

ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS OBTENIDOS EN LA HIDRÓLISIS DEL BAGAZO DE CERVEZA MEDIANTE AGUA SUBCRÍTICA

Íñigo González Sainz

Este trabajo ha sido desarrollado en el seno del Grupo de Investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128, en el marco de los siguientes proyectos de investigación:

- VALORIZACIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA DE CASTILLA Y LEÓN MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FLUIDOS PRESURIZADOS (PROVALOR), financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU050P20).
- VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS MARINOS MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FLUIDOS SUB- Y SUPERCRÍTICOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCMPUESTOS VALIOSOS, financiado por la Agencia Estatal de Investigación (PID2019-104950RB-I00 / AEI / 10.13039/501100011033).
- VALORIZACIÓN INTEGRAL DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA MEDIANTE TECNOLOGÍAS EMERGENTES (ALVALOR), financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU301P18).

ÍNDICE

1. Abstract.....	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes.....	7
4. Objective	11
5. Materiales y Métodos.....	12
a. Tratamiento en Agua Subcrítica	12
b. Métodos Analíticos.....	14
6. Resultados.....	17
a. Estudio de la Degradación de Glucosa en Agua Subcrítica.....	17
b. Estudio de la Degradación de Prolina en Agua Subcrítica.....	20
c. Estudio de la Degradación de la Mezcla (Glucosa + Prolina) en Agua Subcrítica	22
7. Bibliografía	25

1. Abstract

En este trabajo se pretendía estudiar la degradación de alguno de los compuestos obtenidos en la hidrólisis del BSG (brewer's spent grain), glucosa y prolina, mediante agua subcrítica a 150 °C, 180 °C y 200 °C. La intención fue identificar y cuantificar los productos de degradación, determinar la presencia de productos de la reacción de Maillard, medir la capacidad reductora de los extractos y dilucidar si existe alguna relación entre estos dos últimos aspectos. Para la identificación y cuantificación de los productos de degradación se ha empleado un equipo HPLC equipado con una columna Biorad, con su correspondiente precolumna, y acoplado a un detector de índice de refracción y a un detector espectrofotométrico de longitud de onda variable. Además, se ha utilizado un equipo GC-FID para la determinación de aminoácidos libres, previo tratamiento de las muestras con un kit EZ:faast™. Para la determinación de productos de Maillard se han realizado medidas espectrofotométricas a 294 nm y 420 nm, cuya relación nos permite cuantificar el Browning (indicador de la presencia de dichos productos). La capacidad reductora de las muestras se ha medido empleando el método FRAP, tal y como viene descrito en la publicación de Benzie and Strain (1996). Se han caracterizado los productos de degradación de la glucosa y la prolina en agua subcrítica a estas temperaturas y se han descrito sus cinéticas de degradación. Se observó que la degradación de la glucosa pura fue mucho mayor que la de la prolina pura (la cual apenas sufrió degradación), y que estos dos compuestos se consumieron a mayor velocidad en las mismas condiciones experimentales al degradarse juntos en una mezcla. Entre los productos de degradación formados destacan el ácido láctico, además de otros ácidos en menor cantidad, el HMF y la fructosa. Ha quedado comprobado mediante los resultados del Browning que se han formado productos de Maillard. También se ha llegado a la conclusión de que sí existe una relación entre la formación de dichos productos y la capacidad reductora de las muestras, aunque esta no se manifieste de forma inmediata.

2. Introducción

Actualmente, en el sistema económico lineal la mayoría de los subproductos y residuos generados en la industria alimentaria son eliminados. La introducción de estos productos secundarios como compuestos de partida de otros procesos industriales es el concepto base que rige la economía circular, que persigue el objetivo de no generar residuos.

En la industria de la producción de cerveza se genera el bagazo de cerveza (BSG), un subproducto sólido lignocelulósico que se obtiene tras la maceración y el filtrado de la cebada malteada y el líquido (Figura 1). Este fenómeno cobra especial importancia cuando se tiene en cuenta que el mercado de la cerveza en Europa se valoró en 2020 en 42,52 millones de dólares estadounidenses, y que se prevee que este valor ascienda a 91,26 millones para el final del año 2025 (Market Data Forecast, 2020).

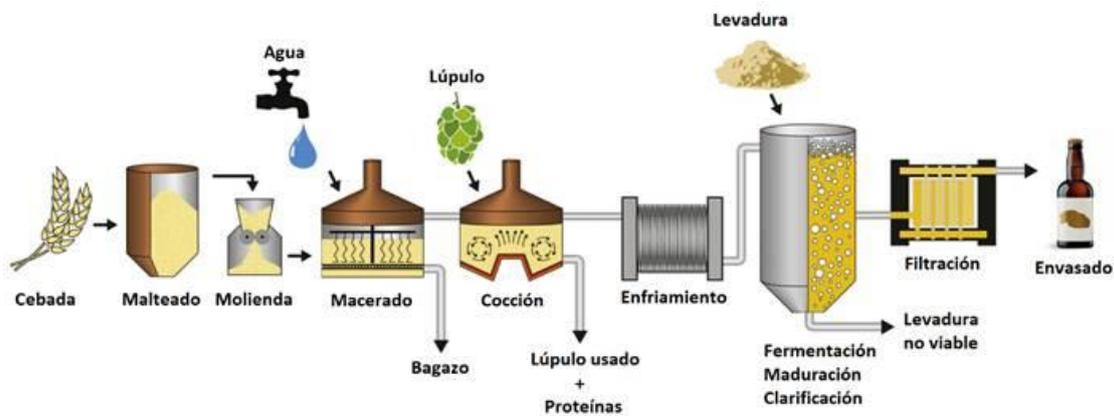


Figura 1. Proceso Industrial de Elaboración de la Cerveza

En la bibliografía referente al fraccionamiento y la separación de distintos componentes contenidos en biomasa lignocelulósica se propone el uso de agua subcrítica (Cocero et al., 2018). El agua subcrítica es agua entre 100°C y 374°C sometida a presión, de forma que se mantenga en estado líquido (Figura 2)

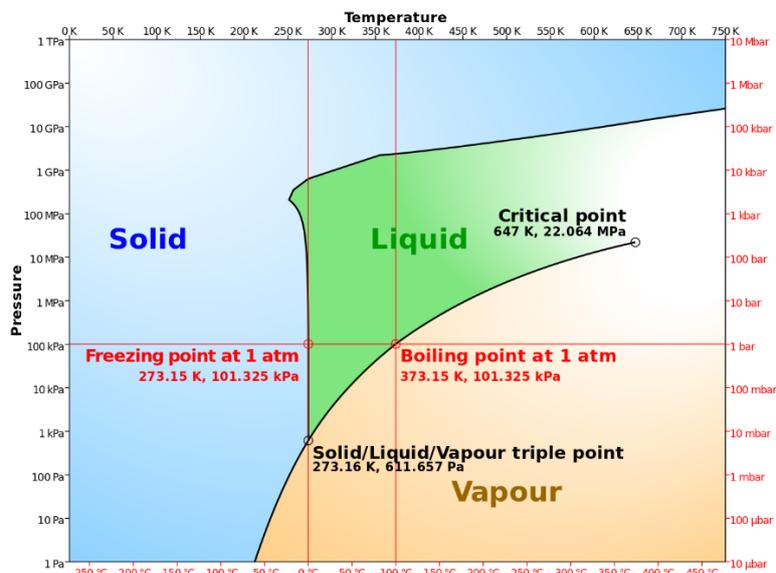


Figure 2. Water phase diagram. Adapted from Plaza & Turner. (Plaza & Turner, 2015).

Las propiedades que presenta el agua en este estado son únicas. En condiciones normales, el agua presenta propiedades anómalas debido al efecto de los fuertes puentes de hidrógeno que abundan en ella. En el rango de temperatura entre el punto de ebullición y el punto crítico estos enlaces de hidrógeno se rompen, de modo que los cambios en las propiedades atribuibles al aumento de la temperatura se ven acentuados por esta circunstancia.

Algunas propiedades físicas del agua presurizada se pueden observar en la Figura 2. En esta figura se puede observar como la constante dieléctrica de este fluido disminuye notablemente y su producto iónico aumenta, permitiendo la solubilización de compuestos hidrofóbicos en condiciones normales (Cocero et al., 2018). La explicación de este fenómeno radica en que la molécula de agua es polar en condiciones normales, pues la carga positiva está separada de la carga negativa. La destrucción de los puentes de hidrógeno de las moléculas debido al aumento de temperatura provoca el descenso en la constante dieléctrica, de modo que se da una pérdida de polaridad en el agua que le permite solubilizar moléculas como las orgánicas.

Su difusividad aumenta, a la vez que su viscosidad y su tensión superficial disminuyen, provocando una mayor interacción del agua con el resto de moléculas presentes. Esto llega al punto en que el agua logra penetrar en la compleja matriz lignocelulósica en poco tiempo, algo que requiere de largos periodos en el caso de los procesos hidrotérmicos y aún mayores en el caso de los procesos enzimáticos, siempre aplicando reactivos agresivos. Esto también implica un aumento de la ionización del agua, de modo que la cantidad de iones hidróxido e hidronio presentes en el agua subcrítica son muy elevados, pudiendo hacer que el agua se comporte como un ácido fuerte o una base fuerte.

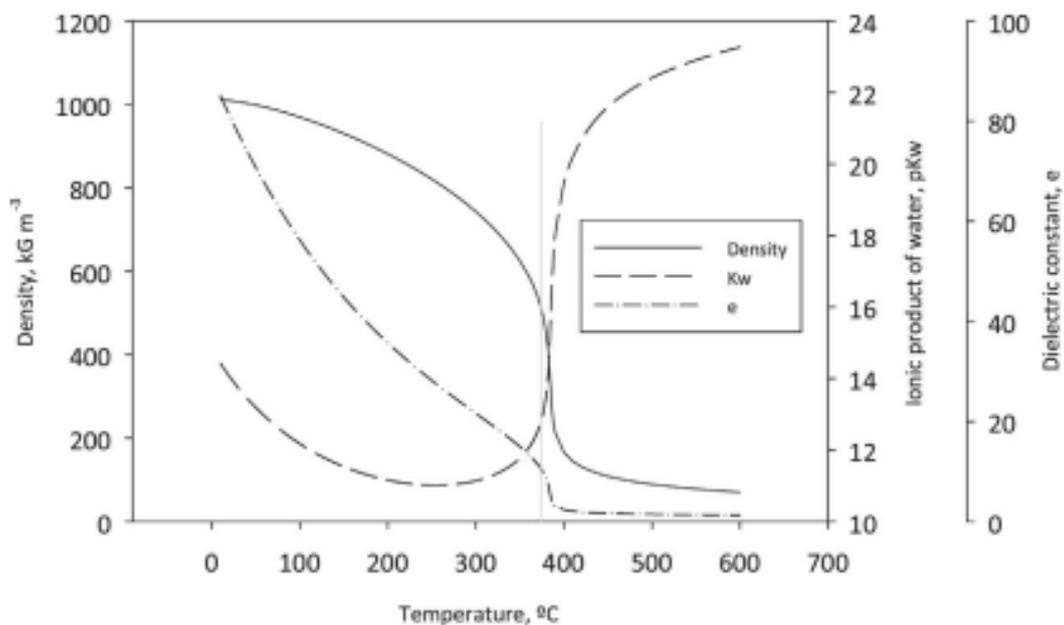


Figura 3. Propiedades físicas del agua presurizada

En general, a medida que aumenta la temperatura, la energía de vibración aumenta, de modo que tiene lugar un desplazamiento del equilibrio de disociación de las disoluciones. El nuevo equilibrio se establece en un punto en el que la concentración de las especies disociadas aumenta sobre la concentración de la especie sin disociar. El pH se define como el inverso del logaritmo de la concentración de iones H^+ , es decir, que si aumenta la concentración de iones H^+ , el pH desciende. Esto se traduce en que si la temperatura de un sistema con iones H^+ presentes, como el agua, aumenta; también lo hace la concentración de estos iones, con lo que el pH desciende. Esto es lo que sucede con el agua, que a temperatura ambiente tiene un pH en torno a 7, que en el rango de temperaturas que se ha trabajado (hasta 200 °C) tiene un valor de entre 5.5 y 6.0 (véase la Figura 4).

