



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Influencia de la temperatura y la aplicación de ultrasonidos
en la cinética de extracción de proteínas de bagazo de
cerveza

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Cucó Aranda, Paula

Tutor/a: Cárcel Carrión, Juan Andrés

Cotutor/a externo: Umaña Zamora, Monica Maria

Director/a Experimental: Ibáñez Daudén, Adda

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Influencia de la temperatura y la aplicación de
ultrasonidos en la cinética de extracción de proteínas
de bagazo de cerveza

Trabajo Final de Grado
Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Cucó Aranda, Paula
Tutor/a: Cárcel Carrión, Juan Andrés
Cotutor/a externo: Umaña Zamora, Mónica María
Director/a Experimental: Ibáñez Daudén, Adda
CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

TRABAJO FINAL DE GRADO

Valencia, 2024

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE BAGAZO DE CERVEZA

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2020-2024

Autor: Cucó Aranda, Paula

Tutor académico: Cárcel Carrión, Juan Andrés

Directora experimental: Ibáñez Daudén, Adda

Tutora externa: Umaña Zamora, Mónica María

Departamento: Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos –

FoodUPV. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del

Medio Natural (ETSIAMN UPV).

RESUMEN:

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas no destiladas más consumida en todo el mundo. Uno de los principales subproductos que aparece durante su elaboración es el bagazo de cerveza (BSG: Brewer Spent Grain), que es el residuo sólido que se obtiene después del prensado y filtrado del mosto de cerveza. El bagazo supone el 85% de los residuos totales generados por lo que su descarte implica un gran impacto ambiental y económico. Su aprovechamiento como fuente alternativa de proteínas puede resultar muy interesante dada la importancia que están adquiriendo las proteínas de origen vegetal en el desarrollo de productos veganos y vegetarianos. Además, este aprovechamiento permitiría contribuir a una economía circular.

Debido a esto, el objetivo principal de este Trabajo fin de Grado fue determinar la influencia de la temperatura y la aplicación de ultrasonidos en la cinética de extracción de proteína de bagazo de cerveza. Para ello, se obtuvieron cinéticas experimentales de extracción (hasta 40 min) de proteínas de bagazo en medio alcalino con y sin (control) la aplicación de ultrasonidos de potencia (500 W/L) a dos temperaturas (25 y 50 °C). Los resultados indicaron que la cavitación acústica realizada por los ultrasonidos favoreció la extracción proteica (rendimiento de 38,34%) frente a la agitación mecánica (rendimiento de 14,46%) a 25 °C. Sin embargo, la subida de la temperatura de extracción de 25 a 50 °C no supuso un aumento significativo en el rendimiento de extracción proteico con la aplicación de ultrasonidos (37,66%). Las cinéticas se modelizaron con el modelo de Weibull. El modelo propuesto fue capaz de simular los procesos de extracción con gran exactitud (R^2 entre los rendimientos experimentales y calculados entre 0,93 - 0,99) y permitió la cuantificación de la influencia de las variables estudiadas en el proceso.

Palabras clave: Extracto proteico; rendimiento de extracción; cavitación acústica.

ABSTRACT:

Beer is one of the most consumed non-distilled alcoholic beverages worldwide. One of the main by-products that appear during its production is brewer's spent grain (BSG), which is the solid residue obtained after pressing and filtering the beer wort, accounting for 85% of the total generated waste. Therefore, its disposal has a significant environmental and economic impact. The up-cycling of BSG as an alternative protein source can be very interesting given the increasing importance of plant-based proteins in developing vegan and vegetarian products. Additionally, this use would contribute to a circular economy.

Due to this, the main objective of this Thesis was to determine the influence of temperature and the application of ultrasound on the kinetics of protein extraction from BSG. For this purpose, experimental protein extraction kinetics (40 min) from spent grain in an alkaline medium were obtained with and without (control) application of power ultrasound (500 W/L) at two temperatures (25 and 50 °C). It was found that acoustic cavitation favored protein extraction (yield of 38.34%) compared to mechanical agitation (yield of 14.46%) at 25 °C. The increase of extraction temperature from 25 to 50 °C with the application of ultrasound (37.66%) did not increase the yield. The kinetics were modelled with the Weibull model. The proposed model was able to simulate the extraction processes with great accuracy (R^2 between experimental and calculated yields between 0,93 - 0,99) and permitted the quantification of the tested variables in the process.

Key words: Protein extract; extraction yield; acoustic cavitation.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	5
1. ODS	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. El desperdicio alimentario. Revalorización del producto	7
2.2. Bagazo de cerveza (BSG)	7
2.3. Proteína de bagazo de cerveza. Métodos de extracción	9
2.4. Ultrasonidos	9
2.4.1. Aplicación de ultrasonidos en procesos de extracción de proteínas	10
2.5. Modelización	11
2.5.1. El modelo de Weibull.....	11
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1. Materiales	14
4.1.1. Materia prima	14
4.1.2. Reactivos	14
4.2. Diseño experimental	15
4.3. Extracción con agitación	15
4.4. Extracción con ultrasonidos	15
4.4.1. Caracterización de la potencia acústica. Estudio calorimétrico.....	16
4.5. Método Bradford para la determinación de proteínas	17
4.6. Modelización	18
4.7. Análisis estadísticos	19
5. RESULTADOS	20
5.1. Caracterización del BSG	20
5.2. Caracterización de la potencia acústica	20
5.3. Cinéticas de extracción	20
5.4. Modelización de las cinéticas de extracción	22
6. CONCLUSIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de elaboración de cerveza (Lynch et al., 2016).....	8
Figura 2. Composición de BSG (Lynch et al., 2016).....	9
Figura 3. Montaje experimental para las cinéticas de extracción asistidas por agitación mecánica.....	15
Figura 4. Equipo de ultrasonidos.....	17
Figura 5. Esquema del proceso experimental de extracción de proteínas.....	17
Figura 6. Esquema de aplicación del Método Bradford.....	18
Figura 7. Cinética de extracción con agitación mecánica a 25 °C y 50 °C. Los valores experimentales se presentan como puntos y los calculados por el modelo como línea continua.....	22
Figura 8. Cinética de extracción con ultrasonidos a 25°C y 50 °C. Los valores experimentales se presentan como puntos y los calculados por el modelo como línea continua.	22
Figura 9. Rendimientos proteicos experimentales (Yexp) vs calculados (Ycalc) obtenidos con agitación a 25 °C	24
Figura 10. Rendimientos proteicos experimentales (Yexp) vs calculados (Ycalc) obtenidos con agitación a 50 °C	24
Figura 11. Rendimientos proteicos experimentales (Yexp) vs calculados (Ycalc) obtenidos con la aplicación de ultrasonidos a 25 °C.....	25
Figura 12. Rendimientos proteicos experimentales (Yexp) vs calculados (Ycalc) obtenidos con la aplicación de ultrasonidos a 50 °C.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos sometidos a la extracción alcalina con ultrasonidos.....	11
Tabla 2. Estudios realizados con modelo de Weibull	12
Tabla 3. Cantidades de DM para patrones	18
Tabla 4. Densidad acústica de las sondas estudiadas	20
Tabla 5. Nomenclatura de las extracciones	20
Tabla 6. Rendimientos proteicos de extracción (%).....	21
Tabla 7. Parámetros del modelo de Weibull identificados para las cinéticas de extracción de proteínas de bagazo de cerveza, con agitación y con aplicación de ultrasonidos a diferentes temperaturas.	23

1. ODS

Los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) a cumplir en este proyecto son los siguientes:

- ODS 2. Hambre cero: Obtención de una fuente alternativa de proteína que permita combatir el hambre y la desnutrición, que siguen siendo grandes obstáculos para el desarrollo de muchos países.
- ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras: Desarrollo de procesos industriales más eficientes y que generen menor impacto.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El desperdicio alimentario. Revalorización del producto

Según la AESAN el desperdicio alimentario se puede definir como aquellos productos agrícolas y alimentarios descartados de la cadena alimentaria que siguen siendo perfectamente comestibles y adecuados para el consumo humano y que, a falta de usos alternativos, terminan desechados como residuo. El sector de producción y procesado de alimentos contribuye en un 30% al desperdicio alimentario. Por ello se plantea la revalorización de los subproductos generados en el procesado como alternativa necesaria hacia un cambio a una economía circular (AESAN, 2024)

Los subproductos de cervecería se caracterizan por un alto contenido en proteínas y fibra, componentes de gran importancia económica y nutricional en el desarrollo de una formulación. El bagazo de cerveza (Brewer Spent Grain (BSG) en inglés) es el subproducto mayoritario, representando el 85% de los subproductos sólidos de la industria cervecera (Cerisuelo & Bacha, 2021). El BSG se trata de un material lignocelulósico, derivado de una fuente natural, la cebada. Hoy en día, está principalmente destinado al consumo directo animal o a la elaboración de piensos. Sin embargo, existe un creciente interés en posibles aplicaciones en la industria alimentaria y otras, como las industrias de biomateriales o productos químicos de alto valor, debido a su gran similitud con el carbono fósil (Zeko-Pivač et al., 2022). También se puede observar una posible aplicación desde el punto de vista alimentario en la elaboración de alimentos proteicos cuya fuente de proteína sea no animal.

