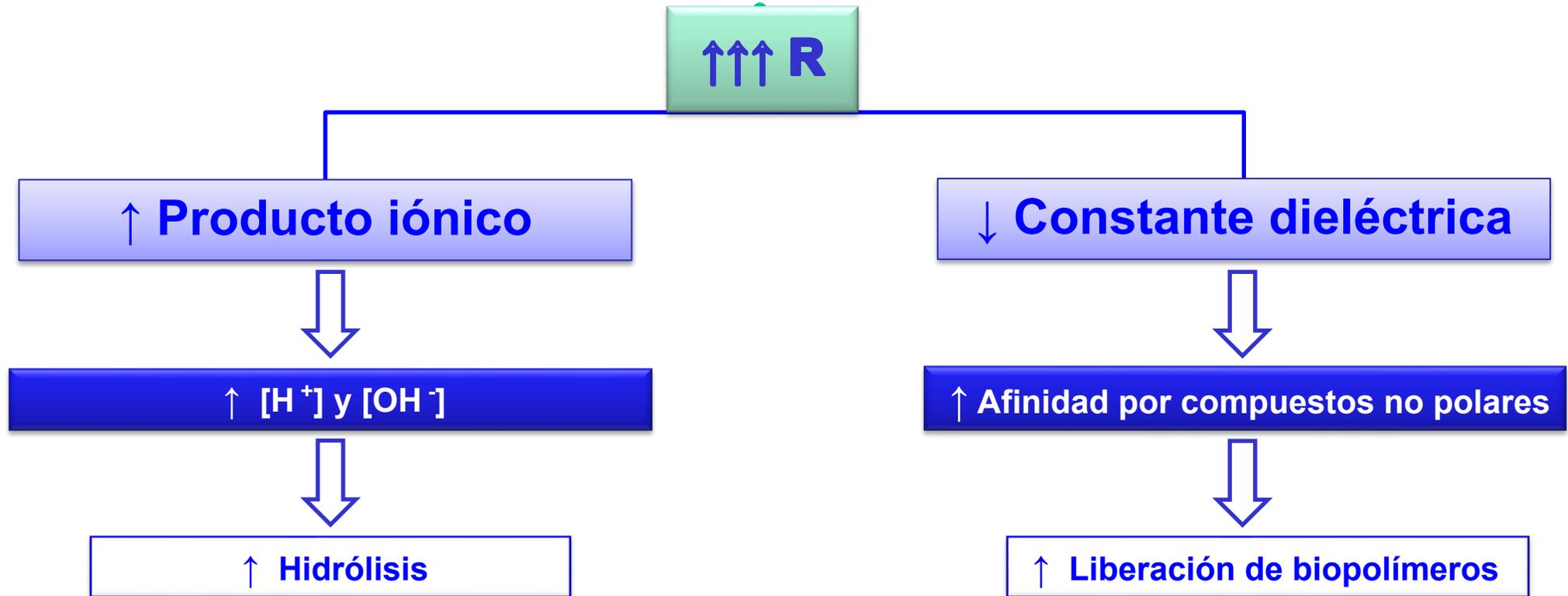
RESULTADOS



Extracción de Proteínas

Comparación con otros métodos

Extracción
ASC



ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

RESULTADOS

• Caracterización del bagazo de cerveza

• Extracción de Proteínas

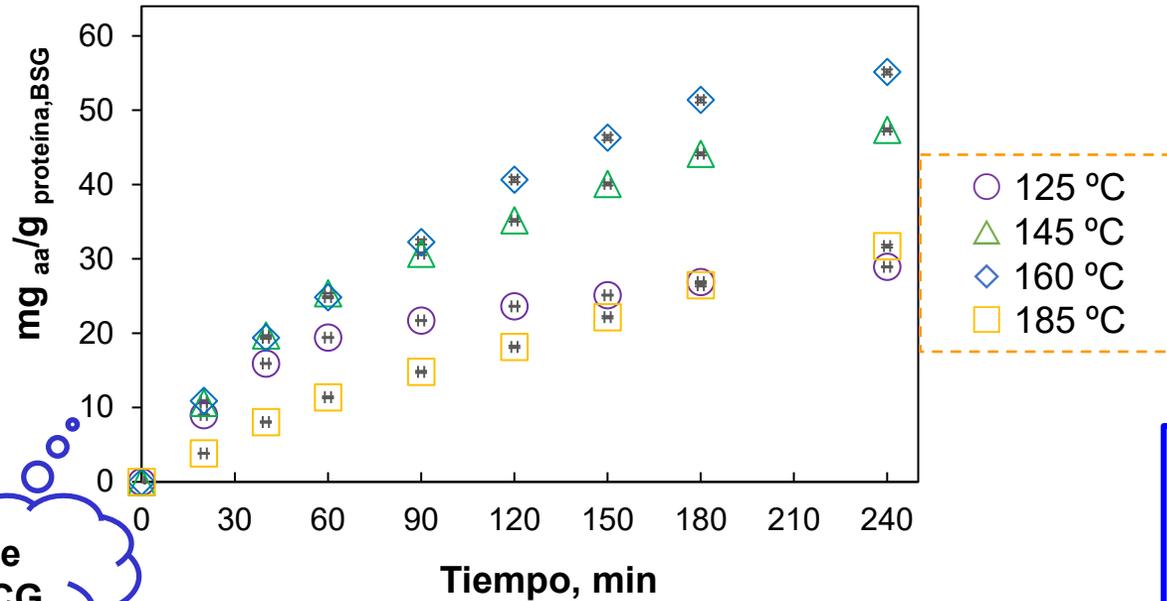
• **Aminoácidos libres**

• Contenido fenólico total y actividad antioxidante

CONCLUSIONES

RESULTADOS

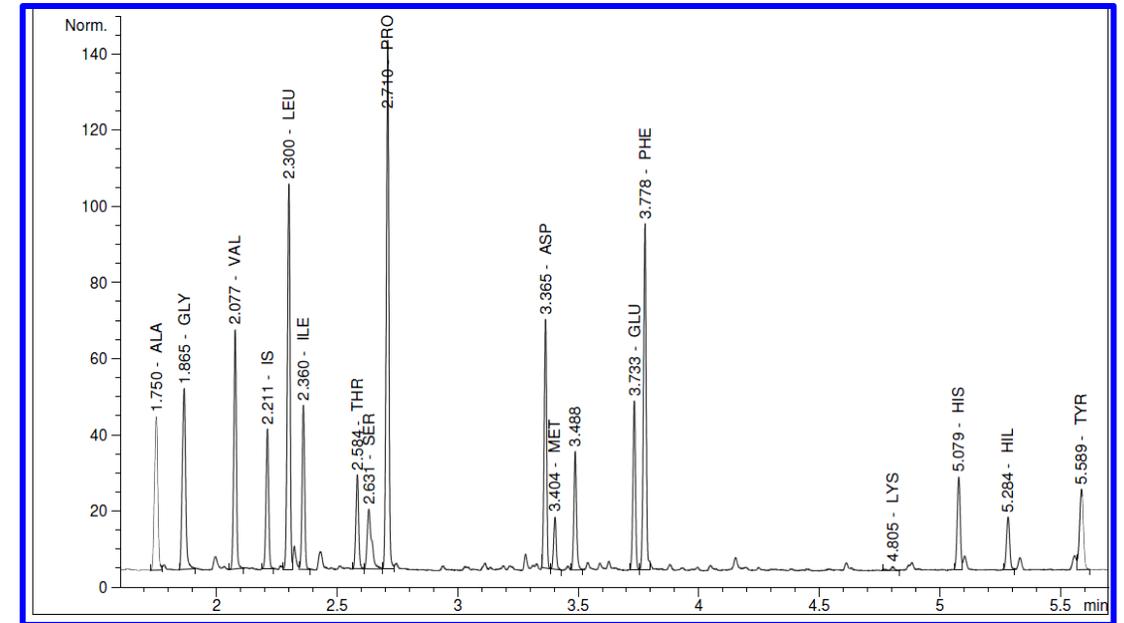
● ● ● Aminoácidos libres



Suma de aa por CG

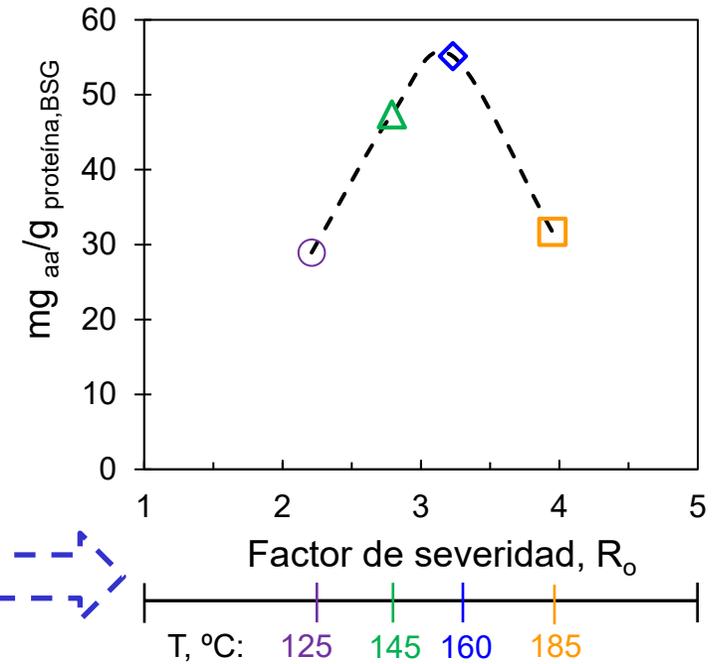
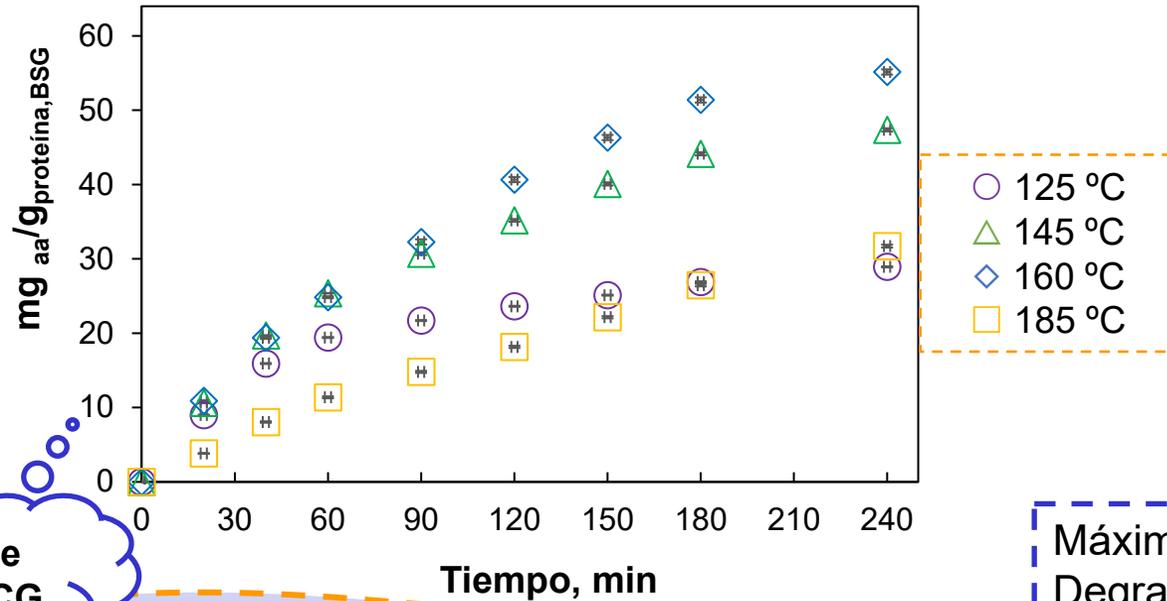
CG de aa libres

Curva acumulativa de aminoácidos libres



RESULTADOS

● ● ● Aminoácidos libres



Suma de aa por CG

Curva acumulativa de aminoácidos libres

$$\log R_o = \log \left(t \cdot \exp^{(T-T_{ref})/14.75} \right)$$

t, tiempo min
T, temperatura °C

V: volumen del reactor, m³
ρ: densidad del agua kg·m⁻³ (ρ, T)
F: flujo másico, kg·min⁻¹

$$\tau = \frac{V\rho}{F}$$

Máximo a 160 °C
Degradación de los aa para $R_o > 3.2$

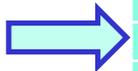
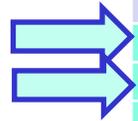
Altos tiempos de residencia:
 $\tau \approx 29 \text{ min}$

RESULTADOS

Aminoácidos libres

Perfil de aa del bagazo y de los efluentes de ASC, mg_{aa}/g_{proteína-BSG}

Aminoácido	Bagazo	125 °C	145 °C	160 °C	185 °C
ALA	48.1	2.46	3.08	3.29	3.62
GLY	41.9	0.84	1.28	1.91	3.16
*VAL	122.6	1.56	2.30	3.25	4.76
*LEU	87.1	1.39	2.13	2.35	2.43
*ILE	69.3	0.74	1.18	1.42	1.40
*THR	41.1	0.73	1.07	1.12	0.70
SER	44.1	1.96	2.86	2.43	1.21
PRO	123.2	1.93	2.25	2.28	1.94
ASP	69.5	3.32	10.17	15.35	4.38
*MET	19.0	0.24	0.85	1.25	0.17
HYP	4.3	0.00	0.14	0.10	0.02
GLU	116.8	6.30	6.15	4.26	1.15
*PHE	68.0	1.46	1.83	1.61	1.37
*LYS	82.7	2.08	6.98	4.74	1.57
*HIS	22.8	1.47	1.92	1.93	1.08
HYL	0.0	0.00	0.00	5.03	0.17
TYR	22.5	2.20	2.80	1.85	2.35
*TRP	14.7	0.26	0.40	0.67	0.02
C-C	4.7	0.00	0.00	0.33	0.22
AT	1002.4	28.9	47.4	55.2	31.7
EAT	527.5	9.9	18.6	18.3	13.5
AET/AT (%)	52.6	34.28	39.4	33.23	42.54
Apolar/AT	0.63	0.43	0.37	0.38	0.66



*aa esenciales

53 % de los
aa del
bagazo son
esenciales

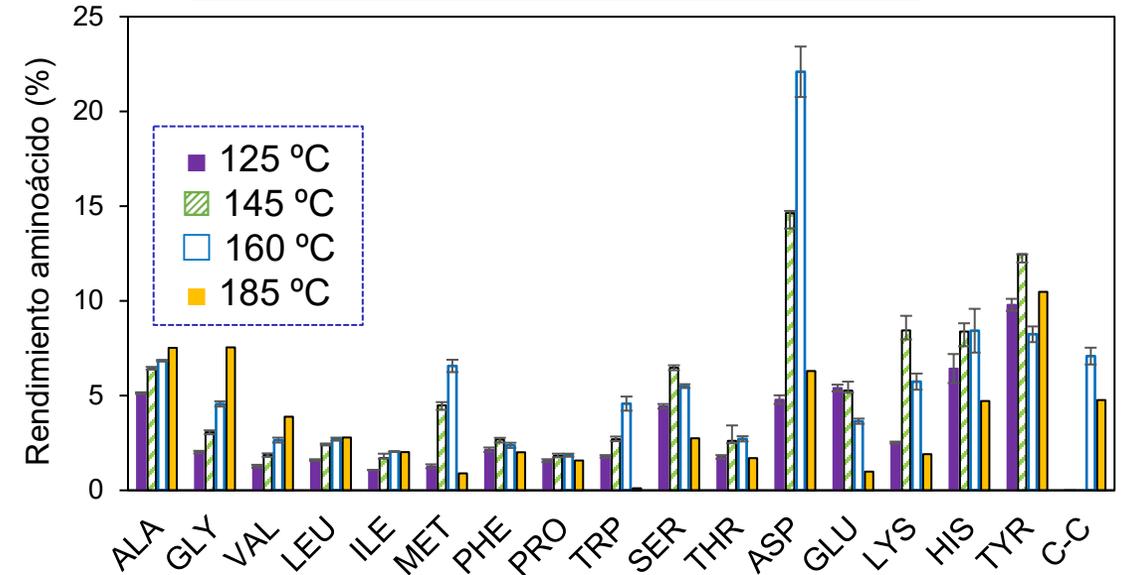
RESULTADOS

Aminoácidos libres

Perfil de aa del bagazo y de los efluentes de ASC, $\text{mg}_{aa}/\text{g}_{\text{proteína-BSG}}$