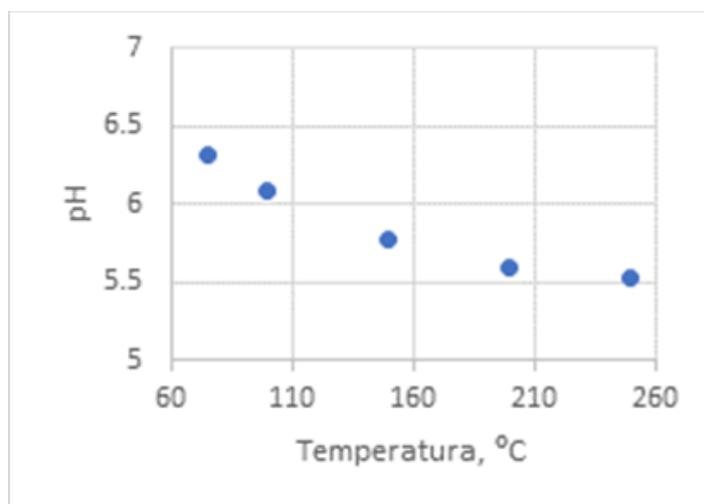


Figura 4. Variación del pH del Agua con la Temperatura

Las propiedades descritas anteriormente pueden ser fácilmente modulables cambiando la temperatura y la presión, modificando así la selectividad de este disolvente a la hora de extraer los compuestos bioactivos de la biomasa. Además, los valores altos de estos parámetros provocan que la extracción ocurra de una forma muy rápida. Esto hace de la temperatura y la presión del agua subcrítica unos parámetros vitales a controlar durante su uso en el tratamiento de biomasa. Además, el uso de estas tecnologías evita la utilización de disolventes orgánicos de carácter fuertemente dañino para el medio ambiente.

Uno de los principales componentes de la biomasa en general, son los polisacáridos. Entre los polisacáridos podemos encontrar aquellos cuyo azúcar principal es la glucosa, como la celulosa, almidón o diferentes glucanos. La celulosa se utiliza a menudo como compuesto modelo del producto de partida para los materiales de biomasa más complejos en diversos estudios. Bobleter et al. fue el primero en estudiar el proceso hidrotérmico de la biomasa utilizando agua calentada a presión. Basándose en su estudio, se llegó a la conclusión de que la hidrotérmólisis tiene un mecanismo de reacción comparable al de la hidrólisis ácida.

Para la degradación hidrotérmica no catalizada de la celulosa (215-219 °C), la tasa de hidrólisis de la celulosa es mucho menor que la de la hidrólisis ácida y la cantidad de glucosa obtenida glucosa también es menor. Varios estudios posteriores muestran que el éter y el éster sufren una rápida hidrólisis en agua casi crítica o supercrítica, incluso sin catalizadores.

Una buena comprensión de los mecanismos fundamentales de reacción es clave para mejorar el rendimiento de la reacción, el control de las reacciones y el diseño de los reactores. Sasaki et al. investigaron la hidrólisis y la descomposición de la celulosa en el rango de temperaturas de 290-400 °C con un tiempo de residencia inferior a 14 s. Lü et al. llevaron a cabo la investigación de la descomposición de la celulosa para temperaturas inferiores a 290 °C y un tiempo de residencia más largo (30-96 s). Los resultados de esos estudios mostraron que los principales productos de la descomposición de la celulosa en los HCW eran la glucosa, la fructosa, la eritrosa, la dihidroxiacetona, el gliceraldehído, el piruvaldehído y los oligómeros (celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y celohexaosa).

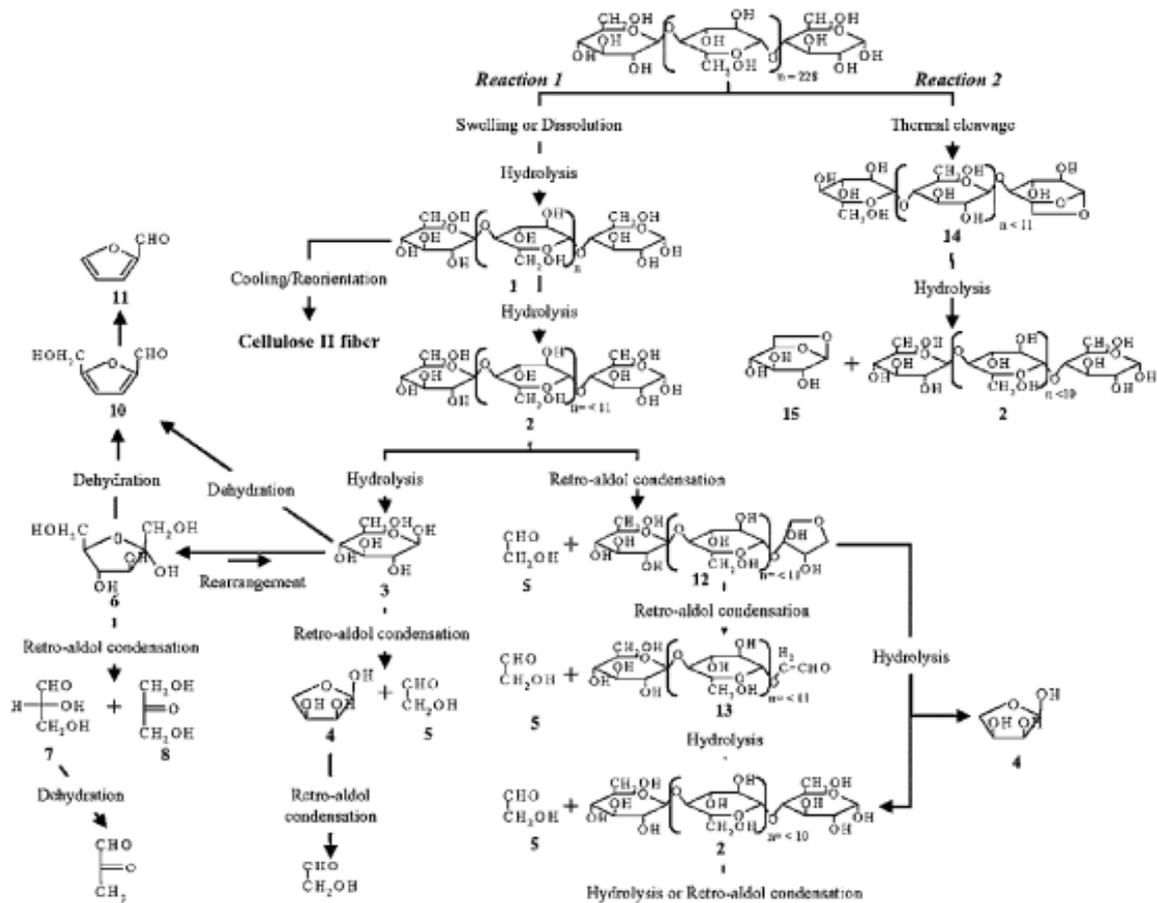


Figura 5. Vías de Degradación de la Celulosa Microcristalina en Agua Sub- y Supercrítica. (1) Celulosa disuelta, (2) celooligosacáridos, (3) glucosa, (4) eritrosa, (5) gliceraldehído, (6) fructosa, (7) gliceraldehído, (8) dihidroxiacetona, (9) piruvaldehído, (10) 5-HMF, (11) 2-furfural, (12) glucopiranosil-eritrosa, (13) glucopiranosil-gliceraldehído, (14) anhidro-celooligosacáridos, y (15) levoglucosán. Yu et al. (2008).

A través de los estudios cinéticos y mecanísticos de estos productos y de los compuestos modelo de la celulosa (celobiosa, celotriosa y celopentaosa), se han dilucidado las principales vías de degradación de estos carbohidratos (Figura 5). La celulosa se despolimeriza principalmente por dos vías de reacción:

- (1) La deshidratación de la glucosa del extremo reductor a través de la escisión pirolítica del enlace glicosídico de la celulosa. Tiene lugar a medida que aumenta la temperatura y disminuye la presión
- (2) La hidrólisis del enlace glicosídico a través del hinchamiento y la disolución de la celulosa. Se vuelve predominante en regiones de alta densidad en agua casi crítica y supercrítica.

Las reacciones de la celulosa microcristalina en agua subcrítica y supercrítica requieren un paso adicional para romper el microcristal de celulosa. Sasaki et al. ha propuesto que cuando se forma un microcristal, las moléculas de celulosa en el microcristal se alinean en paralelo y forman redes intermoleculares de enlaces de hidrógeno entre las moléculas. En el agua subcrítica, el microcristal se hidroliza en la región superficial sin hincharse ni disolverse. Por lo tanto, la tasa de conversión global de la celulosa microcristalina es lenta, y no se forma ningún cristal de celulosa II en el residuo. En cambio, en agua casi crítica y supercrítica, el microcristal puede hincharse o disolverse alrededor de la región superficial para formar moléculas de celulosa de tipo amorfo.

3. Antecedentes

El bagazo de cerveza se genera en grandes cantidades en compañías de todos los tamaños (Mussatto et al., 2006). Su producción es de 20 kg por cada 100 L de cerveza elaborada. El bagazo de cerveza contiene entre un 10% y un 30% de proteínas, apenas un 5% de lípidos (Alonso-Riaño et al., 2020) y es considerado una valiosa fuente de compuestos fenólicos, en torno al 1,2%, los cuales son responsables de la capacidad reductora de este subproducto. Es por esto que la introducción de este residuo como materia prima en procesos de biorrefinería puede conducir a la obtención de distintos compuestos biológicos de gran valor comercial.