Diversos estudios han demostrado el reciente interés de los consumidores por las proteínas de origen vegetal como alternativa para la proteína animal. Esto también ha sido impulsado por la tendencia actual por adoptar dietas veganas o vegetarianas basadas en la ausencia de todo producto de origen animal. Este cambio ha creado un nuevo enfoque hacia la producción de cereales y leguminosas como fuentes de obtención de proteína (Onwezen et al., 2021).

Por lo tanto, la extracción de proteínas del BSG proporcionaría una fuente de proteínas alternativa que podría satisfacer las necesidades de los consumidores (Rodríguez et al., 2023), facilitar la implantación de una economía circular, e incrementar la apuesta por la reducción y reutilización de residuos de la industria alimentaria.

2.2. Bagazo de cerveza (BSG)

Existe un aumento mundial del consumo de cerveza en los últimos cincuenta años, que ha conseguido superar al consumo de vino en un factor de 7. Esto ha hecho que la producción anual de BSG ha alcanzado un volumen promedio de 39 millones de toneladas en el mundo, de las cuales, 3,4 millones corresponden a la Unión Europea. Se producen alrededor de 20 kg de BSG húmedo por cada 100 L de cerveza elaborada, que se vende con un precio medio de 35€/tonelada para la elaboración de piensos (Lynch et al., 2016a).

Según se expone en el Reglamento (UE) No 68/2013 (2013) relacionado con la fabricación de cerveza, el bagazo de cerveza (BSG) se trata del producto de cervecería compuesto por residuos de cereales malteados o no malteados y otros productos amiláceos, que pueden contener materias de lúpulo. Tras el proceso de maceración, la fracción insoluble del grano de cebada, el BSG, está mezclado con el mosto soluble (líquido). El mosto se filtra a través del BSG y de ahí se fermenta la cerveza, pero el bagazo se elimina como subproducto de su elaboración (Lynch et al., 2016).

El proceso de elaboración de cerveza se inicia con la germinación y tostado de la cebada para obtener la malta. Seguidamente se tritura con agua caliente y sufre una disolución del 75% de su contenido. La malta se filtra para separarla del extracto acuoso obteniendo así el mosto que añadiendo el lúpulo pasa por el proceso de cocción. El residuo sólido es el denominado BSG. Posteriormente, el mosto sufre una fermentación en la que los azúcares se transforman en alcohol y CO₂, seguido de una maduración y clarificación (Burini et al., 2021).

En la figura 1 se presenta un diagrama de bloques simplificado del proceso de elaboración de la cerveza.

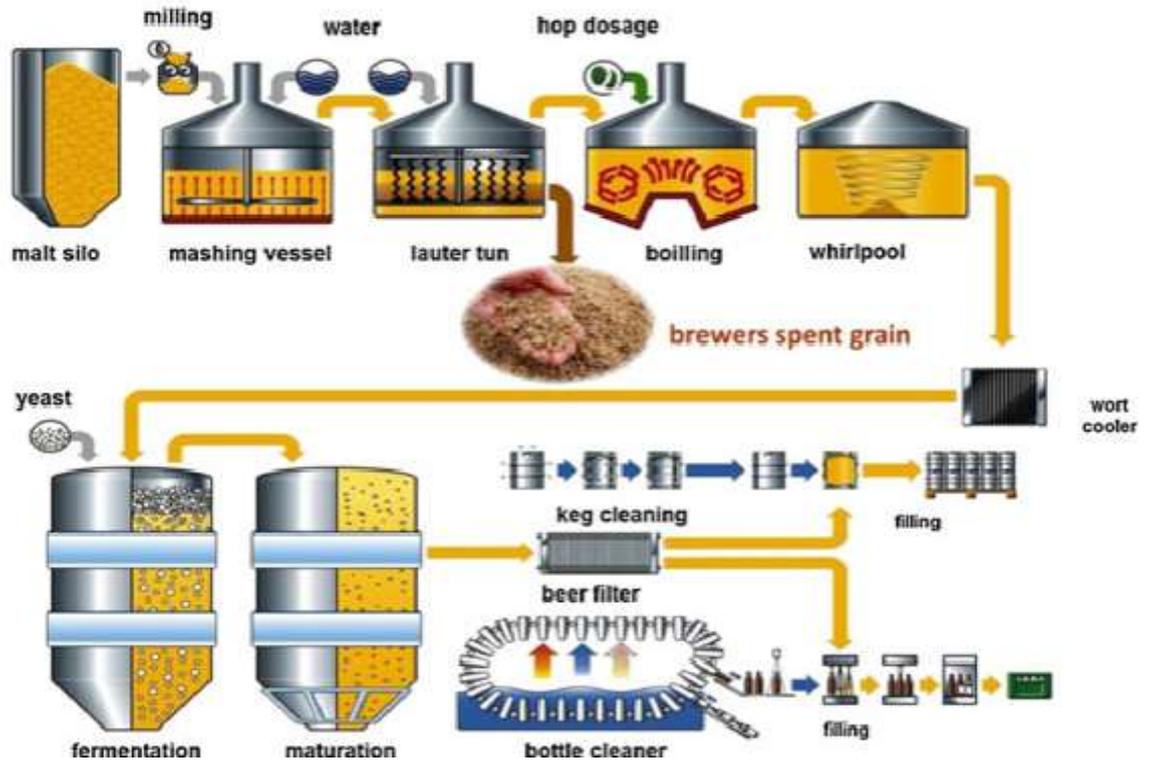


Figura 1. Proceso de elaboración de cerveza (Lynch et al., 2016)

El BSG se trata de una sustancia heterogénea, diferente entre cervecerías y tipos de elaboración, cuya composición puede variar en función de la variedad de cereal, el tiempo de cosecha, el tipo de lúpulo agregado o el régimen de malteado y macerado. Se puede definir el BSG como un material lignocelulósico, porque está formado principalmente de fibra (celulosa y hemicelulosa), proteína y lignina (Lynch et al., 2016). La fibra se encuentra en una proporción entre 42 y 50%, y la proteína puede representar hasta un 30% del BSG en peso seco (figura 2). Dichas proteínas presentan un perfil de aminoácidos similar al del cereal de origen (cebada), siendo leucina, fenilalanina y valina los aminoácidos esenciales más relevantes (Cerisuelo & Bacha, 2021).

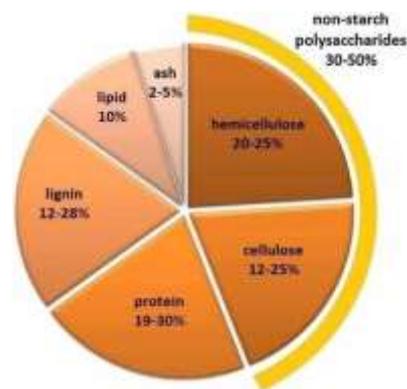


Figura 2. Composición de BSG (Lynch et al., 2016)

2.3. Proteína de bagazo de cerveza. Métodos de extracción

Según la FAO las proteínas son grandes moléculas de aminoácidos que se pueden encontrar en alimentos de origen animal y vegetal. Constituyen los principales componentes de las células y tejidos. Por lo tanto, son necesarias para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del cuerpo. Además, también son componentes esenciales de ciertas hormonas (FAO, 2024).

Los aminoácidos esenciales constituyen aproximadamente el 30% de la proteína total del BSG, siendo la lisina uno de ellos. Esto es interesante ya que la lisina suele ser el aminoácido limitante de gran cantidad de alimentos. Un estudio realizado por Connolly et al. (2013) reveló que la glutamina y prolina fueron los aminoácidos más abundantes en aislados de BSG. Además, Bazsefidpar et al. (2024) indicaron que los hidrolizados de proteínas de BSG presentaban capacidad antioxidante y antidiabética.

En los últimos años se han estudiado distintos métodos de extracción de proteínas a partir de BSG (proteínas aisladas, hidrolizadas o concentradas) entre los que se encuentran la extracción etanólica, alcalina, o enzimática (Rodríguez et al., 2023). La extracción alcalina se trata de una técnica comúnmente utilizada ya que permite obtener un rendimiento de extracción de proteínas relativamente alto ya que estas condiciones ($\text{pH} > 7$) permiten descomponer la matriz celular de la planta y solubilizar las proteínas (Hadidi et al., 2023). Se ha demostrado que la aplicación de pretratamientos a la muestra, ya sea de forma enzimática o hidrotermal, o la combinación con otras tecnologías como el uso de ultrasonidos o microondas, mejora el rendimiento de los procesos de extracción. Sin embargo, la extracción alcalina seguida de una precipitación por acidificación puede generar alteraciones en la estructura proteica debido a las temperaturas empleadas. Es por ello que se están estudiando otros métodos de extracción como la ultrafiltración, la asistencia de ultrasonidos u otras técnicas más avanzadas, que permitan la recuperación de las proteínas de BSG (Bonifácio-Lopes et al., 2020).

2.4. Ultrasonidos

Los ultrasonidos de potencia se tratan de una tecnología emergente respetuosa con el medio ambiente, no térmica, que se diferencia de otros métodos de extracción convencionales por su capacidad para mejorar la transferencia de masa a través de paredes celulares (Umaña, 2015), lo que permite generar un mayor rendimiento de la extracción. Esto es debido a los efectos que generan los ultrasonidos como el fenómeno de cavitación acústica, variaciones de presión, esfuerzos cortantes o la generación de microcorriente.