Aminoácido	Bagazo	125 °C	145 °C	160 °C	185 °C
ALA	48.1	2.46	3.08	3.29	3.62
GLY	41.9	0.84	1.28	1.91	3.16
VAL	122.6	1.56	2.30	3.25	4.76
LEU	87.1	1.39	2.13	2.35	2.43
ILE	69.3	0.74	1.18	1.42	1.40
THR	41.1	0.73	1.07	1.12	0.70
SER	44.1	1.96	2.86	2.43	1.21
PRO	123.2	1.93	2.25	2.28	1.94
ASP	69.5	3.32	10.17	15.35	4.38
MET	19.0	0.24	0.85	1.25	0.17
HYP	4.3	0.00	0.14	0.10	0.02
GLU	116.8	6.30	6.15	4.26	1.15
PHE	68.0	1.46	1.83	1.61	1.37
LYS	82.7	2.08	6.98	4.74	1.57
HIS	22.8	1.47	1.92	1.93	1.08
HYL	0.0	0.00	0.00	5.03	0.17
TYR	22.5	2.20	2.80	1.85	2.35
TRP	14.7	0.26	0.40	0.67	0.02
C-C	4.7	0.00	0.00	0.33	0.22
AT	1002.4	28.9	47.4	55.2	31.7
EAT	527.5	9.9	18.6	18.3	13.5
AET/AT (%)	52.6	34.28	39.4	33.23	42.54
Apolar/AT	0.63	0.43	0.37	0.38	0.66

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{mg } aa_T}{\text{mg } aa_{BSG}} \cdot 100$$



Rendimiento final de aa individuales en función de la temperatura

$R_{\text{máx}} a \neq T$
para cada aa

RESULTADOS

Aminoácidos libres

Aminoácidos Polares

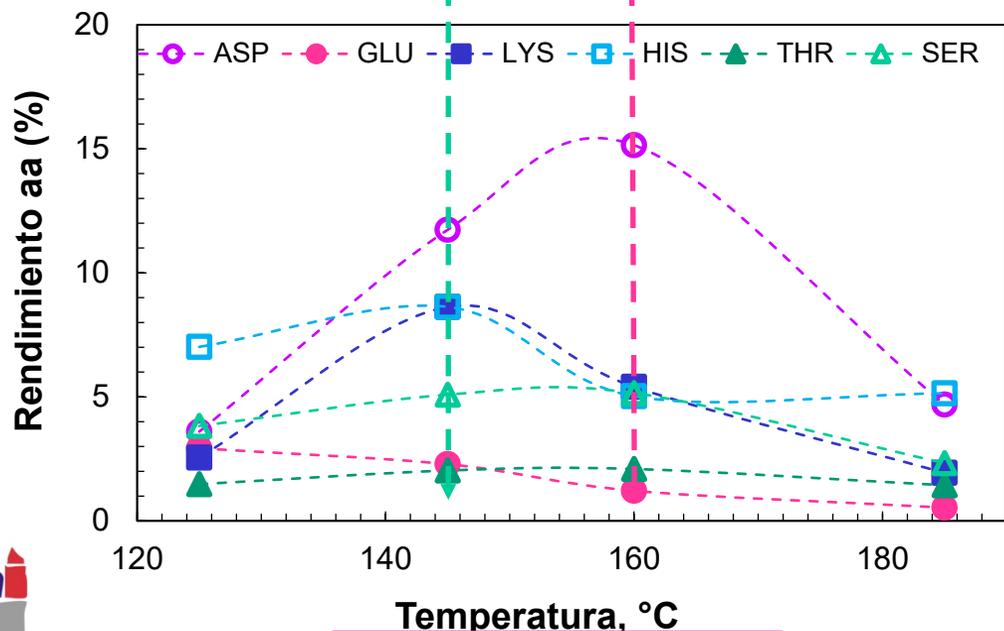
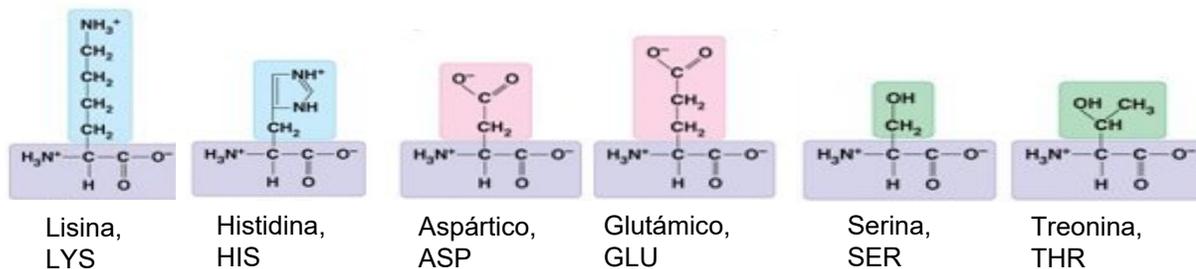
Carga



Carga

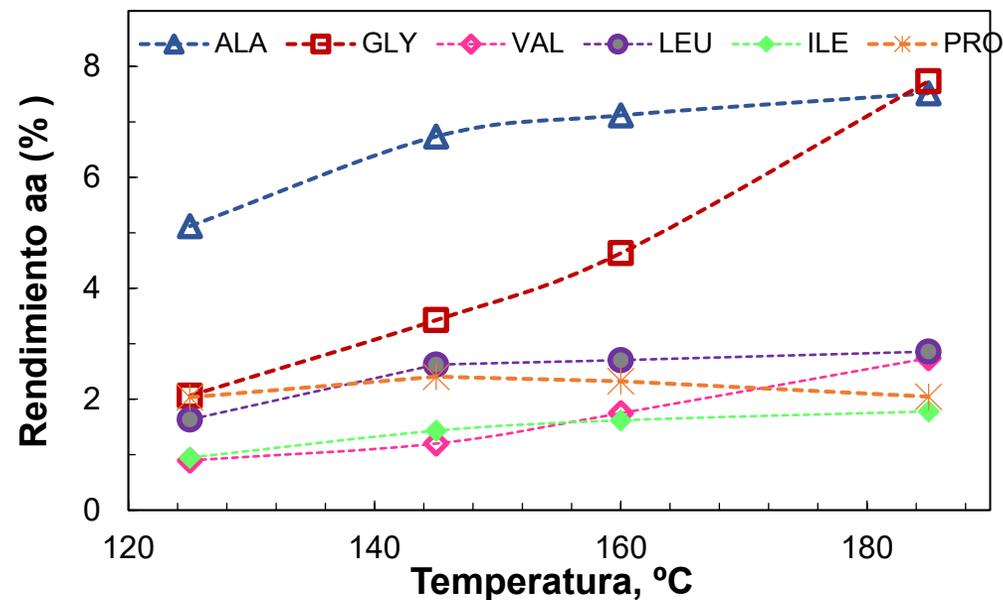
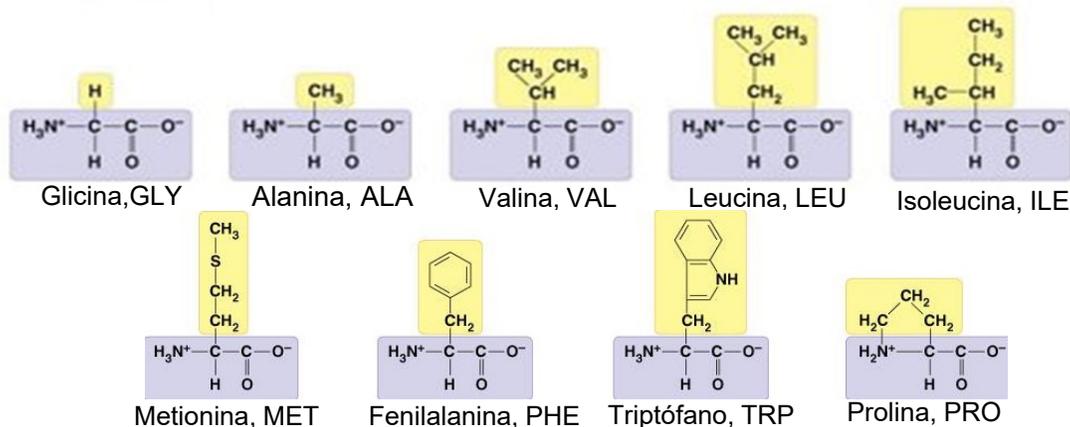