En el área de Ingeniería Química de la universidad de Burgos, se han llevado a cabo anteriormente algunos estudios sobre la valorización del bagazo de cerveza aplicando agua subcrítica.

El bagazo de cerveza, al tratarse de biomasa lignocelulósica, tiene un alto contenido en lignina insoluble debido a su conexión con polisacáridos de la pared celular través de ácidos fenólicos (Alonso-Riaño et al., 2020; Birsan, Wilde, Waldron, & Rai, 2019). Esto hace necesaria la aplicación de un método de hidrólisis para poder liberarla.

En el área de Ingeniería Química también se ha efectuado la determinación de la composición química del bagazo de cerveza generado en la empresa San Miguel S.A. mediante los protocolos de NREL. Estos protocolos consisten en una doble hidrólisis ácida en los que se tiene en cuenta la posible degradación de los monómeros formados. El resultado se recoge en la Tabla 1. Se puede observar que el porcentaje de polímero de glucosa es ligeramente superior al 16 %, mientras que el polisacárido más importante es la hemicelulosa con casi un 30 % en base seca.

Tabla 1. Composición química del bagazo de cerveza

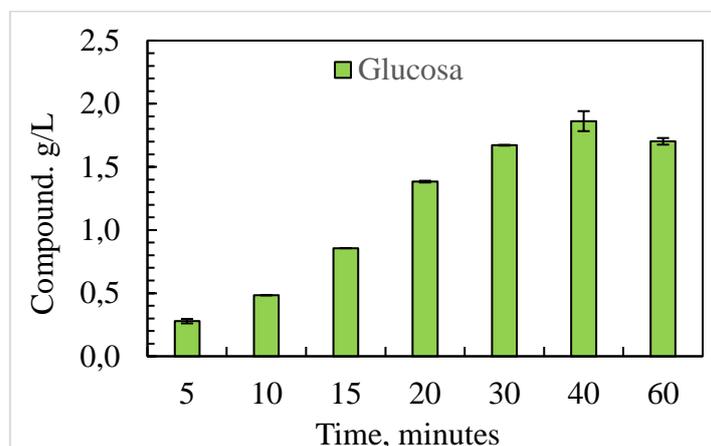
Componente	Bagazo de cerveza
Extractivos	14.51 ± 0.17
Agua	9.17 ± 0.08
Etanol	5.34 ± 0.09
Glucanos	16.46 ± 0.24
Almidón	4.11 ± 0.06
B-glucano	0.99 ± 0.01
Celulosa	11.36 ± 0.17
Galactanos	--
Galactano	
Arabinano	
Hemicelulosa	29.22 ± 0.95
Xilano	21.12 ± 0.43
Arabinano	13.93 ± 0.48
Acetato	0.93 ± 0.04
Lignina	20.73 ± 0.33
Ácida insoluble	15.46 ± 0.14
Ácida soluble	5.27 ± 0.19
Cenizas	3.32 ± 0.06
Proteínas	23.35 ± 0.67^f
Lípidos	6.2 ± 0.4

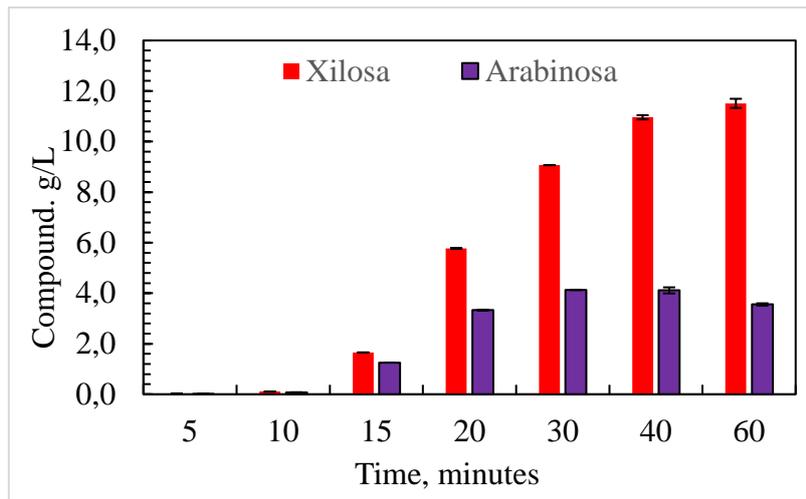
También se puede destacar el alto contenido en proteína del BSG con todos los aminoácidos esenciales (ver Tabla 2). Se puede concluir que, en este orden, los aminoácidos más presentes en esta biomasa son la prolina (123 mg/1 g de proteína), la valina (123 mg/g proteína) y el ácido glutámico (117mg/g proteína). Se puede observar que, de utilizar alguno de estos aminoácidos, estaríamos trabajando con más de un 10% de los aminoácidos que se encuentran en la proteína.

Tabla 2. Perfil de aminoácidos de la proteína del BSG

Amino acid	BSG
mg aa/g protein	
Alanine	48.1 ± 0.2
Aspartic acid	69 ± 3
Cysteine	4.7 ± 0.2
Glutamic acid	117 ± 2
Glycine	42 ± 1
Histidine ^a	23 ± 2
Hydroxylysine	n.d.
Hydroxyproline	4.3 ± 0.2
Isoleucine ^a	69.4 ± 0.1
Leucine ^a	87 ± 2
Lysine ^a	83 ± 1
Methionine ^a	18.9 ± 0.8
Phenylalanine ^a	68 ± 3
Proline	123 ± 5
Serine	44.1 ± 0.6
Threonine ^a	41 ± 2
Tryptophan ^a	14.7 ± 0.2
Tyrosine	22.5 ± 0.6
Valine ^a	123 ± 6
TAA	1002 ± 31
TEAA	527 ± 17
TEAA/TAA (%)	53 ± 3 ^a
non-P/TAA (molar ratio)	0.63 ^c ± 0.04

En los estudios de valorización del BSG mencionados anteriormente se ha llevado a cabo la hidrólisis del BSG mediante agua subcrítica, tanto en reactores discontinuo como en semicontinuos. En las Figuras 6 se muestra el perfil de concentraciones de azúcares monoméricos, glucosa, xilosa y arabinosa obtenido de la hidrólisis de los polisacáridos de glucosa y hemicelulosa mediante agua subcrítica a 180 °C. De la degradación de la celulosa, el almidón y los beta-glucanos contenido en él se observa la formación de glucosa como unidad monomérica de estos polisacáridos, fundamentalmente a partir de almidón y β-glucanos, ya que la celulosa apenas se degrada en las condiciones utilizadas.





Figuras 6. Perfil de concentraciones de azúcares monoméricos obtenidos por hidrólisis en agua subcrítica a 180 °C

Como se observa en la Tabla 1, correspondiente a la composición del BSG, el monosacárido más abundante es en realidad la xilosa. Su presencia predominante se debe a la fácil hidrólisis de la hemicelulosa en agua subcrítica. Este azúcar, dada su abundancia, podría ser un objeto de estudio interesante, pero en este caso se va a tomar la glucosa como monosacárido de referencia en la valorización del BSG por ser la unidad más básica de cualquier biomasa. Ambos forman parte de los 8 azúcares esenciales para el cuerpo humano, lo que les hace especialmente interesantes de estudiar.

El tratamiento con agua subcrítica también conduce a la hidrólisis de la fracción proteica, con más de un 80 % de proteína hidrolizada y una pequeña fracción de amino ácidos libres generados en los hidrolizados (ver figura 7)

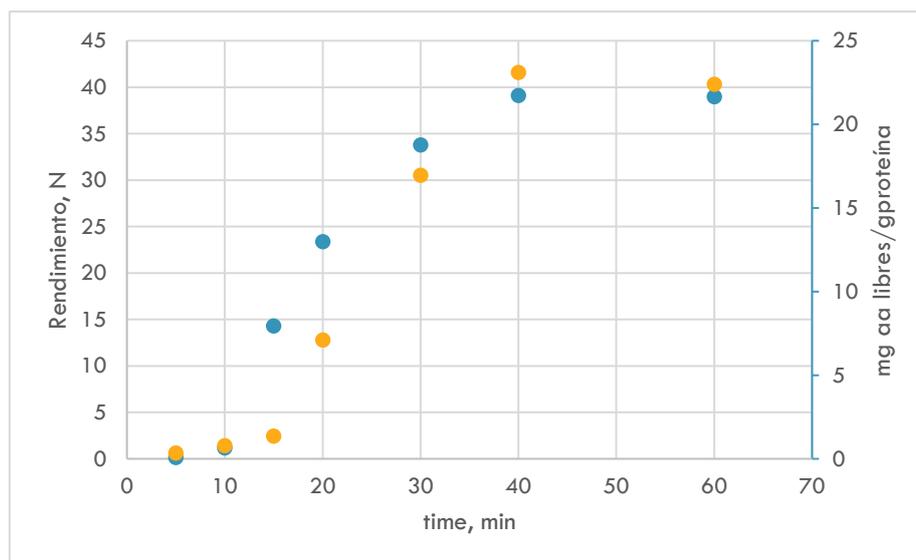


Figura 7. Fracción de proteína hidrolizada (●) y amino ácidos libres generados (●)

Las variables más importantes de operación son la temperatura y el tiempo de residencia. Largos tiempos de residencia conducen a la degradación de azúcares monoméricos formados (ver Figura 5), así como de amino ácido libres generados.

Además, los extractos obtenidos demostraron una alta capacidad reductora, como se comprobó con el ensayo FRAP (Figura 8). Los resultados mostraron que el aumento de la temperatura hasta 185°C incrementó significativamente la actividad antioxidante. Se estableció una correlación positiva entre la actividad antioxidante y el Contenido Total en Polifenoles (TPC) según la correlación del momento del producto de Pearson. Según Marcet et al. (2016), la capacidad reductora aumenta cuando se obtienen péptidos pequeños. En este trabajo, también se encontró una correlación positiva entre la actividad antioxidante y la cantidad de proteína en los extractos de agua subcrítica, mientras que la cantidad de aminoácidos libres no se correlacionó significativamente con la actividad antioxidante.

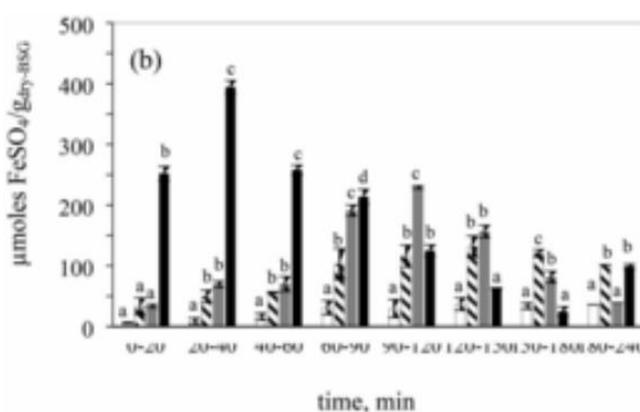


Figura 8. Degradación Reductora y Capacidad reductora de los Extractos

El alto valor de TPC y la capacidad reductora de los extractos obtenidos a las temperaturas más altas podrían deberse a los compuestos recién formados relacionados con las reacciones de Maillard.