Los ultrasonidos son ondas de mecánicas de frecuencia superior al límite de audición del oído humano (Gallo et al., 2018), es decir, presentan frecuencias superiores a 20 kHz (Cárcel et al., 2011). La cavitación acústica es el fenómeno que ocurre debido a la aplicación de ondas ultrasónicas en medios líquidos. Consiste en la formación, crecimiento e implosión de nano/microburbujas de gas en el interior del líquido debido a las diferencias de presión producidas por las ondas ultrasónicas. Además, la propagación de los ultrasonidos a través del fluido produce que las moléculas oscilen alrededor de su estado en equilibrio, haciendo continuas modificaciones en las distancias intermoleculares. Es decir, ocurren fenómenos de compresión-descompresión (Umaña et al., 2020).

2.4.1. Aplicación de ultrasonidos en procesos de extracción de proteínas

Diversos trabajos han estudiado el empleo de la ultrasonicación para mejorar la capacidad de extracción de proteínas. La mayoría se centran en la determinación de las mejores condiciones del proceso o en los diversos impactos de su funcionamiento (Dabbour et al., 2021a). Así, por ejemplo, Tang et al. (2009) determinaron que las condiciones óptimas para la extracción de proteína de BSG con ultrasonidos en medio alcalino fueron: pH=10 (usando disolvente alcalino como el tampón carbonato), relación muestra-disolvente de 2,0g/100 mL (p:v), potencia de ultrasonidos de 88,2 W/100 mL, tiempo de 81,4 minutos. En estas condiciones alcanzaron un rendimiento proteico de $96,4 \pm 3,5$ mg/g BSG (Bonifácio-Lopes et al., 2020).

El rendimiento de la extracción está fuertemente influenciado por los diversos parámetros del proceso (Suchintita Das et al., 2022):

- Potencia acústica (Power): es la energía acústica aplicada por unidad de tiempo. Se expresa directamente en vatios o como porcentaje de potencia acústica total del equipo. Las altas potencias (500 W) pueden favorecer la extracción de proteínas, pero también producir una disminución significativa en el rendimiento proteico debido a la formación de puentes de disulfuro por la oxidación de los aminoácidos que contienen azufre, ya que durante la sonicación se pueden generar radicales libres de hidroxilo.
- Amplitud: indica la altura máxima del ciclo de onda o la cantidad máxima de desplazamiento de una partícula del medio desde su posición de reposo. Se expresa en μm . Aumentos en la amplitud producen aumentos en la intensidad y en la potencia de onda. También hay que tener en cuenta que tratamientos ultrasónicos prolongados pueden llevar a una cavitación excesiva y a la agregación de las proteínas.
- Ciclo de trabajo: La aplicación de ultrasonidos en medio líquido produce calentamiento. Para evitar calentamientos excesivos, los ultrasonidos se pueden en forma de pulsos. Así, el ciclo es el porcentaje de tiempo durante el cual la señal de ultrasonidos está encendida. Por lo tanto, se puede aplicar ciclos en modo pulsado, en el que la energía acústica se transmite en ráfagas, o un ciclo continuo, en el que la energía acústica se transmite continuamente (100%). Li et al. (2021) realizó un estudio sobre BSG a distintos ciclos (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) a 250 W durante 20 min. Estos autores concluyeron que los rendimientos aumentaron de forma lineal con la duración del ciclo hasta alcanzar un máximo al 80% donde se estabilizó. Al llegar al 100% (ciclo de trabajo continuo) se observó una ligera disminución. Hay que considerar que, ciclos de trabajo prolongados pueden llevar a la desnaturalización de las proteínas debido al aumento térmico.
- Temperatura: el aumento en la temperatura de extracción favorece la difusión de las proteínas y destruye los enlaces con otros compuestos de la muestra permitiendo una liberación más rápida. Sin embargo, las altas temperaturas pueden producir la

desnaturalización de las proteínas además de una reducción del impacto por cavitación.

- pH: los disolventes más comunes son los alcalinos porque conducen a la solubilización de la proteína. Posteriormente, se baja el pH y se produce la precipitación ácida en el punto isoeléctrico de las proteínas. De hecho, el proceso de extracción alcalina asistida por ultrasonidos ha sido utilizado en diversos estudios como los presentados en la tabla 1:

Tabla 1. Productos sometidos a la extracción alcalina con ultrasonidos

Producto de extracción	Bibliografía
Soja	Eze et al. (2022)
Semilla de onagra	Hadidi et al. (2021)
Semilla de melón amargo	Naik et al. (2022)
Salvado de sésamo	Görgüç et al. (2019)

2.5. Modelización

La modelización se trata de una herramienta muy útil para simular, optimizar, controlar y diseñar los distintos procesos alimentarios debido a su capacidad para describir y predecir el comportamiento de un sistema sometido a las diferentes condiciones de operación (M. Umaña, 2015).

En el planteamiento matemático del modelo deben establecerse relaciones matemáticas entre las variables del proceso para definir ecuaciones representativas. Estas relaciones pueden ser de carácter fenomenológico o empírico. Los modelos fenomenológicos están basados en la formulación de leyes físicas, como los derivados de la teoría de la difusión o de la segunda Ley de Fick. En cambio, los modelos empíricos, o no paramétricos, son aquellos que derivan de datos experimentales (Lendinez, 2018). Los modelos empíricos en general, no interpretan fenómenos físicos ya que su principal objetivo es determinar las variables relevantes y describir las relaciones entre ellas (Blasco et al., 2006).

2.5.1. El modelo de Weibull

El modelo empírico de Weibull está basado en una función probabilística utilizada para predecir el comportamiento de los sistemas complejos variantes. En la industria alimentaria, se ha aplicado para describir procesos degradativos, inactivación enzimática, crecimiento o supervivencia de microorganismos, digestión in vitro y/o degradación química (Lendinez, 2018). Este modelo se define en la ecuación 1.

$$\frac{Y - Y_{eq}}{Y_0 - Y_{eq}} = e \left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \right] \quad \text{Ecuación 1.}$$

Como se observa en la ecuación 1, el modelo se trata de una ecuación exponencial, donde:

- Y: Concentración de analito.
- Y_{eq} : Concentración final de analito.
- Y_0 : Concentración inicial del analito a extraer (en este caso, proteína).
- α está relacionado con la cinética del proceso, que representa la inversa a la constante de velocidad.

- β representa el comportamiento de la materia prima, de forma que:
 - o $\beta = 1$, la extracción sigue una cinética de primer orden.
 - o $\beta < 1$, la extracción adquiere forma convexa de forma que la velocidad disminuye con el tiempo, como se presenta en procesos de extracción.
 - o $\beta > 1$, la curva adquiere forma cóncava y la velocidad de extracción aumenta con el tiempo.

En la Tabla 2 se muestran distintos estudios en los que se ha aplicado el modelo de Weibull en procesos de extracción:

Tabla 2. Estudios realizados con modelo de Weibull

Materia Prima	Compuesto de interés	Bibliografía
Naranja	Pectina	Umaña (2015)
Agar-Agar	Compuestos fenólicos	Filipigh (2019)
Remolacha	Betanina	Menor et al. (2018)
Alcachofa	Polifenoles	Lendinez (2018)
Setas	Ergosterol	Umaña et al. (2020)

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo fin de Grado fue determinar la influencia de la temperatura y la aplicación de ultrasonidos en la cinética de extracción de proteína de bagazo de cerveza.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos específicos:

2. Acondicionar y caracterizar BSG obtenido como residuo en una cervecera para utilizarlo como materia prima en los procesos de extracción de proteínas.
3. Evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonidos y la temperatura en el rendimiento del proceso de extracción de proteínas.
4. Simular matemáticamente las cinéticas de extracción de proteínas del bagazo de cerveza asistidas por ultrasonidos y agitación mecánica a diferentes temperaturas (25 y 50 °C).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. *Materia prima*

La materia prima objeto de estudio fue el bagazo de cerveza (BSG: Brewer Spent Grain), principal residuo de la elaboración de esta. El BSG fue proporcionado por la empresa LA SOMNIADA COOP. V. - CERVECERÍA L'AUDAÇ y se obtuvo durante la preparación de la cerveza de malta tipo Pilsen, caramelizada y tostada. Una vez recibido en el laboratorio, el bagazo se congeló a -18 °C hasta su acondicionamiento.

La humedad del bagazo se determinó a partir de un proceso de secado a 103 °C hasta peso constante, siguiendo el método AOAC 935,29 (AOAC, 2000) y se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad base húmeda (bh)(\%)} = \frac{\text{Peso muestra húmeda} - \text{Peso muestra seca}}{\text{Peso de la muestra húmeda}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Acondicionamiento de muestra:

Secado:

Con el fin de contar con una materia prima estable y homogénea así lograr el objetivo 1 se realizó un proceso de secado para disminuir la humedad del BSG y así obtener un polvo con un tamaño de partícula adecuado y en una cantidad representativa.