Polares Neutros



$R_{\text{máx}}$ a 145-160 °C

Aminoácidos NO Polares



↑R a ↑T



RESULTADOS

Aminoácidos libres

Aminoácidos Polares

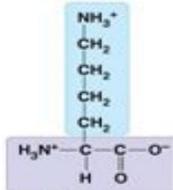
Carga



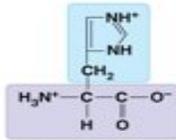
Carga



Polares Neutros



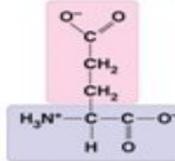
Lisina,
LYS



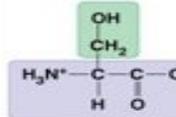
Histidina,
HIS



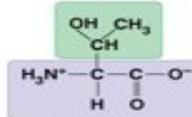
Aspártico,
ASP



Glutámico,
GLU



Serina,
SER



Treonina,
THR

$R_{\text{máx}}$ a 145-160 °C

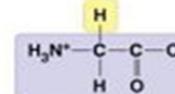
• Hidrófilos

• Lábilis a altas T

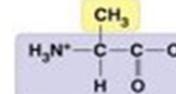
• Reacciones de Maillard



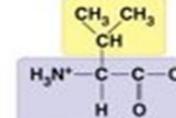
Aminoácidos NO Polares



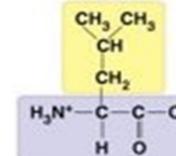
Glicina, GLY



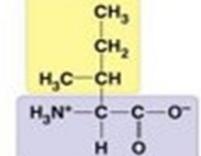
Alanina, ALA



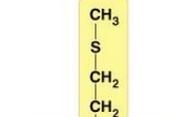
Valina, VAL



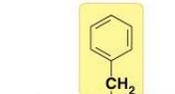
Leucina, LEU



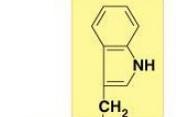
Isoleucina, ILE



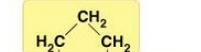
Metionina, MET



Fenilalanina, PHE



Triptófano, TRP



Prolina, PRO

↑R a ↑T

• Hidrofóbicos

• ↓ constante dieléctrica
↑ Afinidad por no polares

• Formación de aa alifáticos por degradación de aa mayores

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

RESULTADOS