Para estudiar la degradación de los azúcares monoméricos obtenidos en los hidrolizados en agua subcrítica, así como de los amino ácidos generados en este trabajo se estudió el comportamiento de glucosa y prolina (amino ácido presente en la fracción proteica del BSG) en agua subcrítica. También se considera el estudio del tratamiento en agua subcrítica de la mezcla glucosa+ prolina para estudiar el posible consumo de estos dos componentes por reacción de Maillard.

La reacción de Maillard comprende un conjunto de reacciones químicas entre azúcares reductores y aminoácidos libres que dan lugar a productos coloreados que en disolución dan un aspecto parduzco. El aumento del pardeamiento está directamente asociado a las fases avanzadas de la reacción de Maillard. Partiendo de esto, se pretende estudiar también la presencia de estos productos y la alta capacidad reductora de las muestras, determinando así si los productos de Maillard son los responsables de dicha capacidad reductora.

4. Objective

The above mentioned degradations give rise to the isolated study of some of these amino acids and simple sugars, separately and as a whole, under subcritical water treatment. This will help us to understand the results of the experiments with brewers' spent grains in subcritical water, which needs to be studied in more depth and at greater length.

Glucose has been chosen as a starting point. As for amino acids, it has been decided to work with proline, a small amino acid obtained from the degradation of proteins present in brewers' spent grains, due to its high concentration in this biomass.

The general purpose of this work is to study the degradation of some of the compounds obtained in the hydrolysis of BSG by means of subcritical water. This results in:

- ✓ Identify and quantify the sugars, acids, amino acids and other compounds formed in the process.
- ✓ Analysing the degradation of the starting compounds.
- ✓ Relate the reductive capacity of the products formed with the Maillard products.

5. Materiales y Métodos

Para el desarrollo de este apartado es necesario hacer una distinción entre dos fases del proceso experimental: el tratamiento de la disolución inicial con agua subcrítica y el análisis de las muestras obtenidas a lo largo de la extracción.

a. Tratamiento en Agua Subcrítica

El tratamiento se ha llevado a cabo utilizando un pequeño reactor de acero inoxidable (véase Figura 9), de 500 mL de capacidad máxima, con una manta cerámica a su alrededor para calentarlo y un agitador magnético situada debajo para mantener el imán en movimiento. Dispone de una tapa del mismo material con un manómetro, una entrada para la introducción de una sonda de temperatura, una válvula para liberar el exceso de presión, una entrada de nitrógeno para conseguir que se alcance la presión deseada y un tubo largo y de pequeño diámetro con una llave para extraer las muestras. Este sistema trabaja en discontinuo, es decir, no hay entrada y salida de muestra de forma continua más allá de las tomas de muestra puntuales.

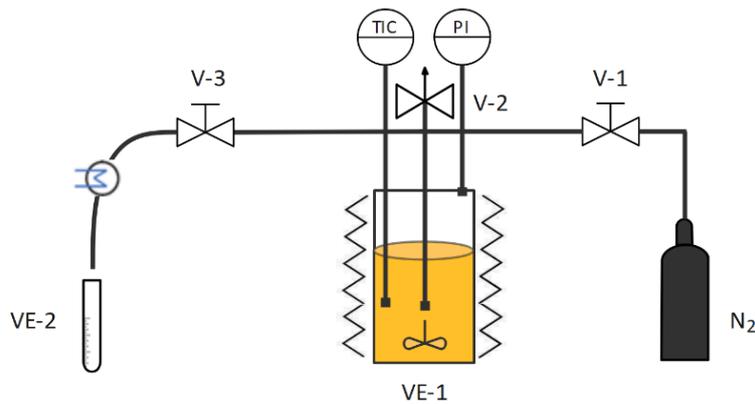


Figura 9. Reactor de Extracción con Agua Subcrítica

Los experimentos se han desarrollado en primer lugar con disoluciones acuosas de 350 mL al 5% de glucosa, después con disoluciones acuosas de 350 mL de 1.5 g/L de concentración de prolina y, por último, con mezclas glucosa-prolina de 350 mL al 5% de glucosa y con 1.5 g/L de concentración de prolina. Estas concentraciones se corresponden con las que tendría disolución al 5% de biomasa sólida, considerando que toda la prolina contenida en el BSG está en forma de aminoácido libre.

Con cada una de estas disoluciones de compuestos puros y mezclas se ha efectuado un experimento a 150 °C, otro a 180 °C y otro a 200 °C de temperatura y 50 bares de presión durante 4 horas en la mayoría de los casos, aunque partiendo de la temperatura ambiente y la presión atmosférica. Por ello, el perfil de temperatura muestra el proceso de calentamiento inicial hasta alcanzar la temperatura de trabajo, y a partir de ahí muestra un comportamiento cíclico mediante el que se mantiene la temperatura de operación (véase la Figura 10).

El calentamiento se consigue con la ayuda de una manta cerámica con sensor de temperatura y con una sonda en el interior del reactor conectadas a un automático que activa y desactiva el calentamiento de la manta en función de la temperatura interior del reactor. Es por esto que existe una pequeña oscilación en la temperatura del extractor, de modo que las temperaturas medias de trabajo han sido de 154.1 ± 2.6 °C, 184.4 ± 3.8 °C y 203.4 ± 3.0 °C, respectivamente.

Esta puesta a punto de la temperatura necesita de unos 15 o 16 minutos hasta estabilizarse. Además, la presión se aumenta hasta 50 bares una vez el calentamiento ha terminado o está a punto de hacerlo, pues el aumento de temperatura va provocando un aumento de la presión. Se observa en los tres perfiles (Figura 10) que el proceso de calentamiento necesario para alcanzar la temperatura de trabajo es lo suficientemente largo como para asegurar que la primera muestra se toma por debajo de dicha temperatura, algo a tener en cuenta en la discusión de los resultados.

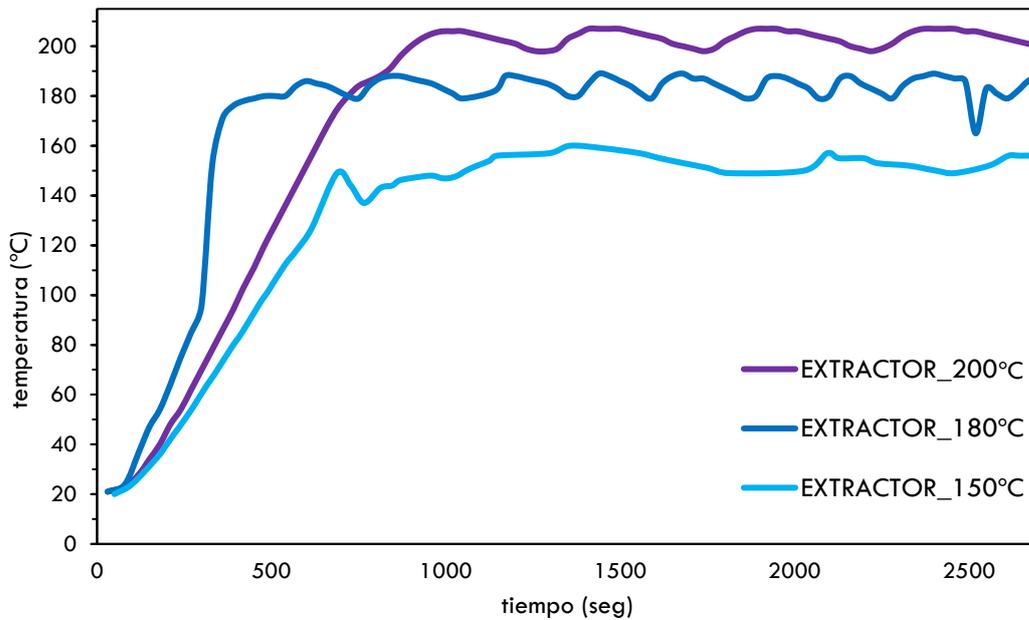


Figura 10. Perfil de Temperatura de los tres Experimentos realizados con Agua Subcrítica en un Reactor Discontinuo

Durante los experimentos se tomaron a determinados momentos desde que empezaba a calentarse hasta pasadas las 4 horas, tal y como se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3. Tiempos de Toma de Muestras

Toma de Muestras por Temperatura Máxima					
150 °C		180 °C		200 °C	
Muestra	tiempo, min	Muestra	tiempo, min	Muestra	tiempo, min
1	10	1	10	1	10
2	20	2	20	2	20
3	30	3	40	3	30
4	40	4	60	4	40
5	50	5	90	5	50
6	60	6	120	6	60
7	90	7	180	7	90
8	120	8	240	8	120
9	180	-	-	9	180
10	240	-	-	10	240

b. Métodos Analíticos

HPLC

Cada muestra obtenida debe ser filtrada y envasada en un vial de cromatografía de líquidos para después situarlo en la bandeja de muestras del equipo. A continuación, se programa la secuencia en el ordenador conectado al aparato y se ejecuta, de modo que se pondrá en la cola de haber más análisis.

El HPLC empleado está equipado con una columna Biorad Aminex-HPX-87H y su correspondiente precolumna, un detector de índice de refracción y un detector de espectrofotometría de longitud de onda variable, siendo la fase móvil ácido sulfúrico 0.005M. La temperatura de la columna y de los detectores se fijó a 40 °C y la cantidad de muestra inyectado fue 5 µL. La bomba peristáltica que hace fluir la fase móvil a través del equipo se fijó en un flujo de 0.6 mL/min, y para asegurar el cuidado del producto se programó un blanco por cada dos muestras a modo de limpieza de los conductos. Cada muestra tardaba 67 minutos en ser medida, de modo que los compuestos con tiempos de retención mayores pudieran ser medidos. Las señales son transformadas en concentraciones con un calibrado previamente hecho con compuestos puros y programado en el equipo por compañeros del Área de Ingeniería Química.

Este dispositivo permitió la cuantificación de monosacáridos como la glucosa inicial que no se había degradado y la fructosa que se iba formando, entre otros compuestos. Además, también se cuantificaron ácidos como el fórmico o el acético y otros compuestos como el furfural.