El proceso se realizó depositando en bandejas de aluminio rectangulares aproximadamente 300 g de BSG congelado. Posteriormente, se introdujo en una estufa de vacío a 60 °C con una presión de -0,8 atm durante 24 h. Luego, las muestras se atemperaron a 30 °C en la estufa y se pesaron para comprobar la pérdida de peso. En este proceso se obtuvo una pérdida del 65-70% del peso inicial, de tal manera que se eliminó prácticamente todo el contenido de agua de la muestra

Molienda:

La muestra se molió en un molinillo de café para alcanzar un tamaño homogéneo. Posteriormente se tamizó con un tamiz de porosidad $\leq 400 \mu\text{m}$ sobre un papel de filtro para evitar grumos y pérdidas de muestra. Una vez tamizado, el polvo obtenido se envasó al vacío (100%) en bolsas de plástico y se almacenó a -18 °C hasta su uso.

Contenido de proteínas en el BSG

El contenido de proteína del BSG utilizado se determinó mediante un proceso de combustión a 1000 °C. De esta forma, se transformó el Nitrógeno total en Nitrógeno gaseoso o óxido de nitrógeno, el cual fue detectado posteriormente mediante una cromatografía de gases (Thompson, 2008). El contenido de proteínas se calculó a partir del nitrógeno determinado al que se le aplicó un factor de 6,25.

4.1.2. *Reactivos*

Los reactivos utilizados para este trabajo fueron los siguientes:

- NaOH 110mM (Scharlau, SO4201000)
- Disolución Bradford (Brilliant Blue G)

4.2. Diseño experimental

Para conseguir el objetivo 2 de este trabajo se llevaron a cabo experimentos de cinéticas de extracción de proteínas en diferentes condiciones. Específicamente, se llevaron a cabo cinéticas de extracción obtenidas mediante agitación mecánica como control y mediante la aplicación de ultrasonidos de potencia. Por otra parte, también se evaluaron dos temperaturas de extracción 25 y 50 °C.

Todas las extracciones se llevaron a cabo en un medio alcalino (solución de NaOH 110 mM) pues se ha observado en varios estudios que esté es un disolvente adecuado para la extracción de proteínas de BSG. Todas las cinéticas de extracción se llevaron a cabo como mínimo por triplicado.

4.3. Extracción con agitación

La extracción de proteínas con agitación mecánica se llevó a cabo en un vaso de precipitados de 250 mL utilizando un agitador (RZR 1, Heidolph) conectado a un accesorio de un aspa y ajustando la agitación a 200 rpm. El vaso se sumergió en un baño termostático (Termotronic 100, P-Selecta) cuya temperatura se ajustó a 25 o 50 °C según correspondió. La temperatura se controló mediante un termómetro sumergido en el líquido y con el sistema de control interno del equipo. El montaje se puede observar en la figura 3.

Una vez conseguida la temperatura deseada, comenzó el proceso de extracción añadiendo 120 mL de NaOH 110 mM y 8 g de BSG (ratio 1:15). Este relativamente bajo ratio se fijó para evitar que la saturación del solvente puede producir la reducción de la transferencia de masa. Durante la extracción se obtuvieron muestras de 1 mL de la disolución utilizando una jeringuilla de 3 mL a los siguientes tiempos: 3, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 40 min. En la figura 5 se observa un esquema de este proceso.

El volumen extraído se diluyó en proporción 1:6 (1 mL de muestra: 5 mL de agua destilada) en un vaso. Se agitó manualmente la disolución y se filtró mediante una jeringuilla y un filtro acoplado a la misma (filtro de nylon de 0,45 μ m) para conseguir un mínimo de 0,5 mL en un eppendorf (rotulado previamente). Dichas muestras se congelaron anotando fecha y nombre de extracción, para posteriormente medir el contenido de proteínas con el Método Bradford.



Figura 3. Montaje experimental para las cinéticas de extracción asistidas por agitación mecánica

4.4. Extracción con ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos se llevó a cabo con un equipo de ultrasonidos (Hielscher, UP400St, Berlín (Alemania)) conectado a una sonda de 22 mm de diámetro. La extracción se llevó a cabo en un vaso de encamisado, con capacidad de 600 mL, conectado a un

baño de recirculación (VWR, USA – Pennsylvania). Dicho baño permitió controlar la temperatura durante todo el proceso de extracción (40 min) ya que los ultrasonidos aumentan rápidamente la temperatura de la solución. Para la extracción a 25 °C se ajustó el baño a 5 °C, y para la extracción a 50 °C se ajustó a 35 °C. En ambos casos, se colocó una sonda de temperatura dentro del vaso encamisado para controlar que el proceso se lleva a cabo a la temperatura deseada, La sonda medió la temperatura en todo momento de la extracción. Si se se superaba la temperatura establecida, se conecta la circulación de agua del baño de atemperamiento por el vaso de encamisado para disminuir su temperatura. Las temperaturas del baño se establecieron haciendo ensayos previos para que durante los 40 min de extracción la muestra se mantuviera a la temperatura deseada. El montaje experimental se puede observar en la figura 4.

Las condiciones de trabajo utilizadas en este proceso de extracción con ultrasonidos fueron las siguientes:

- Potencia = 260 W
- Amplitud = 100%
- Ciclo = 60%
- Tiempo = 40 min

Tal y como se detalló anteriormente para la extracción asistida por agitación mecánica, las extracciones con aplicación de ultrasonidos se llevaron a cabo introduciendo 120 mL de NaOH 110 mM en el vaso y añadiendo 8 g de BSG. Durante la extracción se obtuvieron alícuotas de 1 mL de la solución a los tiempos indicados anteriormente y se diluyó, filtró y almacenó tal y como se describe en el apartado relativo a las experiencias de agitación mecánica. Un esquema de todo este proceso experimental se puede observar en la Figura 5.

Posterior a la extracción, tanto con agitación como con la aplicación de ultrasonidos, se separó el sólido del líquido mediante centrifugación. El sólido sobrante puede contener otras moléculas interesantes como celulosa y por lo tanto se pretende utilizar como materia prima para estudios posteriores.

El contenido restante de la extracción se sometió a centrifugación (Orto alresa, Bioprocent 22 R) previamente acondicionada a 10 °C por 20 min a 9341 rpm (rotor 153). Se recogió el sobrenadante proteico (líquido) y se congeló. El residuo sólido se volvió a suspender con 120 mL de agua destilada en un vaso de precipitados y se sometió a agitación magnética durante 10 min para eliminar el exceso de NaOH. Se separó el sólido de nuevo por centrifugación y se almacenó congelado para posteriores estudios.

4.4.1. Caracterización de la potencia acústica. Estudio calorimétrico

La densidad acústica (W/L) real suministrada al sistema se determinó por calorimetría. El método se basa en la determinación del incremento de temperatura de la solución sometida a ultrasonidos durante los primeros minutos de aplicación. Así, se preparó una suspensión de 120 mL de NaOH 110 mM y 8 g de BSG, para que los resultados sean lo más parecidos a la experimentación posterior. La temperatura del medio se registró cada segundo durante los primeros 5 min de extracción con una sonda (N2014, Cormark, Korea). El cálculo de la densidad acústica se realizó empleando la Ecuación 3, a partir de la curva generada de temperatura–tiempo.

$$\text{Densidad acústica} = \frac{dT}{dt} C_p m \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

- C_p = Capacidad calorífica en J/kg °C del solvente, en este caso del agua (4,16 J/kg °C)
- dT = Diferencial de temperatura (°C)
- dt = Diferencial de tiempo (s)
- m = Masa del solvente (kg)



Figura 4. Equipo de ultrasonidos

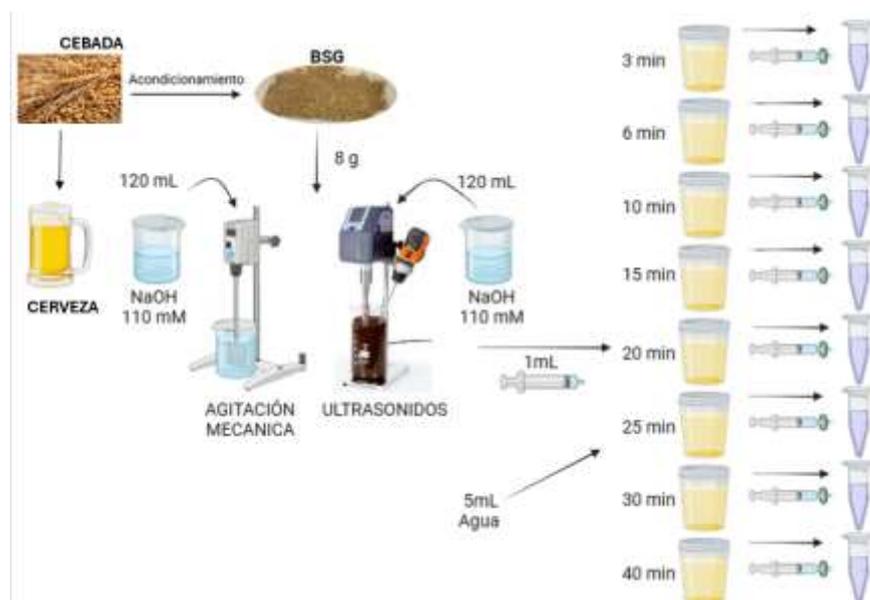


Figura 5. Esquema del proceso experimental de extracción de proteínas

4.5. Método Bradford para la determinación de proteínas

El primer paso para la determinación del contenido de proteínas de los extractos fue sacar a descongelar las muestras a temperatura ambiente. De esta forma, todas ellas se encontraron en estado líquido.