• Caracterización del bagazo de cerveza

• Extracción de Proteínas

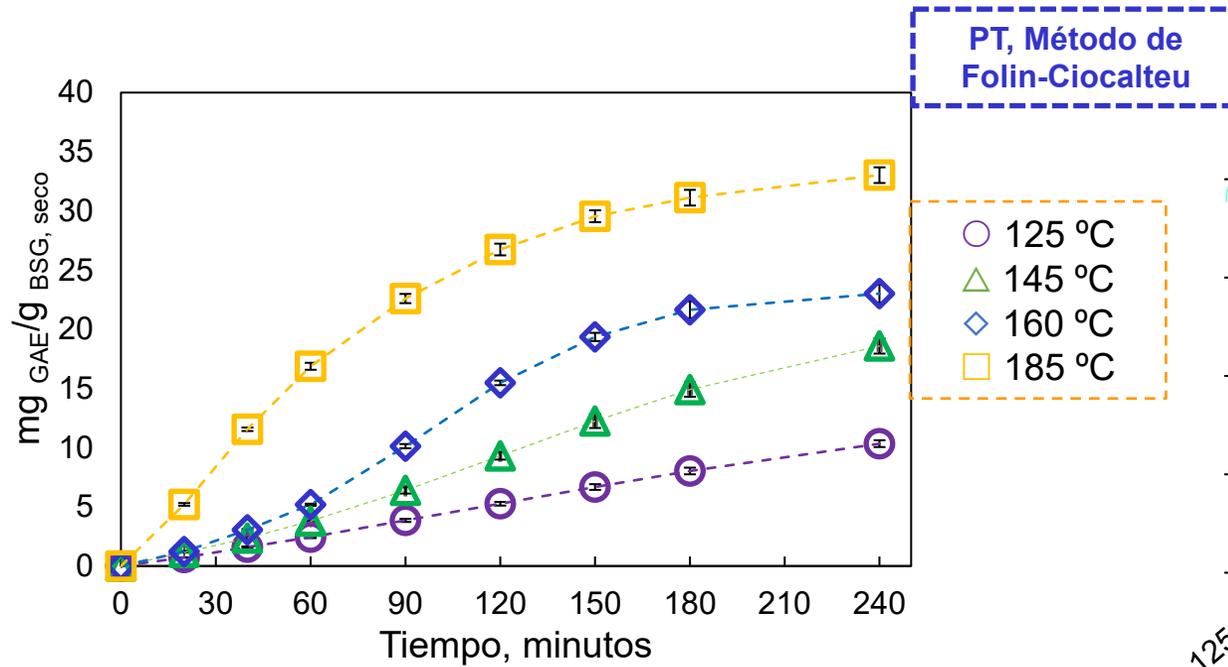
• Aminoácidos libres

• **Contenido fenólico total y actividad antioxidante**

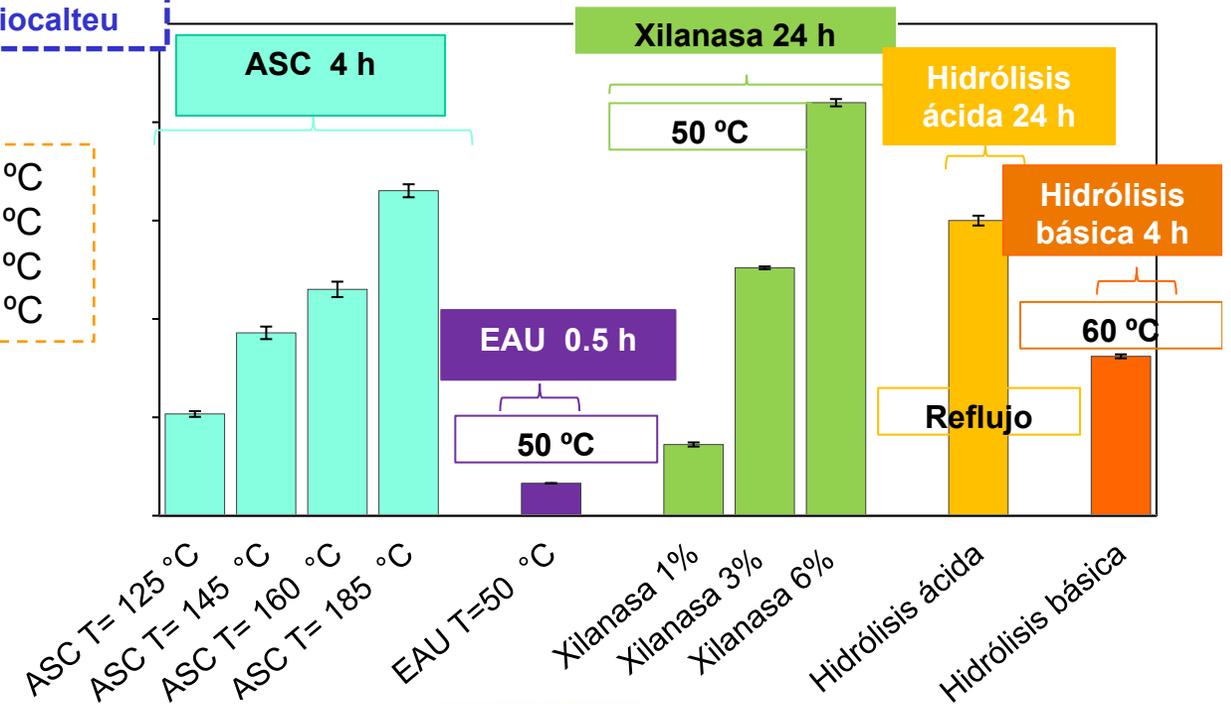
CONCLUSIONES

RESULTADOS

Contenido fenólico total



Comparación con otros métodos hidrolíticos



Curva acumulativa de polifenoles totales, PT con ASC

La liberación de los PT aumenta al aumentar T

ASC a 185 °C
↑PT que
hidrólisis con
ácido y base
y EAU

PT máx.:
xilanasa, 6%, 24 h

RESULTADOS

Contenido fenólico total

Productividad (P) de PT

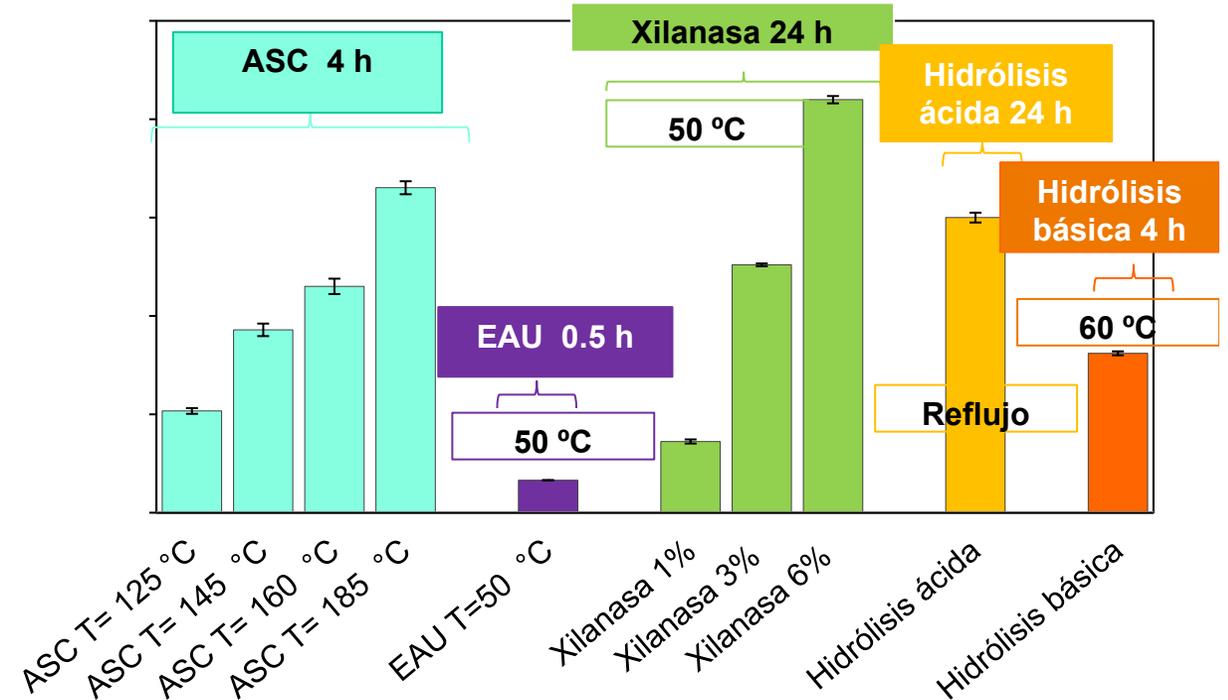
$$P = \frac{mg_{GAE}}{g_{BSG\ seco} \cdot \Delta t}$$

Tratamiento	P mg _{GAE} /(g _{BSG seco} ·min)
ASC T= 160 °C	0.100 ± 0.001
ASC T= 185 °C	0.28 ± 0.01
EAU T= 50 °C	0.109 ± 0.002
Hidrólisis Ácida	No determinado
Hidrólisis Básica	0.55 ± 0.04
Xilanasa 6%	0.087 ± 0.001

P de PT :

ASC 185 °C > hidrólisis enzimática

Comparación con otros métodos hidrolíticos



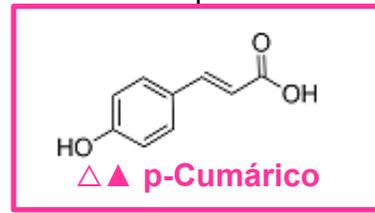
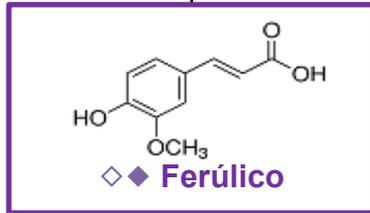
ASC a 185 °C
↑PT que
hidrólisis con
ácido y base
y EAU

PT máx.:
xilanasa, 6%, 24 h

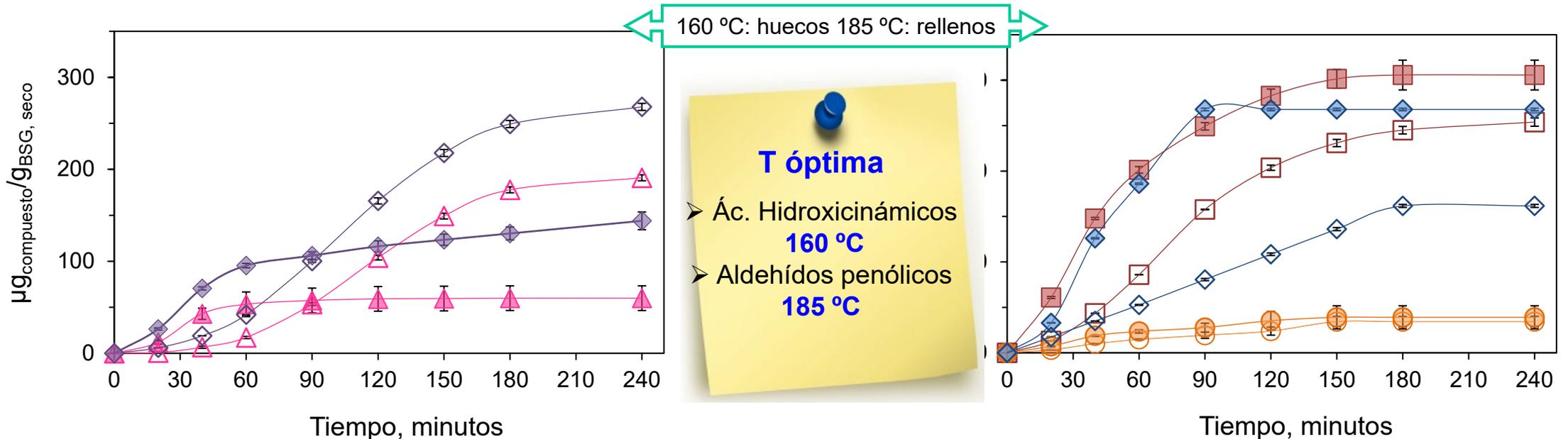
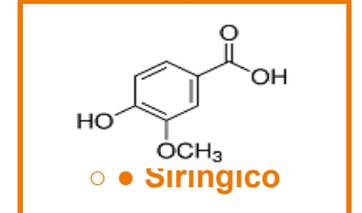
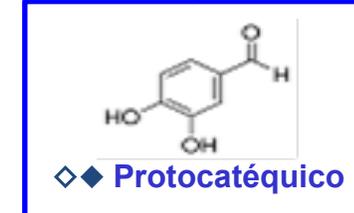
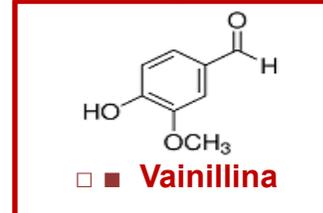
RESULTADOS