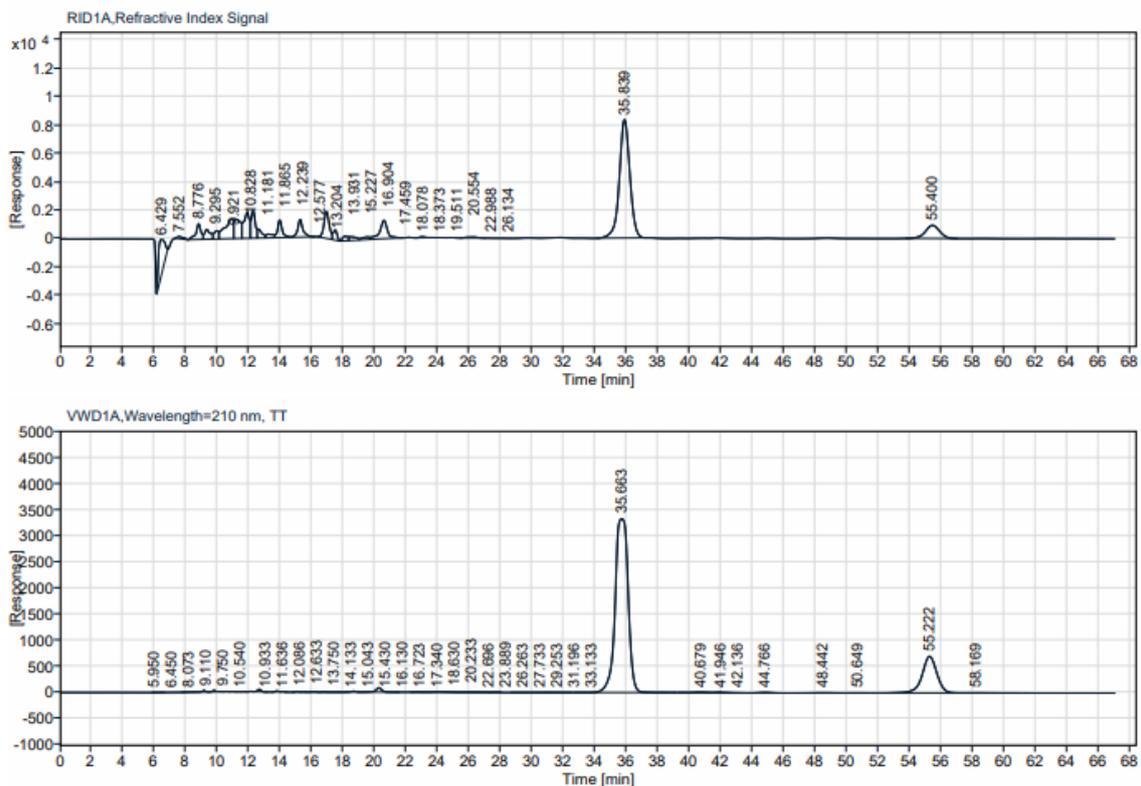


Figura 11. Cromatograma Obtenido de la Extracción de la Mezcla a 200 °C transcurridos 90 minutos.

Aminoácidos Libres

Para este análisis se va a emplear un cromatógrafo de gases acoplado a un detector. El primer paso para el uso de este aparato consiste diluir las muestras que tenemos filtradas, pues la técnica es muy sensible. La dilución que se llevó a cabo fue de 75 veces tanto para las muestras de degradación de la prolina como para las de la mezcla. La porción de muestra utilizada para la dilución estaba filtrada previamente.

Para el uso de la cromatografía de gases es necesario que la muestra sea volátil. En caso de no serlo, como en este caso, las muestras se deben someter a un proceso de derivatización utilizando el kit EZ:faast™ (Phenomenex). Las muestras derivatizadas deben medirse en el GC, como tarde, al día siguiente de aplicar este método.

Este equipo utiliza un detector de ionización de llama (FID) y cuenta con un muestreador automático con una capacidad máxima de 8 viales. Para comenzar a medir primero el equipo debe alcanzar la temperatura de trabajo: el detector a 320 °C, el inyector a 250 °C y el horno a 110 °C; para luego encender la llama. Una vez esté todo listo se programa la secuencia y se ejecuta, tardando en cada inyección aproximadamente 15 minutos.

Este procedimiento nos permite medir la concentración de aminoácidos libres en las muestras, la cual se calcula dividiendo la señal de cada aminoácido entre la señal de un patrón interno y aplicando unas rectas de calibrado confeccionadas anteriormente por el Área de Ingeniería Química de la Universidad de Burgos específicamente para este aparato.

Capacidad reductora

Este análisis se lleva a cabo utilizando el método FRAP tal y como viene explicado en el artículo Benzie and Strain (1996). Se basa en el coloramiento debido a la presencia del complejo tripiridil triazina de hierro a pH bajo generado por la reducción del ion férrico al ion ferroso. Para ello se prepara el reactivo TPTZ a partir de ácido sulfúrico, tampón acetato, TPTZ, cloruro férrico y agua de calidad mili-Q.

El proceso consiste en la adición del reactivo, que debe ser fresco, a una pequeña cantidad de muestra. La muestra en cuestión deberá ser diluida en la mayoría de los casos de este estudio para que el valor de absorbancia obtenido se encuentre en la región lineal del espectrofotómetro. Una vez añadido el reactivo se debe incubar el vial que contiene a la muestra durante 30 minutos a 37 °C para realizar una medida de su absorbancia a 593 nm al término de dicha incubación.

Con este método podemos obtener información de la capacidad reductora de las muestras, pues la absorbancia medida a esa longitud de onda es proporcional a la capacidad reductora (o antioxidante) de la muestra.

El calibrado de este método fue confeccionado para este estudio con la intención de abarcar cualquier respuesta de Absorbancia entre 0,1 y 2,0. A continuación se muestra en la Tabla 4 las concentraciones reales de los patrones preparados y la absorbancia media. Después, se muestra la regresión lineal hecha para obtener la ecuación del calibrado (Figura 12).

Tabla 4. Patrones de Calibrado del Método FRAP

Calibrado					
Muestra	ABS		Conc (g/L)	Conc (mM)	
1a	0,2032	0,2227	0,1077	0,00354684	0,023348632
1b	0,2422				
2a	0,5259	0,5583	0,4433	0,01064	0,070042394
2b	0,5907				
3a	0,905	0,8379	0,7229	0,017725	0,116682466
3b	0,7708				
4a	1,6354	1,52505	1,41005	0,035475	0,233529505
4b	1,4147				
5a	2,441	2,46465	2,34965	0,0532	0,35021197
5b	2,4883				
0a	0,13	0,115	0	0	0
0b	0,1				

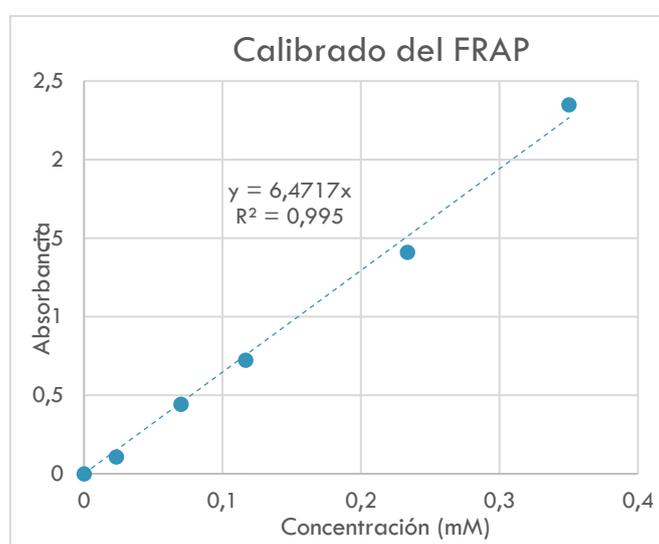


Figura 12. Recta de Calibrado del FRAP

Browning (o pardeamiento)

El Browning o pardeamiento se refiere a la ganancia de intensidad del color parduzco que toman las muestras producto de la degradación de biomasa. Consiste en la medida espectrofotométrica de las muestras a dos longitudes de onda, 294 nm y 420 nm.

Los valores de absorbancia serán más altos cuanto mayor sea el pardeamiento de las muestras, por lo que será necesario diluir las muestras para que ambas absorbancias medidas de cada muestra entren en el rango lineal del aparato (típicamente entre 0.1 y 2.0). Después de realizar la medición se calcula la relación entre las absorbancias.

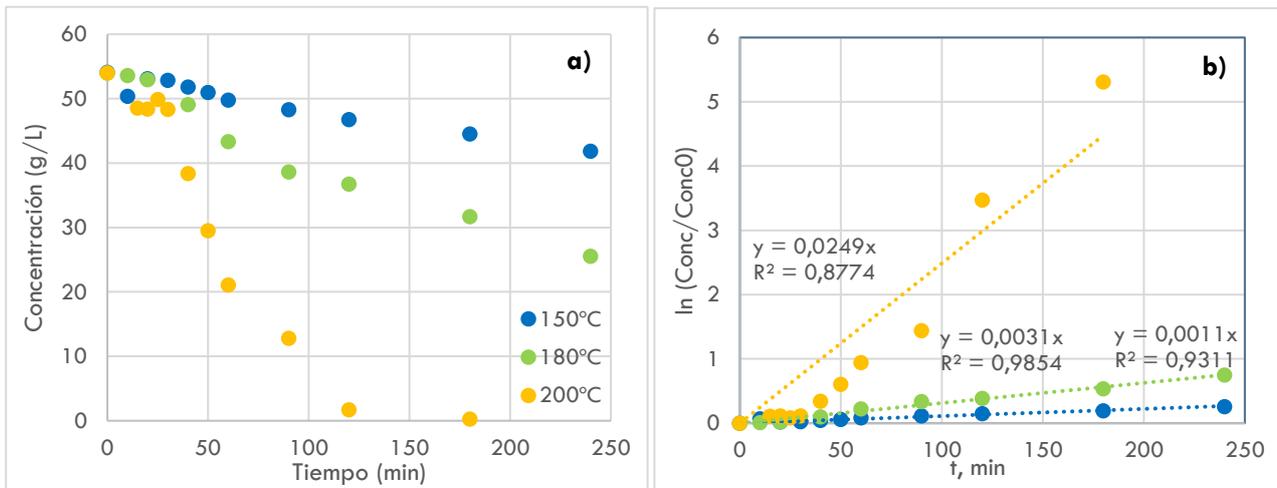
$$\text{Formación de compuestos que absorben en el UV} = \frac{\text{Abs a } 294 \text{ nm}}{\text{Abs a } 420 \text{ nm}}$$

Esta relación nos da información de la formación de productos de Maillard, que absorben en la región del UV; y, por tanto, del avance de las reacciones de Maillard (R. Melgosa et al., 2020).

6. Resultados

a. Estudio de la Degradación de Glucosa en Agua Subcrítica

A medida que aumenta la temperatura del agua, la velocidad de reacción se dispara, de modo que las cinéticas de degradación son más rápidas. Esto se debe a las propiedades del agua subcrítica que hemos comentado en la introducción (pH menor, mayor carga iónica, menor viscosidad, mayor difusividad, menor difusividad, etc.). Este aumento de la velocidad de la cinética se hace patente al comparar en la Figura 13 a) el experimento a 200 °C y el de 150°C. Se puede observar cómo en ambos la glucosa va desapareciendo a medida que pasa el tiempo, pero cabe destacar que a 150 °C apenas se degrada una quinta parte de la glucosa inicial, mientras que a 200 °C casi toda la glucosa se ha degradado al llegar a la mitad del tiempo del experimento.