Para la aplicación del método Bradford, primero se realizó una recta patrón, en la que se pesó 10 mg de BSA (Bovine Serum Albumin, que se utiliza esta por su alta solubilidad en agua), se traspasó a un matraz aforado de 10 mL y se enrasó con agua destilada, creando así la disolución madre (DM) con una concentración de 1 mg/mL. De esta solución se cogieron los volúmenes indicados en la Tabla 3 para la realización de las disoluciones patrón.

Tabla 3. Cantidades de DM para patrones

Patrones	P0	P100	P300	P600	P800	P1000
Concentración (µg/mL)	0	100	300	600	800	1000
µL de DM	0	500	1500	3000	4000	1000

Una vez realizadas las disoluciones patrón y las muestras estaba descongeladas, se extrajo con pipeta 0,1 mL de cada una de ellas para introducirlo en vasos opacos. Allí, se mezclaron con 5 mL de disolución Bradford, previamente preparada y filtrada a través de papel de filtro (guardada en oscuridad). La disolución obtenida se agitó en vortex y se obtuvieron los 200 µL para la lectura en UV-Visible. Tanto el patrón como cada muestra se analizó por triplicado como se muestra en el esquema, obteniendo así 3 valores de absorbancia por cada tiempo de extracción.

La placa de lectura se llevó al equipo de espectrofotometría (biochom, *EZ Read 2000*, *Microplate reader*) cuya determinación se basa en la unión del colorante, Comassie Blue G-250 a las proteínas a una longitud de onda (λ) de 595 nm. Todo este proceso se puede observar en la figura 6.

Esquema de procedimiento del Método Bradford:

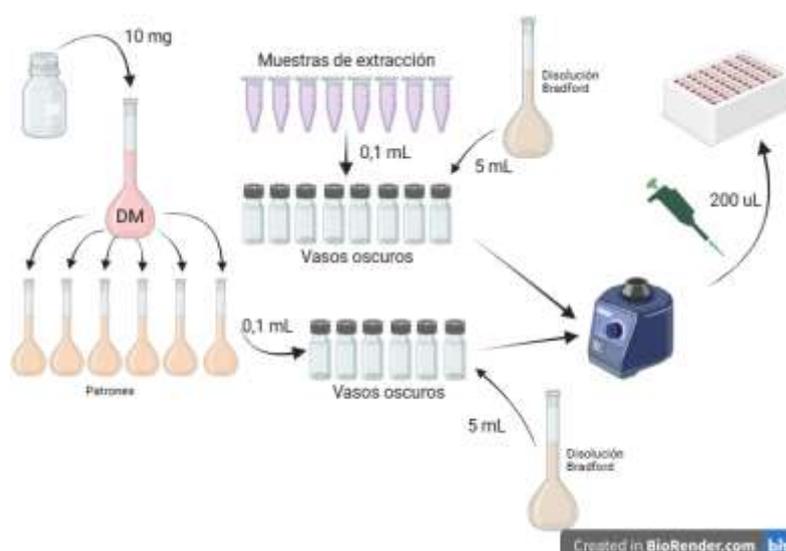


Figura 6. Esquema de aplicación del Método Bradford

El rendimiento de extracción se calculó dividiendo las proteínas extraídas según el método Bradford (g) por la proteína inicial (g) presente en la materia prima utilizada durante la extracción y el resultado se expresó en %.

4.6. Modelización

Con el objetivo de cuantificar la influencia de las variables consideradas en el rendimiento de extracción de proteína del BGS, se procedió a la modelización de las cinéticas de extracción. Para ello, se escogió el modelo de Weibull (Ecuación 1) (Objetivo 3). La identificación de los parámetros presentes en la ecuación se realizó mediante el uso de SOLVER, una herramienta de optimización incluida en la hoja de cálculo de Microsoft Excel 2020 (Umaña, 2015). Se estableció como función objetivo la minimización del error relativo medio (ERM) (Ecuación 4), obtenido

por la diferencia entre los valores experimentales (Y_{exp}) y los valores predichos por el modelo (Y_{cal}). Así, a cada una de las extracciones se identificaron los parámetros del modelo Y_{eq} , α y β . Considerando:

- Y = Rendimiento de la extracción
- Y_{eq} = Rendimiento en el equilibrio o rendimiento máximo
- Y_o = Rendimiento al inicio de la extracción.
-

$$ERM = \frac{\sum_{1-8} \left| \frac{Y_{exp} - Y_{cal}}{Y_{exp}} \right|}{n^{\circ} \text{ datos}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Se ajustaron los parámetros para cada réplica de las cinéticas obtenidas (mínimo 3) en todos los tratamientos estudiados, luego se hizo un promedio y desviación de los parámetros obtenidos. Esto permitió cumplir el objetivo de establecer un modelo matemático que se ajuste lo máximo posible a el proceso de extracción.

4.7. Análisis estadísticos

Los parámetros obtenidos en el modelo para cada tratamiento diferente se compararon a través de un test ANOVA utilizando el software “RStudio (Rstudio, 2022.)” para determinar la significación de diferencias ($p < 0,05$) obtenidas y se realizó un test Tukey para determinar que parámetros resultaron diferentes entre sí. Antes de aplicar los test ANOVA y Tukey, se verificó la normalidad de los datos con el test Shapiro, en caso de no seguirla, los datos se transformaron a logaritmos.

5. RESULTADOS

Con el objetivo de evaluar el efecto de la temperatura y la aplicación de ultrasonidos sobre las cinéticas de extracción de proteínas, se utilizó como materia prima el bagazo de cerveza (BSG). En este apartado se presentan los resultados obtenidos con respecto a las características de la materia prima y a la determinación de la potencia acústica de la sonda caracterizada. Seguidamente, se detallan y discuten los resultados obtenidos en los experimentos de extracción, evaluando el efecto de la temperatura de extracción y la potencia acústica aplicada. El análisis de los resultados obtenidos en los experimentos de extracción asistida con ultrasonidos se ha realizado usando como control experimentos realizados con agitación mecánica.

5.1. Caracterización del BSG

El contenido en humedad del BSG antes del proceso de secado fue de $76 \pm 0,36\%$ b.h. Durante el proceso de acondicionamiento de la muestra se eliminó prácticamente toda la humedad.

Para poder determinar el porcentaje de proteína extraída en la experimentación se debe conocer el contenido en proteína de la materia prima inicial (BSG). Este contenido fue de $15,81 \pm 1,23\%$, ligeramente inferior al mostrado en la bibliografía 19-30% (Lynch et al., 2016). Estas diferencias pueden estar relacionadas con la variedad del grano de malta o el tratamiento durante la elaboración de la cerveza.

5.2. Caracterización de la potencia acústica

La densidad de potencia acústica generada por la sonda de ultrasonidos se determinó mediante un estudio calorimétrico, obteniendo el siguiente resultado presentado en la tabla 4:

Tabla 4. Densidad acústica de las sondas estudiadas

Medida de la sonda (mm)	Densidad acústica (W/L)
22	500 ± 6

5.3. Cinéticas de extracción

En este apartado se presentan los resultados obtenidos por los distintos experimentos de extracción ultrasónica, comparados con una extracción de control con agitación mecánica, a dos temperaturas diferentes (25 y 50 °C). A continuación, se presenta la nomenclatura que va a ser utilizada en el resto del trabajo (Tabla 5).

Tabla 5. Nomenclatura de las extracciones

Temperatura	Tratamiento	Nomenclatura
25 °C	Ultrasonidos	US25
	Agitación Mecánica	AG25
50 °C	Ultrasonidos	US50
	Agitación Mecánica	AG50

En la tabla 6 y en las figuras 7 y 8 se presentan los resultados correspondientes al promedio del rendimiento proteico (Y) a cada tiempo de extracción tanto con Ultrasonidos (US) como con Agitación mecánica (AG). Los resultados se muestran en forma de promedio y desviación típica. El porcentaje equivale a cantidad (g) de proteína extraída frente a la proteína presente inicialmente en la muestra.

Tabla 6. Rendimientos proteicos de extracción (%)

Tiempo (min)	25 °C		50 °C	
	AG25	US25	AG50	US50
3	5,25 ± 0,03	13,93 ± 1,51	11,12 ± 0,66	14,29 ± 1,49
6	7,81 ± 0,45	19,13 ± 1,49	12,95 ± 2,20	22,83 ± 2,45
10	8,06 ± 0,00	23,36 ± 3,95	20,74 ± 1,83	23,84 ± 5,71
15	10,89 ± 1,30	26,71 ± 3,98	24,92 ± 2,17	26,67 ± 6,71
20	11,29 ± 0,12	31,51 ± 0,31	22,71 ± 1,78	34,02 ± 1,80
25	13,98 ± 2,01	34,28 ± 1,17	24,87 ± 1,32	27,65 ± 1,80
30	14,23 ± 0,71	36,67 ± 0,81	23,05 ± 2,18	28,92 ± 2,06
40	14,46 ± 1,80	38,34 ± 0,06	24,57 ± 2,85	37,66 ± 1,73

La temperatura afectó significativamente el proceso de extracción con agitación mecánica. Así, se puede observar que después de 40 min de extracción, el rendimiento a 50 °C (25%) casi duplicó al observado a 25 °C (14%). En cambio, cuando la extracción se realizó con aplicación de ultrasonidos no se observó una influencia clara de la temperatura. De hecho, después de 40 min de extracción, no hubo diferencias entre las distintas temperaturas ensayadas y en ambos se obtuvo un rendimiento final del 38%.