Compuestos fenólicos individuales

Ácidos Hidroxicinámicos



Aldehídos



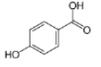
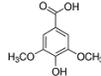
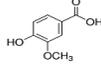
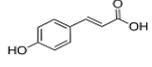
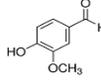
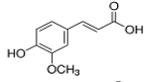
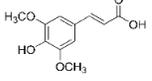
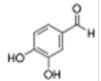
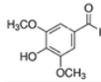
Identificación de compuestos fenólicos individuales: HPLC-DAD

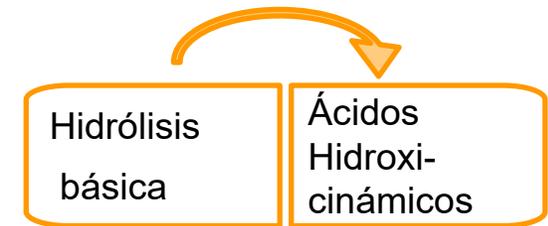
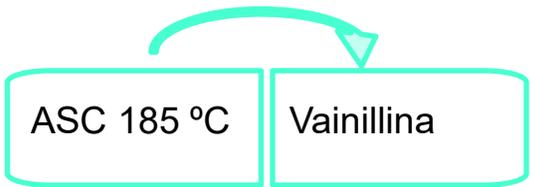
RESULTADOS

Compuestos fenólicos individuales

Comparación con otros métodos hidrolíticos

Identificación de compuestos fenólicos individuales: HPLC-DAD

Compuesto	Fórmula	ASC T= 160 °C	ASC T= 185 °C	EAU T= 50 °C	Hidrólisis Ácida	Hidrólisis Básica	Xilanasa 6%
Ácido p-Hidroxibenzoico		n.d.	n.d.	10.0 ± 0.5	n.d.	59 ± 2	n.d.
Ácido Vanílico		443 ± 12	n.d.	n.d.	n.d.	49 ± 2	61 ± 3
Ácido Siríntrico		17.9 ± 0.4	n.d.	n.d.	n.d.	106 ± 6	n.d.
Ácido p- Cumárico		191 ± 3	60 ± 1	n.d.	n.d.	538 ± 4	5.3 ± 0.4
Vanillina		254 ± 5	306 ± 10	n.d.	n.d.	217 ± 1	203 ± 10
Ácido Ferúlico		250 ± 3	144 ± 7	10.7 ± 0.3	54.4 ± 0.3	1306 ± 1	292 ± 3
Ácido Sinápico		n.d.	n.d.	2.8 ± 0.2	31.1 ± 0.5	27.2 ± 1.2	14.9 ± 1.2
Aldehído Protocatéquico		162 ± 2	268 ± 1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Aldehído Siríntrico		34 ± 5	39 ± 2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.



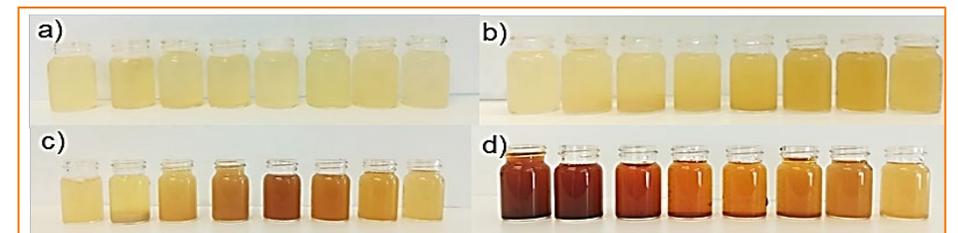
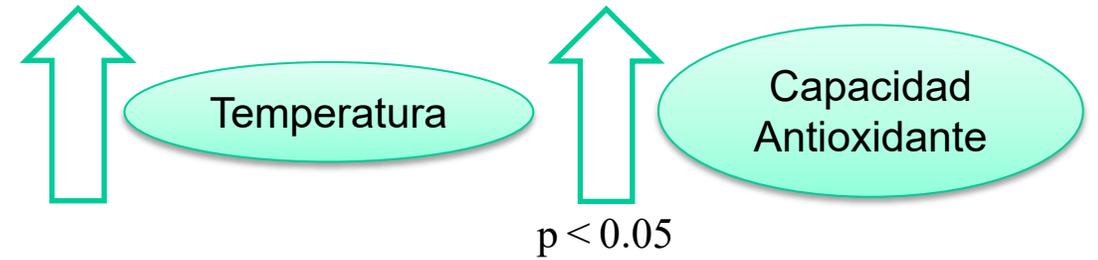
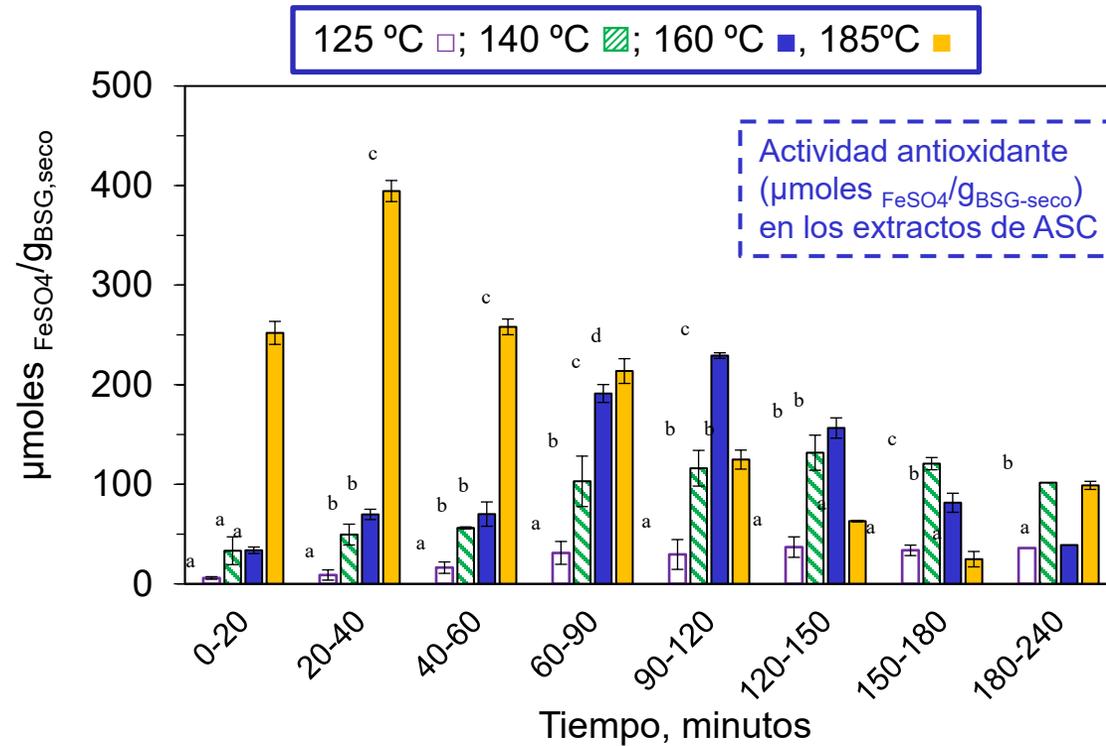
Xilanasa 6% vs ASC:

- ↑ ác. Ferúlico
- ↓ ác. p-Cumárico
- ↓ Aldehídos

RESULTADOS

Capacidad antioxidante

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)



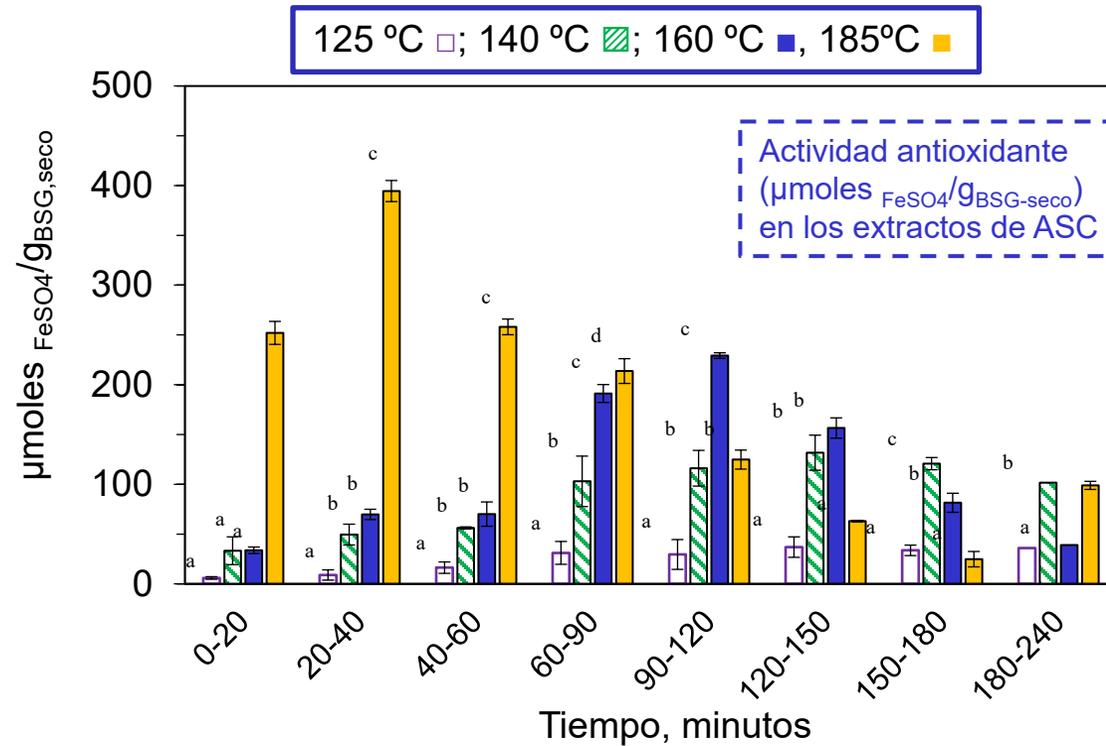
Extractos **ASC**: a)125 °C b) 140 °C c); 160 °C d), 185°C

*Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes según el test de *Fisher's least significant differences* (LSD, $p\text{-valor} \leq 0.05$).

RESULTADOS

Capacidad antioxidante

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)



CORRELACIÓN

Coeficiente de correlación de Pearson

Actividad antioxidante

$$R^2 = 0.9511$$

PT

Actividad antioxidante

$$R^2 = 0.7629$$

Proteína

Actividad antioxidante

$$R^2 = 0.1189$$

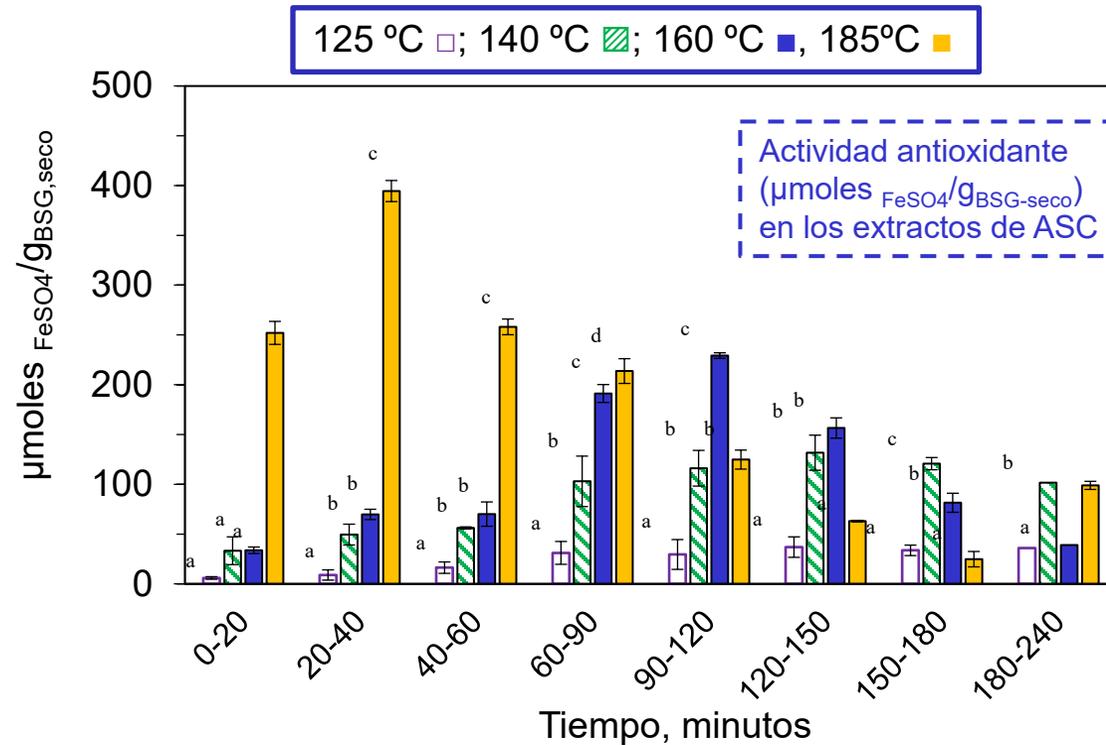
Aa libres

*Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes según el test de *Fisher's least significant differences* (LSD, p -valor ≤ 0.05).

RESULTADOS

Capacidad antioxidante

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)



CORRELACIÓN

Coeficiente de correlación de Pearson

Actividad antioxidante

$R^2 = 0.9511$

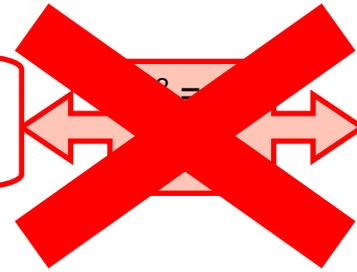
PT

Actividad antioxidante

$R^2 = 0.7629$

Proteína

Actividad antioxidante



Aa libres

*Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes según el test de *Fisher's least significant differences* (LSD, $p\text{-valor} \leq 0.05$).