Figuras 13 a) y b). Degradación de la Glucosa a Distintas Temperaturas

Se han ajustado las líneas de tendencias de las degradaciones con el tiempo a cinéticas de orden 1, cuya ecuación general es:

$$\ln[A]_t = -kt + \ln[A]_0 \rightarrow \ln[A]_t - \ln[A]_0 = \ln \frac{[A]_t}{[A]_0} = -kt$$

Para representarla hemos calculado el logaritmo neperiano del cociente de la concentración a cada tiempo entre la concentración inicial y lo hemos representado frente al tiempo de forma que nos queda una ecuación de la recta del tipo $y=ax+b$; donde $b = 0$, $a=-k$, $x=t$ e $y=\ln(\text{conc}/\text{conc}_0)$ (véase la Figura 13 b)). En caso de que el valor de R^2 fuera 1, el ajuste de esta degradación a una cinética de primer orden sería perfecto. Aunque el valor esté cerca de 1, no lo está lo suficiente como para decir que la degradación sigue esta cinética, pero se pretendía comprobar esta relación porque en la bibliografía se suele utilizar este modelo.

A continuación, se calcula la Energía de Activación para comparar este experimento con la bibliografía. Para ello primero debemos calcular la constante cinética de degradación a cada temperatura, que es el negativo de la pendiente de las rectas de la Figura 13 b):

$$k_{150^\circ\text{C}} = 0.0011 \quad ; \quad k_{180^\circ\text{C}} = 0.0031 \quad ; \quad k_{200^\circ\text{C}} = 0.0249$$

La relación lineal obtenida de la representación del inverso de la temperatura de operación (en Kelvin) frente al logaritmo de las constantes cinéticas se corresponde con la ecuación de Arrhenius linealizada (Figura 14):

$$k = A \cdot e^{Ea/RT} \rightarrow \ln k = \ln A - \frac{Ea}{RT}$$

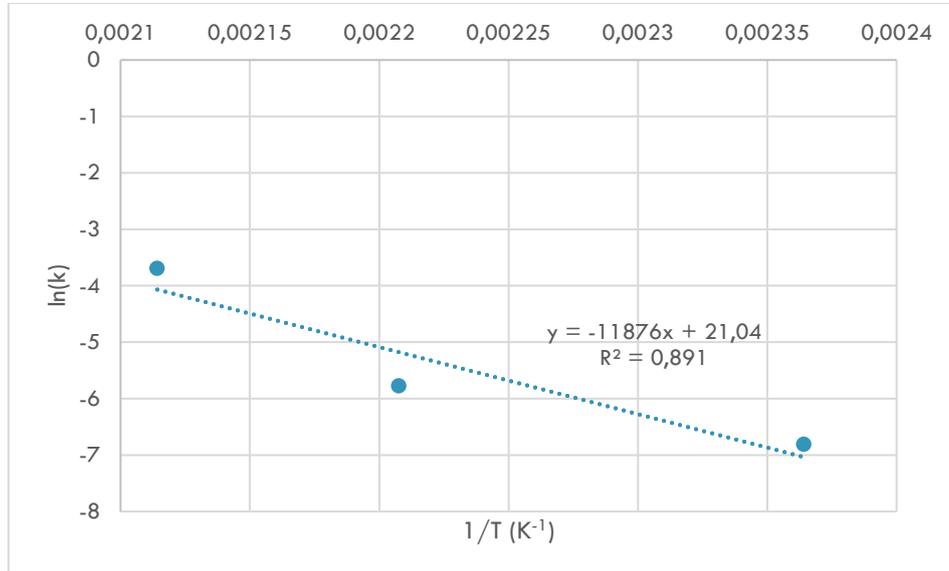


Figura 14. Representación de la Ecuación de Arrhenius Linealizada

De esta forma sabemos que la pendiente de la recta de la Figura 14 es igual a $-Ea/R$, así que solo queda operar:

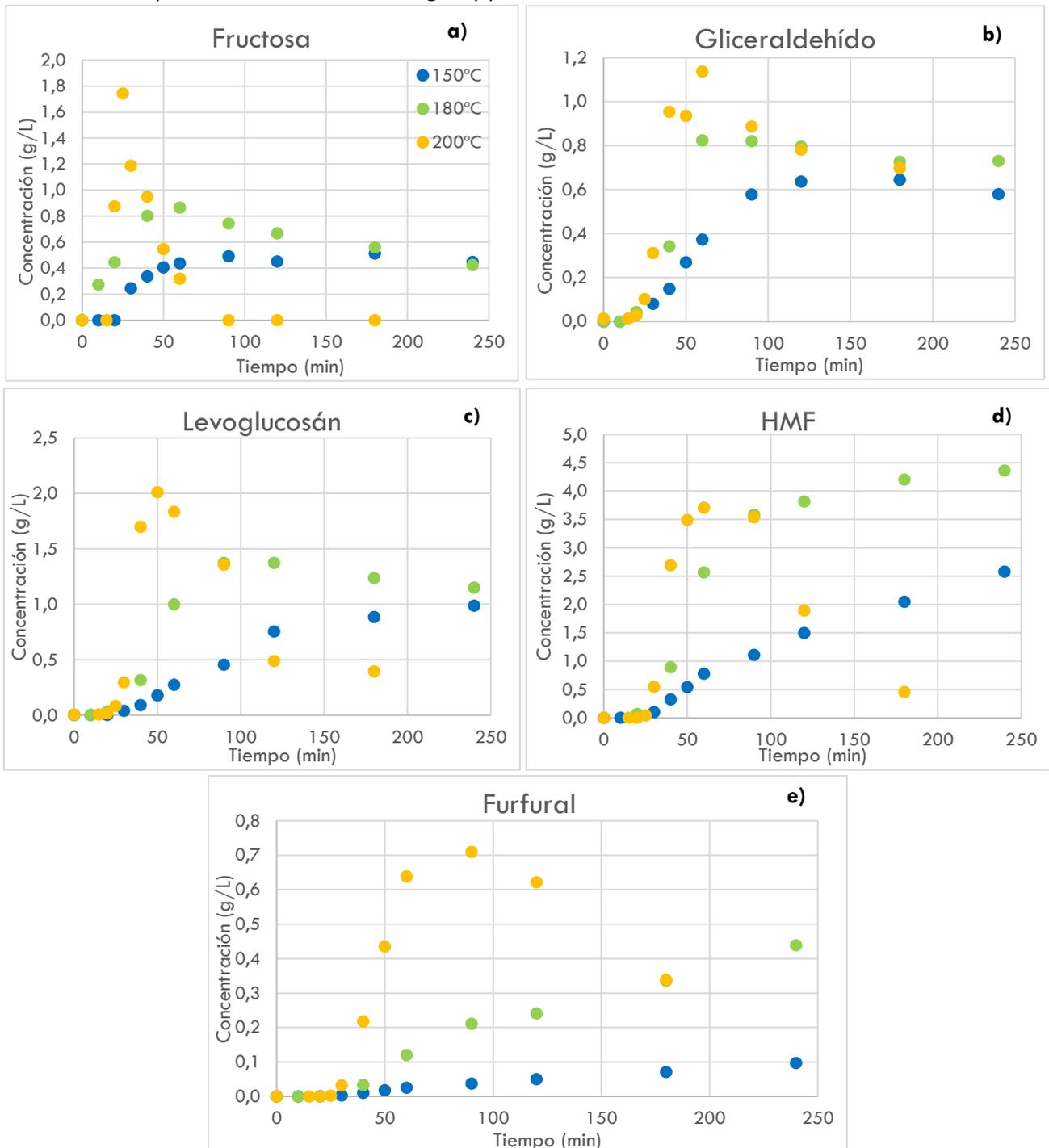
$$-\frac{Ea}{R} = -11876 [K] \rightarrow$$

$$\rightarrow Ea = 11876 [K] \cdot R = 11876 [K] \cdot 8.314472 \left[\frac{J}{mol \cdot K} \right] = 98.742 \text{ kJ} \cdot \text{mol}$$

Esta energía de activación es bastante similar a las observadas en artículos como T. Rogalinski et al. (2005), Cantero et al. (2015) o Sasaki et al. (2016); donde las energías de activación calculadas varían entre 93 y 125 kJ/mol

De la degradación de la glucosa se han ido formando mayormente fructosa, gliceraldehído, levoglucosán, HMF y furfural. La gran cantidad de HMF y el Furfural que se han generado apunta a que la principal ruta de degradación ha sido la deshidratación, pero también hay una cantidad reseñable de Gliceraldehído, que indica que ha tenido lugar, aunque en menor medida, la ruta de la condensación retro aldólica (véase la Figura 5).

Una vez formados, se ha observado claramente como estos mismos productos también se han ido degradando a 200°C, siendo algo poco pronunciado, y no en todos los productos, en el ensayo a 180 °C. Esta degradación de los compuestos formados no se observó a 150 °C, pero tampoco se alcanzó la concentración máxima de los productos observada en temperaturas mayores (véanse las Figuras 15 a), b), c), d) y e)). Además, también se iba formando un residuo sólido que en los artículos es conocido como “char”, y que debido a problemas experimentales no se ha podido llevar a cabo su recogida y pesada de forma efectiva.



Figuras 15 a), b), c), d) y e). Formación y degradación de a) Fructosa, b) Gliceraldehído, c) Levoglucosán, d) HMF y e) Furfural a 150 °C (●); 180 °C (●) y 200°C (●).

b. Estudio de la Degradación de Prolina en Agua Subcrítica

En la Figura 16 a) se puede observar como la prolina va degradándose lentamente con el paso del tiempo. Se puede apreciar claramente como, incluso al final del experimento, la degradación a 150 °C de la prolina es mínima. Incluso en el ensayo a 200 °C la cantidad de prolina degradada pasadas 4 horas de extracción es del 31% aproximadamente. Esto era esperable, pues las fichas de seguridad de la prolina dicen que su temperatura de descomposición es de aproximadamente 220 °C. Como con la degradación de la glucosa, observamos que la degradación de la prolina a las tres temperaturas de trabajo se ajusta considerablemente bien a una cinética de orden 1 (véase la Figura 16 b)).