En cuanto a la aplicación de ultrasonidos, al comparar las cinéticas obtenidas por agitación y por ultrasonidos a 25 °C, se puede observar diferencias muy grandes. En estas condiciones, la aplicación de ultrasonidos prácticamente duplicó el rendimiento. Así, por ejemplo, en el punto final de la extracción (40 min), las muestras AG25 mostraron un rendimiento del 15% y las US25 del 38%. Este efecto, sin embargo, se observó en menor medida cuando la extracción se llevó a cabo a 50 °C.

El estudio realizado por Li et al. (2021) informó de tendencias similares a las obtenidas en este trabajo. Estos autores realizaron una extracción asistida por ultrasonidos del BSG, en el que, a 250 W, durante 20 min con un ciclo de trabajo de 60% alcanzaron un rendimiento proteico del 86,16%, mucho mayor que el obtenido con una extracción convencional, en la que alcanzaron un 47,71%. Otro estudio que también corrobora los resultados obtenidos fue el realizado por Dabbour et al., (2021) en el que, a partir de girasol, extrajeron proteína con acción ultrasónica a 30, 40 y 50 °C. La aplicación de ultrasonidos aumentó el rendimiento proteico de 23,46% a un 34,66% a 30 °C, y de un 25,90% a un 35,69% a 40 °C. Por otro lado, Stroescu Marta & Sturzoiu Aurelia (2011) observaron que el aumento de la temperatura no mejoró los efectos de la aplicación de ultrasonidos. De hecho, no observaron diferencias significativas entre la aplicación de ultrasonidos a 55 °C y a 25 °C.

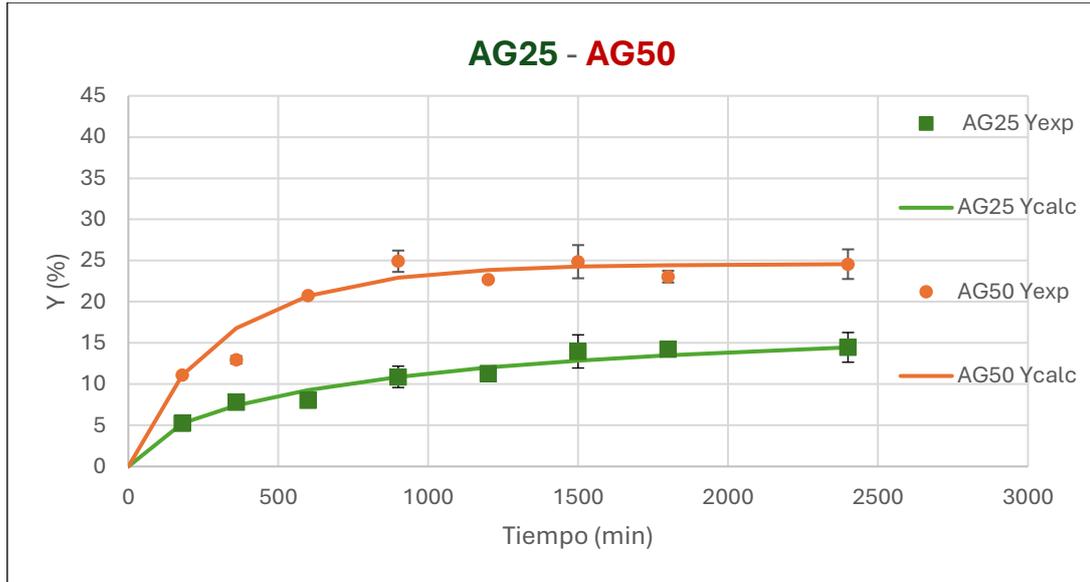


Figura 7. Cinética de extracción con agitación mecánica a 25 °C y 50 °C. Los valores experimentales se presentan como puntos y los calculados por el modelo como línea continua.

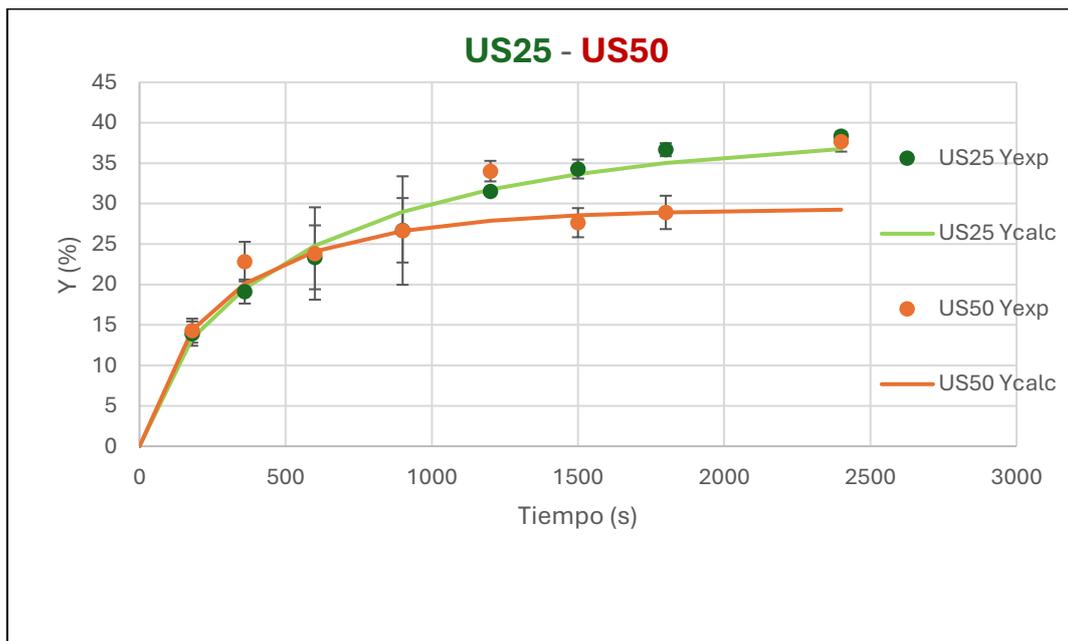


Figura 8. Cinética de extracción con ultrasonidos a 25°C y 50 °C. Los valores experimentales se presentan como puntos y los calculados por el modelo como línea continua.

5.4. Modelización de las cinéticas de extracción

Con el objetivo de describir matemáticamente la transferencia de materia durante la extracción, se utilizó el modelo de Weibull, descrito en la Ecuación 1. A partir de su ajuste a los datos experimentales, se determinaron los parámetros del modelo (Y_{eq} , α y β), considerando que el rendimiento proteico a tiempo inicial era 0. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Además, también se ha añadido a la tabla el error relativo medio (ERM) (Ecuación 4), parámetro que permite evaluar el ajuste del modelo.

Tabla 7. Parámetros del modelo de Weibull identificados para las cinéticas de extracción de proteínas de bagazo de cerveza, con agitación y con aplicación de ultrasonidos a diferentes temperaturas.

	T ^a	α (s)	β	Y _{eq} (%)	ERM (%)
Agitación	25	890 ± 19 ^a	0,618 ± 0,063 ^a	16,8 ± 1,6 ^c	5,59
	50	320 ± 14 ^c	0,842 ± 0,030 ^a	24,2 ± 1,5 ^b	6,70
Ultrasonidos	25	604 ± 107 ^b	0,747 ± 0,043 ^a	39,3 ± 0,5 ^a	3,50
	50	314 ± 54 ^c	0,637 ± 0,141 ^a	30,1 ± 1,5 ^b	8,52

*Diferentes letras en el mismo parámetro indican diferencias significativas (p<0,05)

El ERM (Error Relativo Medio) es un parámetro que permite conocer la precisión del ajuste del modelo de Weibull, y, por lo tanto, su capacidad para representar las extracciones experimentales y predecir las variaciones del sistema. Así, si los valores obtenidos son inferiores al 10%, significa que el modelo matemático permite una correcta simulación del proceso. En todas las cinéticas modelizadas se obtuvieron valores inferiores al 10 %, lo que indica que el ajuste fue adecuado. Esto también se puede observar en las figuras 7 y 8 donde se muestra que los datos experimentales y los calculados con el modelo siguieron la misma tendencia. En la figura 8 se observa cómo, para la cinética US50, hay dos puntos que difieren de la tendencia de los demás. Esto se explicaría como errores experimentales debido a que las condiciones de este experimento dificultaron el mantenimiento de la temperatura durante la aplicación de ultrasonidos. Además, la combinación de temperatura y aplicación de ultrasonidos podría haber provocado en algunos casos una degradación de las proteínas. Este desajuste explica que en estas condiciones es cuando se obtiene el ERM más alto (8,52%).

Se puede observar en la tabla 7, que el parámetro α varió en función de la temperatura y del método de extracción. Este parámetro tiene una relación inversa con la velocidad del proceso (k), por lo que cuanto más alto es su valor, más lenta es la cinética de extracción. En las cinéticas obtenidas por agitación mecánica a 25 °C, este parámetro fue significativamente superior (p<0,05) que el obtenido a 50 °C, lo que significa que la cinética fue más rápida a la temperatura más alta. Sucede algo similar al comparar este parámetro a 25 y 50 °C en las cinéticas obtenidas con ultrasonidos.