ÍNDICE

RESUMEN

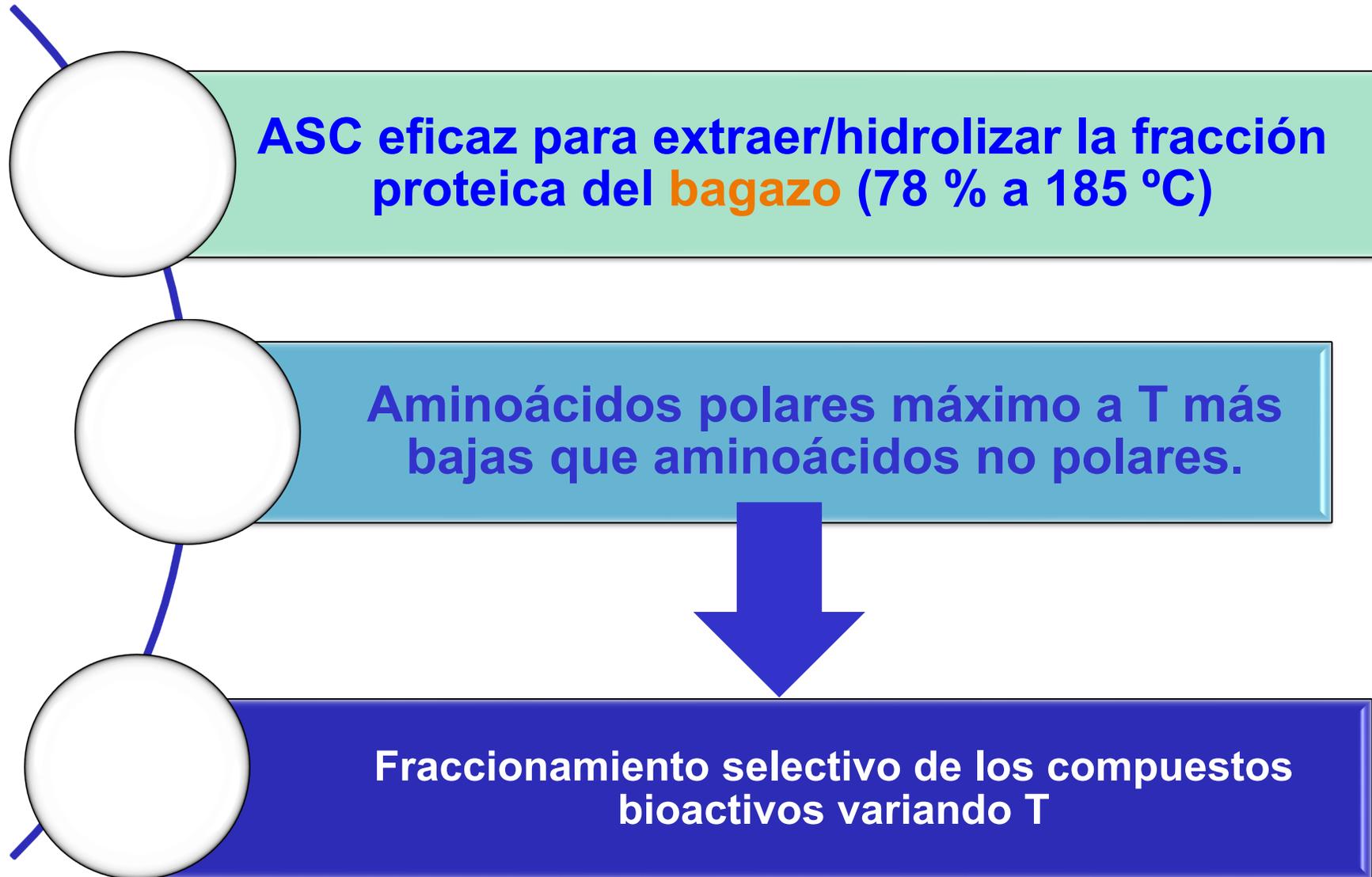
INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

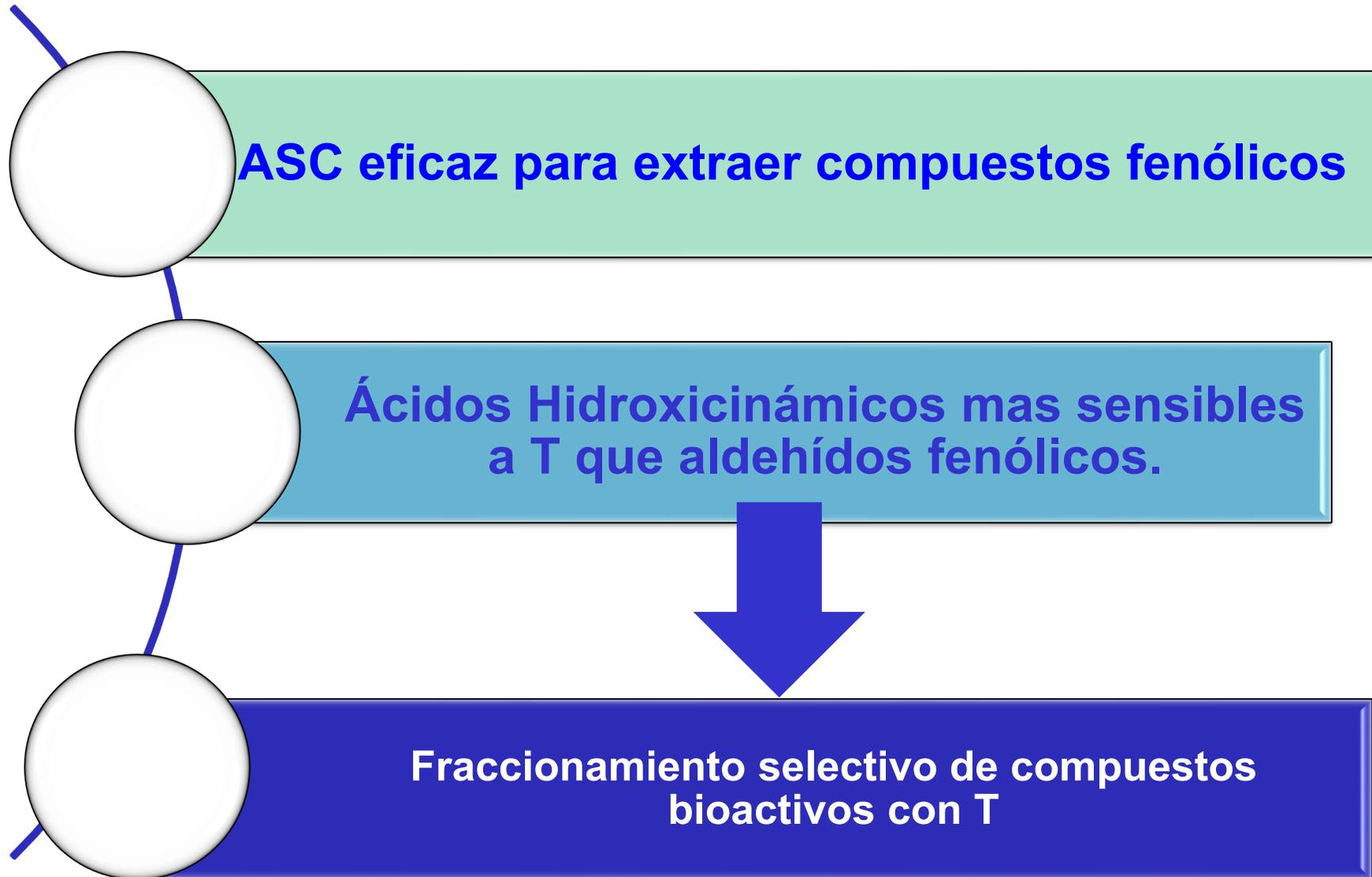
RESULTADOS

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

El tratamiento con **agua subcrítica** es una tecnología adecuada para **extraer y fraccionar** los diferentes **biocompuestos** contenidos en **el bagazo**, permitiendo incorporar este **subproducto** dentro del concepto de **biorrefinería**

Gracias por su atención



Grupo de Biotecnología Industrial y Medioambiental

<https://www.ubu.es/biotecnologia-industrial-y-medioambiental-bioind>

Línea de investigación financiada por la Agencia Estatal de Investigación (PID2019-104950RB-I00 / AEI / 10.13039/501100011033) y la Junta de Castilla y León JCyL y la *European Regional Development Fund* (ERDF) (BU301P18 y BU050P20)

Contratos predoctorales de E. Trigueros y P. Alonso-Riaño financiados por JCyL (*ORDEN EDU/574/2018, de 28 de mayo* y *ORDEN EDU/556/2019, de 5 de junio*, respectivamente)