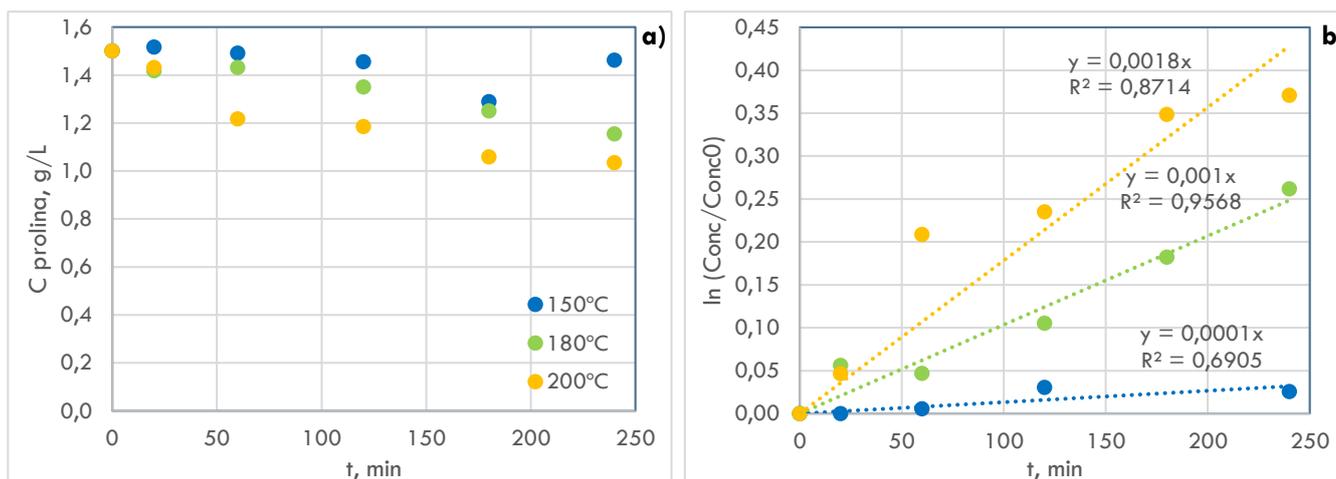


Figura 16 a) y b). Degradación de la Prolina a Distintas Temperaturas

A continuación, se calcula la Energía de Activación para comparar este experimento con la bibliografía. Para ello primero debemos calcular la constante cinética de degradación a cada temperatura, que es el negativo de la pendiente de las rectas de la Figura 11 b):

$$k_{150^{\circ}\text{C}} = 0.0001 \quad ; \quad k_{180^{\circ}\text{C}} = 0.001 \quad ; \quad k_{200^{\circ}\text{C}} = 0.0018$$

La relación lineal obtenida de la representación del inverso de la temperatura de operación (en Kelvin) frente al logaritmo de las constantes cinéticas se corresponde con la ecuación de Arrhenius linealizada (Figura 17):

$$k = A \cdot e^{Ea/RT} \quad \rightarrow \quad \ln k = \ln A - \frac{Ea}{RT}$$

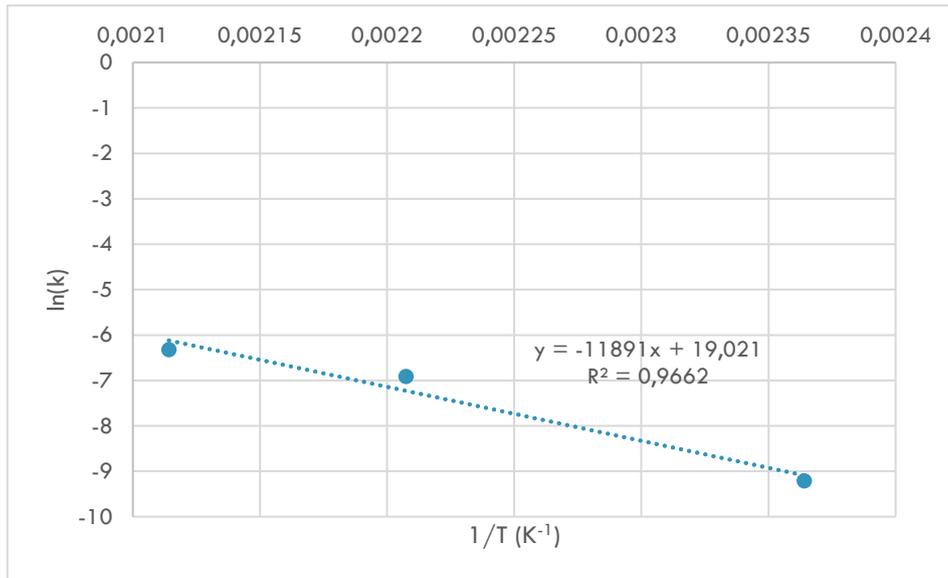


Figura 17. Representación de la Ecuación de Arrhenius Linealizada

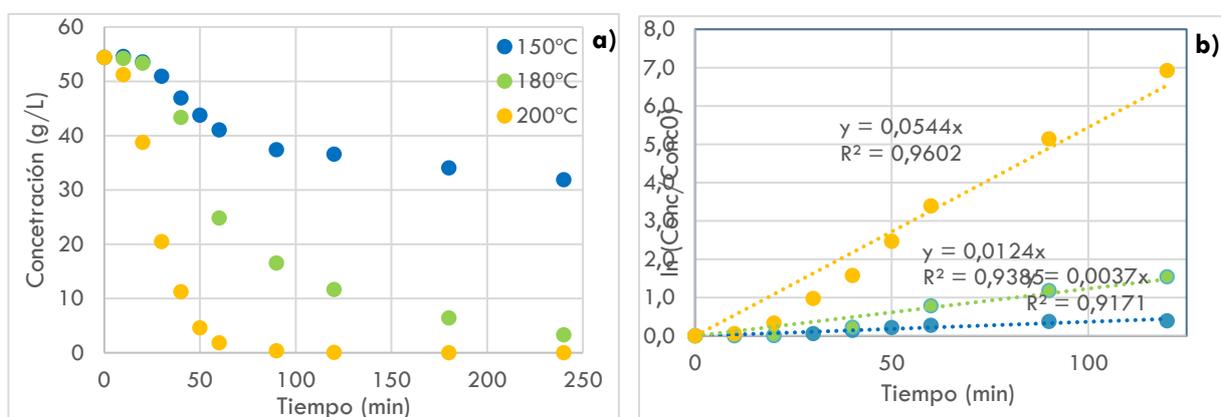
De esta forma sabemos que la pendiente de la recta de la Figura 17 es igual a $-E_a/R$, así que solo queda operar:

$$-\frac{E_a}{R} = -11891 [K] \rightarrow$$

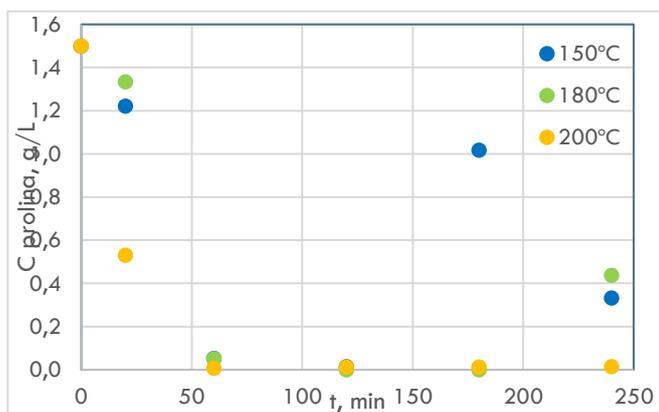
$$\rightarrow E_a = 11891 [K] \cdot R = 11891 [K] \cdot 8.314472 \left[\frac{J}{mol \cdot K} \right] = 98.867 \text{ kJ} \cdot \text{mol}$$

c. Estudio de la Degradación de la Mezcla (Glucosa + Prolina) en Agua Subcrítica

La Figura 18 a) describe la cinética de la mezcla de glucosa y prolina en agua subcrítica. Se muestra como la glucosa va desapareciendo de rápidamente a las tres temperaturas. Se aprecia que, en comparación con los experimentos de la glucosa sin mezclar, la degradación de la glucosa en la mezcla es más rápida a todas las temperaturas de trabajo. Esto se debe a que están teniendo lugar reacciones de Maillard entre la glucosa, que actúa como azúcar reductor, y la prolina, que es el aminoácido libre. En estas reacciones primero se unen el azúcar y el aminoácido; luego el azúcar se deshidrata y fragmenta y el aminoácido se degrada (en este punto los productos tienen absorción en el UV, pero apenas tiene color); y finaliza con una condensación aldólica y una condensación aldehído-amina (aquí ya tienen un color intenso). Las tendencias de descomposición en estos experimentos se ajustan considerablemente mejor a una cinética de primer orden (véase la figura 18 b).



En la Figura 19 se puede observar que la degradación de la prolina a 200°C sucede con mucha rapidez. Contrastando este suceso, en el que transcurrida 1 hora la prolina se ha consumido por completo por la reacción química, frente a los resultados del experimento con prolina sin mezclar, en el cual tras 4 horas a la misma temperatura no se llegó a degradar ni un tercio del producto inicial; podemos concluir que la presencia de la glucosa tiene efectos en esta la cantidad final de glucosa que no pueden pasarse por alto. Por desgracia, algunas muestras de las experiencias a 150 °C y 180 °C no pudieron ser analizadas correctamente, pues se ve que las señales obtenidas resultaron anormalmente bajas, lejos de cualquier tendencia, y que los viales estaban totalmente vacíos tras la medición. Esto podría explicarse argumentando que no había muestra suficiente para realizar correctamente el análisis.



De la degradación y reacción de la mezcla de glucosa y prolina se han ido formando otros compuestos. Entre ellos destacan los ácidos láctico (este en mayor cantidad), fórmico y acético; aparte de los compuestos que se formaban anteriormente. Una vez formados, se ha observado, al igual que en las otras experiencias, cómo estos mismos productos también se han ido degradando a 200°C; y esta vez de una forma más marcada y generalizada en el ensayo a 180 °C. Esta degradación de los compuestos formados se observó a 150 °C en algunos de los compuestos, pero en otros no se alcanzó la concentración máxima de los productos observada en temperaturas mayores (véanse las Figuras 20 a), b), c), d), e) y f)). Esta vez se volvió a formar un residuo sólido, pero la cantidad obtenida fue sensiblemente menor que con la glucosa.