Si se comparan las experiencias realizadas a 25 °C, las extracciones asistidas acústicamente presentaron valores significativamente (p<0,05) más bajos que las realizadas con agitación. Sin embargo, a 50 °C, las diferencias en el parámetro α entre la agitación y la aplicación de ultrasonidos no fue significativa (p>0,05).

Respecto al parámetro β , según se ha mencionado con anterioridad, describe el comportamiento del proceso de extracción. Los valores pueden ser < 1, adquiriendo una forma de cinética convexa y que la velocidad de extracción disminuya de forma progresiva con el tiempo, pueden ser en torno a 1 siguiendo una cinética de extracción de primer orden, o pueden ser > 1 creando una curva de extracción cóncava y que la velocidad aumente con el tiempo. En este trabajo, los valores de este parámetro identificados fueron inferiores a 1 para todas las cinéticas estudiadas y no presentaron diferencias significativas (p>0,05) entre sí. En las figuras 7 y 8, se puede observar que en todas las cinéticas aparece una forma convexa notable, y en todas se produce un punto de inflexión de la extracción proteica, en el que se equilibra el rendimiento proteico. Umaña et al. (2020) estudió la extracción de ergosterol a partir de residuos de champiñón, también observó que su valor tanto, para una extracción asistida por ultrasonidos como para la extracción de control, fue menor a la unidad.

El rendimiento proteico en el equilibrio Y_{eq} sería una medida del porcentaje de proteína máximo que se puede extraer usando el método establecido. El efecto de la aplicación de

ultrasonidos sobre los rendimientos proteicos en equilibrio (Y_{eq}) fue notable y a 25 °C, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Así, el valor de Y_{eq} fue significativamente superior con la aplicación de ultrasonidos. En cambio, se observó un comportamiento distinto a 50 °C, en el que no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los métodos de extracción utilizados.

En las figuras 9, 10, 11 y 12 se presenta la relación entre los valores de rendimiento calculado (Y_{calc}) con el modelo frente al rendimiento determinado experimentalmente (Y_{exp}). Además, se incluye la ecuación del ajuste lineal y el R^2 asociado a la ecuación.

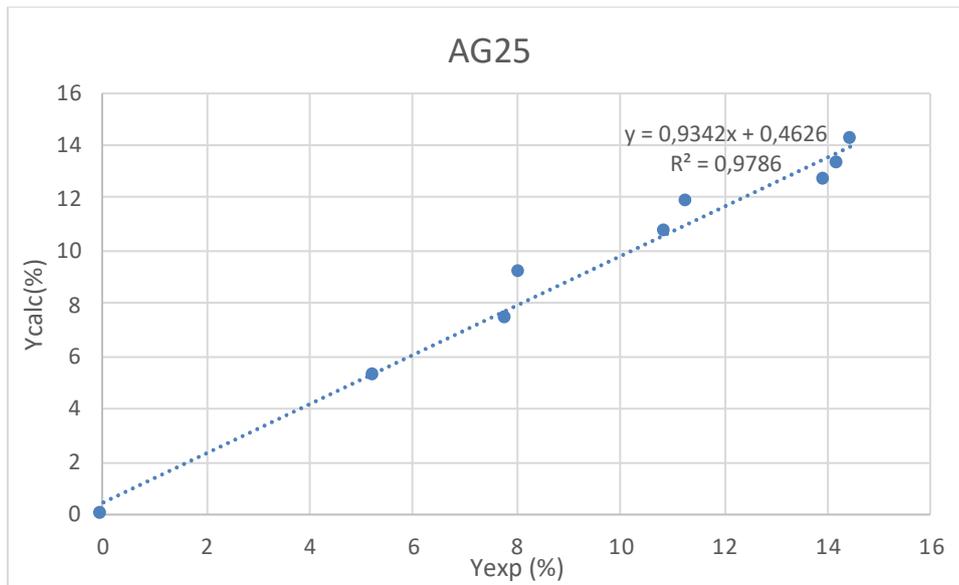


Figura 9. Rendimientos proteicos experimentales (Y_{exp}) vs calculados (Y_{calc}) obtenidos con agitación a 25 °C

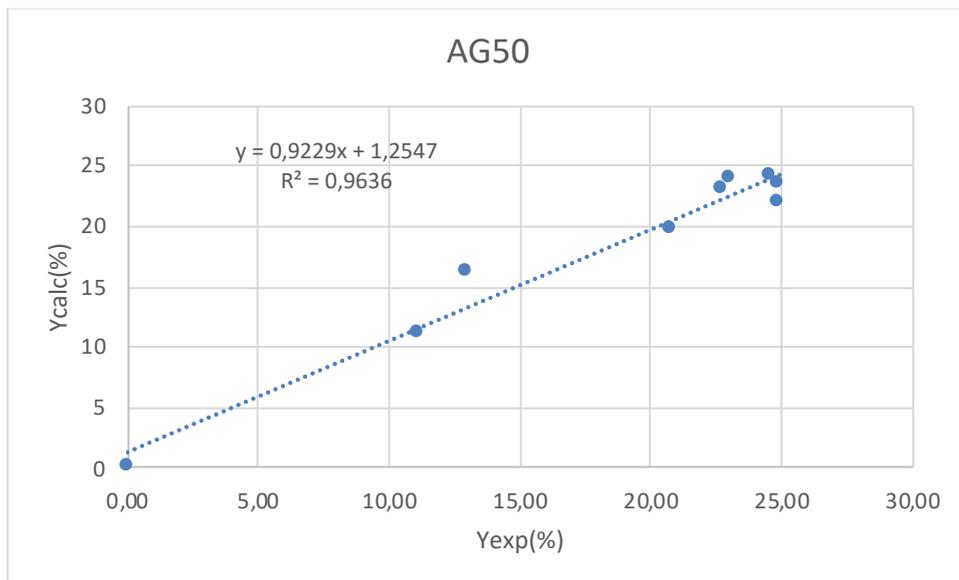


Figura 10. Rendimientos proteicos experimentales (Y_{exp}) vs calculados (Y_{calc}) obtenidos con agitación a 50 °C

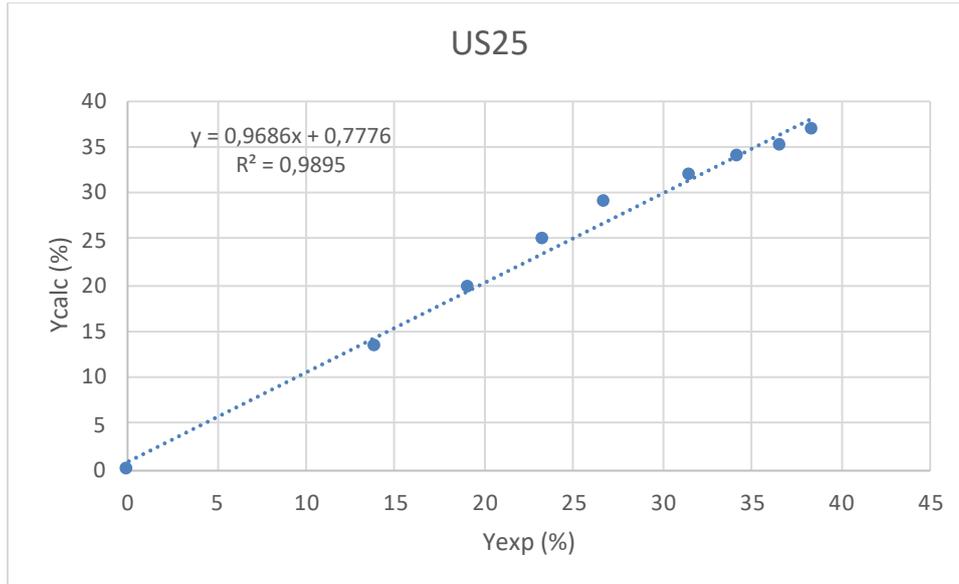


Figura 11. Rendimientos proteicos experimentales (Y_{exp}) vs calculados (Y_{calc}) obtenidos con la aplicación de ultrasonidos a 25 °C

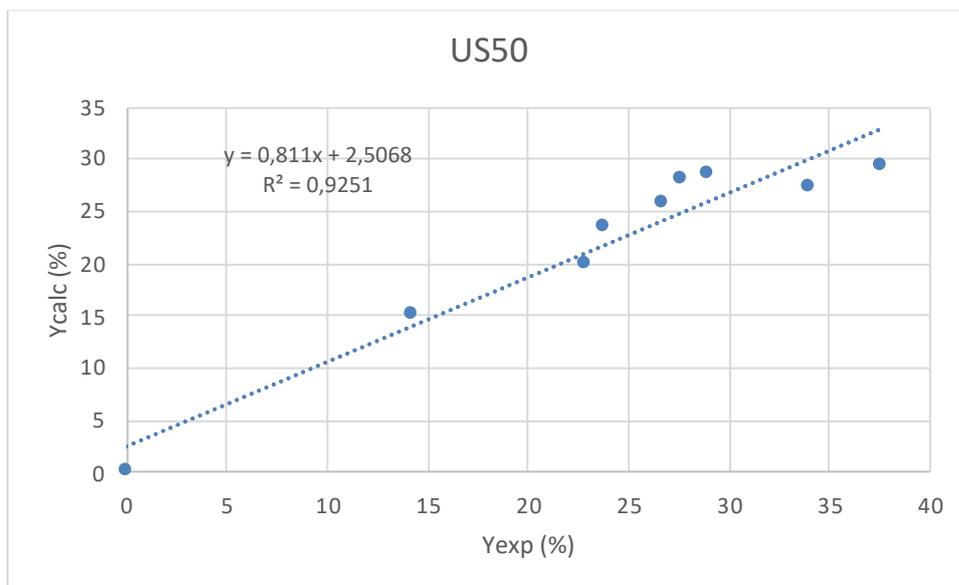


Figura 12. Rendimientos proteicos experimentales (Y_{exp}) vs calculados (Y_{calc}) obtenidos con la aplicación de ultrasonidos a 50 °C