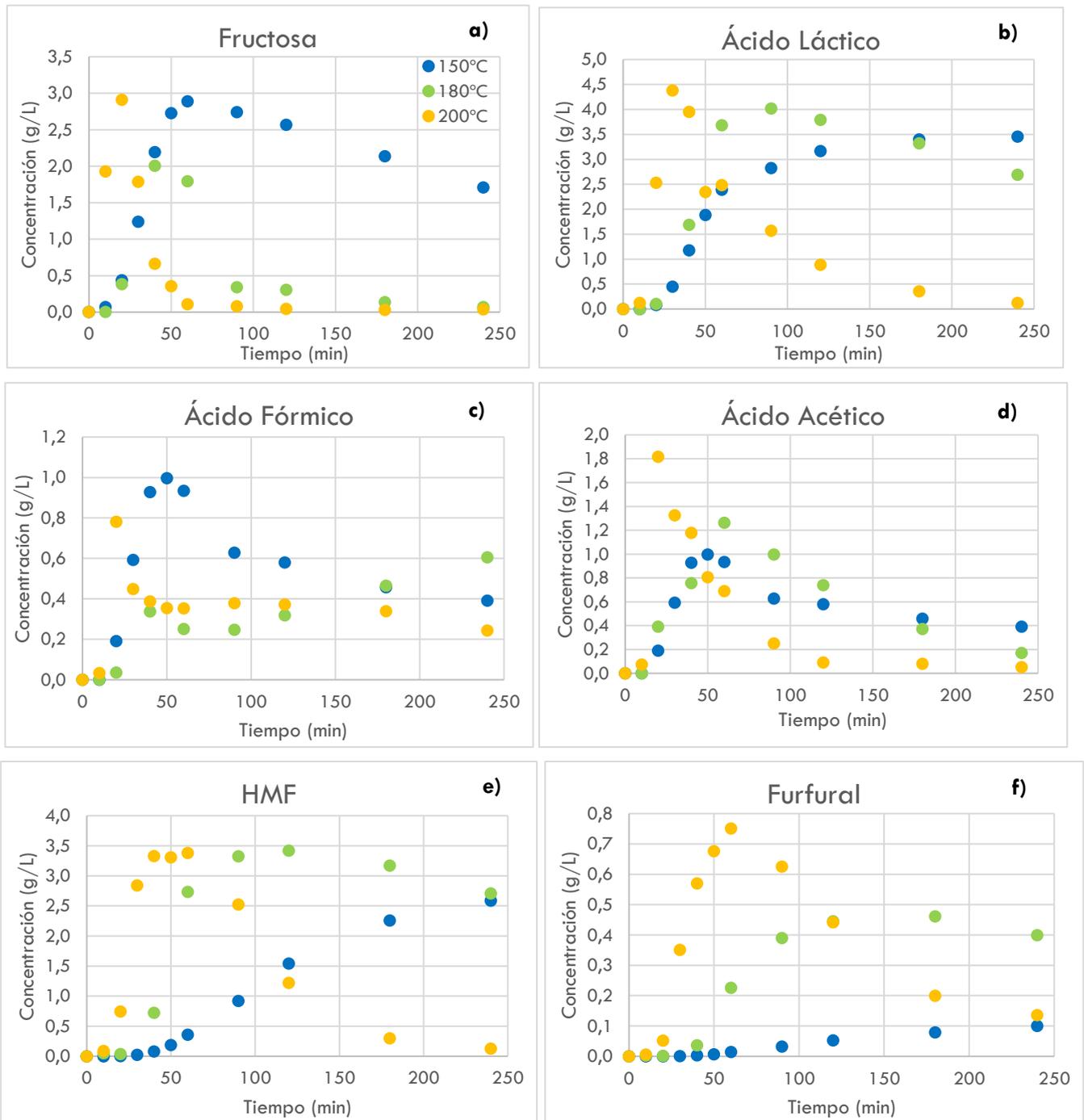


Figura 20 a), b), c), d), e) y f). Formación y degradación de a) Fructosa, b) Ácido Láctico, c) Ácido Fórmico, d) Ácido Acético, e) HMF y f) Furfural a 150 °C (●); 180 °C (●) y 200°C (●).

Por último, realizadas las medidas del FRAP para la cuantificación de la capacidad reductora; y del pardeamiento para la determinación de productos de Maillard, de las muestras de la mezcla; se representan de forma conjunta por temperaturas en la Figura 21 a), b) y c). Si que se puede observar una cierta tendencia de la capacidad reductora a crecer a medida que se originan los productos de Maillard, pero no sucede de forma inmediata. Esta relación se da cuando los tiempos de operación no son largos, pues en estos datos se observa que a partir de las 2 hora no hay correlación entre unos valores y otros, en especial a temperaturas de operación mayores.

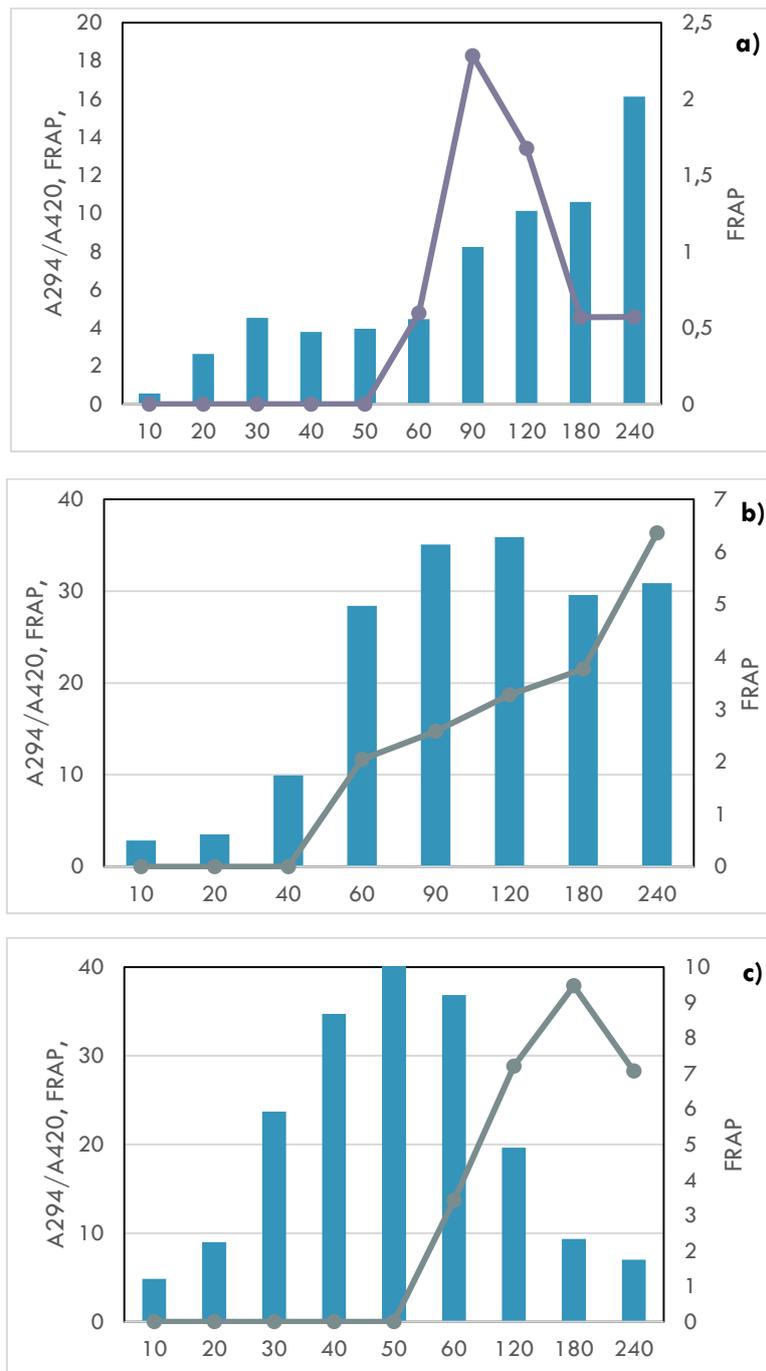


Figura 21 a), b) y c). Relación entre la formación de los productos de Maillard (b0arras) y la capacidad reductora (punto) a las temperaturas a) 150°C, b) 180°C y c) 200°C.

7. Bibliografía

- Alonso-Riaño, P., Sanz Diez, M.T., Beltrán, S., Trigueros, E., & Benito-Román, O. (2021). Subcritical water as hydrolytic medium to recover and fractionate the protein fraction and phenolic compounds from craft brewer's spent grain.
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Bobleter, O. (1994) Hydrothermal Degradation of Polymers Derived from Plants. *Progress in Polymer Science*, 19, 797-841. [http://dx.doi.org/10.1016/0079-6700\(94\)90033-7](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6700(94)90033-7)
- Cocero, M.J., Cabeza, Á., Abad, N., Adamovic, T., Vaquerizo, L., Martínez, C.M., & Pazo-Cepeda, M.V. (2018). Understanding biomass fractionation in subcritical & supercritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 133(August 2017), 550–565. doi:10.1016/j.supflu.2017.08.012.
- Jackowski, M., Semba, D., Trusek, A., Wnukowski, M., Niedzwiecki, L., Baranowski, M., ... Pawlak-Kruczek, H. (2019). Hydrothermal carbonization of brewery's spent grains for the production of solid biofuels. *Beverages*, 5(1), 12. doi:10.3390/beverages5010012.
- Lee, H.J., Saravana, P.S., Cho, Y.N., Haq, M., & Chun, B.S. (2018). Extraction of bioactive compounds from oyster (*Crassostrea gigas*) by pressurized hot water extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 141(January), 120–127. doi:10.1016/j.supflu.2018.01.008.
- Marcet, I., Álvarez, C., Paredes, B., & Díaz, M. (2016). The use of sub-critical water hydrolysis for the recovery of peptides and free amino acids from food processing wastes. Review of sources and main parameters. *Waste Management*, 49, 364–371. doi:10.1016/j.wasman.2016.01.009.
- Mussatto, S.I., Dragone, G., & Roberto, I.C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 1–14. doi:10.1016/j.jcs.2005.06.001.
- Sasaki M, Hayakawa T, Arai K, Adichiri T. Measurement of the rate of retro-aldol condensation of D-xylose in subcritical and supercritical water. Presented at the proceeding of the 7th international symposium on hydrothermal reactions; 2003. p. 169e176.
- Torres-Mayanga, P.C., Azambuja, S.P.H., Tyufekchiev, M., Tompsett, G.A., Timko, M.T., Goldbeck, R., ... Forster-Carneiro, T. (2019). Subcritical water hydrolysis of brewer's spent grains: Selective production of hemicellulosic sugars (C-5 sugars). *Journal of Supercritical Fluids*, 145(September 2018), 19–30. doi:10.1016/j.supflu.2018.11.019.
- Yu Y, Lou X, Wu H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hotcompressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. *Energy & Fuels* 2008;22:46e60
- R. Melgosa, E. Trigueros, M. T. Sanz, M. Carneira, L. Rodrigues, N. Fernández, A. A. Matias, M. R. Bronze, M. Marques, A. Paiva, P. Simões,
- Supercritical CO2 and subcritical water technologies for the production of bioactive extracts from sardine (*Sardina pilchardus*) waste, *The Journal of Supercritical Fluids*, Volume 164, 2020, 104943, ISSN 0896-8446, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104943>.



Universidad de Burgos
Facultad de Ciencias

**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN: Químicas
CURSO: 2020-2021**

Dña. María Teresa Sanz Diez y Dña. Sagrario Beltrán Calvo informan de que el alumno Don Íñigo González Sainz, ha realizado el trabajo "Estudio de las cinéticas de degradación de compuestos obtenidos en la hidrólisis del bagazo de cerveza mediante agua subcrítica" bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indiquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 16 de junio de 2021

Fdo.: María Teresa Sanz Diez

Fdo.: Sagrario Beltrán Calvo

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Don Íñigo González Sainz y Dña. María Teresa Sanz Diez y Dña Sagrario Beltrán Calvo autor y tutoras del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 16 de junio de 2021

Fdo.: Íñigo González Sainz

Fdo.: María Teresa Sanz Diez Sagrario Beltrán Calvo