El valor de R^2 representa el ajuste entre los datos experimentales y los calculados por el modelo establecido, de forma que cuanto más se acerque este valor a 1, mayor será la correlación entre los valores experimentales y los calculados. Las cinéticas que mayor correlación presentaron fueron las de 25 °C, con valores de R^2 de 0,98 y 0,99. En cambio las cinéticas a 50 °C, obtuvieron valores inferiores, de 0,96 en experiencias realizadas con agitación, y de 0,93 en experiencias realizadas con ultrasonidos. Esto puede deberse tanto a la heterogeneidad de materia prima como a las posibles alteraciones inducidas por la aplicación de ultrasonidos durante la extracción que dificultaron el control de la temperatura. Así, los valores de la ordenada en el origen de la ecuación del ajuste lineal fueron cercanos a 0 para todos los casos excepto para las experiencias US50, en las que este valor fue más alto. Además, los valores de la pendiente son en general cercanos a la unidad lo que indica un buen ajuste y la ausencia de errores sistemáticos.

6. CONCLUSIONES

La aplicación de ultrasonidos a la extracción de proteínas de bagazo de cerveza incrementó el rendimiento de extracción en comparación con las extracciones con agitación convencional. Este efecto fue mayor en las experiencias realizadas a 25 °C lo que indicaría que efecto de los ultrasonidos en la transferencia de materia fue más acentuado a temperaturas bajas.

El aumento de la temperatura incrementó el rendimiento de extracción proteica en las extracciones realizadas con agitación. En cambio, en las experiencias con ultrasonidos se llegó a observar una disminución del rendimiento lo que podría atribuirse a un que la combinación de ultrasonidos y altas temperaturas podría generar un efecto negativo.

El modelo empírico de Weibull simuló adecuadamente las cinéticas de extracción ya que el ERM de cada extracción fue inferior 10% y la misma tendencia de datos experimentales y calculados (elevados valores de R^2).

Los parámetros del modelo identificados indicaron que la extracción con aplicación de ultrasonidos resultó más rápida y alcanzó un mayor rendimiento de extracción en el equilibrio. Esto fue especialmente importante a la temperatura más baja ensayada, 25 °C. A 50 °C, un posible efecto negativo de la combinación de ultrasonidos y temperatura alta hizo que los valores de equilibrio resultaran ligeramente inferiores.

Como conclusión final del presente trabajo se podría destacar que se ha visto que la aplicación de ultrasonidos durante la extracción de proteína de bagazo puede contribuir a incrementar los rendimientos y la velocidad de extracción a temperaturas bajas, lo que podría implicar un menor consumo energético de la operación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AESAN. (2024). *Desperdicio alimentario*.
https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/desperdicios.htm
- AOAC. (2020). *Official Method 935.29. Moisture in Malt Gravimetric*.
- Bazsefidpar, N., Ghandehari Yazdi, A. P., Karimi, A., Yahyavi, M., Amini, M., Ahmadi Gavlighi, H., & Simal-Gandara, J. (2024). Brewers spent grain protein hydrolysate as a functional ingredient for muffins: Antioxidant, antidiabetic, and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 435.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137565>
- Blasco, M., García-Pérez, J. V., Bon, J., Carreres, J. E., & Mulet, A. (2006). Effect of blanching and air flow rate on turmeric drying. *Food Science and Technology International*, 12(4), 315–323.
<https://doi.org/10.1177/1082013206067352>
- Bonifácio-Lopes, T., Teixeira, J. A., & Pintado, M. (2020). Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain—A review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 60, Issue 16, pp. 2730–2741). Taylor and Francis Inc.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655632>
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(4), 359–377.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Cárcel, J. A., Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., & Mulet, A. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 3, Issue 2, pp. 108–120).
<https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>
- Cerisuelo, A., & Bacha, F. (2021). *MATERIAS PRIMAS Definición & clasificación*.
- Connolly, A., McCarthy, A. L., O'Callaghan, Y. C., Piggott, C. O., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2013). Brewers' spent grain; Bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: A review. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(1), 117–125. <https://doi.org/10.1017/S0029665112002820>
- Dabbour, M., Jiang, H., Mintah, B. K., Wahia, H., & He, R. (2021a). Ultrasonic-assisted protein extraction from sunflower meal: Kinetic modeling, functional, and structural traits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102824>
- Dabbour, M., Jiang, H., Mintah, B. K., Wahia, H., & He, R. (2021b). Ultrasonic-assisted protein extraction from sunflower meal: Kinetic modeling, functional, and structural traits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102824>
- Eze, O. F., Chatzifragkou, A., & Charalampopoulos, D. (2022). Properties of protein isolates extracted by ultrasonication from soybean residue (okara). *Food Chemistry*, 368.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130837>
- FAO. (2024). *Proteína*. 2024.
<https://www.fao.org/nutrition/requirements/proteinas/es/#:~:text=Prote%C3%ADnas%20%7C%20Nutrici%C3%B3n%20%7C%20Organizaci%C3%B3n%20de%20las%20Naciones,estructural%20de%20las%20c%C3%A9lulas%20y%20tejidos%20del%20cuerpo.>
- Filipigh, Á. A. (2019). *Estudio de la extracción de compuestos fenólicos mediante diferentes técnicas de extracción a partir del residuo generado en la obtención de agar-agar*.

- Gallo, M., Ferrara, L., & Naviglio, D. (2018). Application of ultrasound in food science and technology: A perspective. In *Foods* (Vol. 7, Issue 10). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods7100164>
- Görgüç, A., Bircan, C., & Yılmaz, F. M. (2019). Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 283, 637–645. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.077>
- Hadidi, M., Aghababaei, F., & McClements, D. J. (2023). Enhanced alkaline extraction techniques for isolating and modifying plant-based proteins. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 145). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109132>
- Hadidi, M., Ibarz, A., & Pouramin, S. (2021). Optimization of extraction and deamidation of edible protein from evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil processing by-products and its effect on structural and techno-functional properties. *Food Chemistry*, 334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127613>
- Lendinez, C. R. (2018). *EXTRACCIÓN ACÚSTICA DE BIOCAMPUESTOS DE SUBPRODUCTOS DE LA ALCACHOFA. EFECTO DE LA TEMPERATURA.*
- Li, W., Yang, H., Coldea, T. E., & Zhao, H. (2021). Modification of structural and functional characteristics of brewer's spent grain protein by ultrasound assisted extraction. *LWT*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110582>
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. In *Journal of the Institute of Brewing* (Vol. 122, Issue 4, pp. 553–568). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- Menor, L., Javier, J., Fort, B., & Pueyo, J. R. (2018). *UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL ALUMNA: Lucía Menor García.*
- Naik, M., Natarajan, V., Modupalli, N., Thangaraj, S., & Rawson, A. (2022). Pulsed ultrasound assisted extraction of protein from defatted Bitter melon seeds (*Momardica charantia* L.) meal: Kinetics and quality measurements. *LWT*, 155. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112997>
- Onwezen, M. C., Bouwman, E. P., Reinders, M. J., & Dagevos, H. (2021). A systematic review on consumer acceptance of alternative proteins: Pulses, algae, insects, plant-based meat alternatives, and cultured meat. In *Appetite* (Vol. 159). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.105058>
- Reglamento (UE) N° 68/2013. (2013). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX:32013R0068>
- Rodriguez, L. M., Camina, J. L., Borroni, V., & Pérez, E. E. (2023). Protein recovery from brewery solid wastes. In *Food Chemistry* (Vol. 407). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134810>
- RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R; RStudio: Boston, MA, USA, 2022.
- Stroescu M. (2011). *Empirical Models Applied for Kinetics Extraction of β β β β -carotene from *Rosa canina*.* <https://www.researchgate.net/publication/267844796>
- Suchintita Das, R., Tiwari, B. K., Chemat, F., & Garcia-Vaquero, M. (2022). Impact of ultrasound processing on alternative protein systems: Protein extraction, nutritional effects and associated

- challenges. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 91). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106234>
- Tang, D. S., Yin, G. M., He, Y. Z., Hu, S. Q., Li, B., Li, L., Liang, H. L., & Borthakur, D. (2009). Recovery of protein from brewer's spent grain by ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal*, 48(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.05.019>
- Thompson, M. (2008). *CHNS Elemental Analysers*. www.rsc.org/amc
- Umaña, M. (2015). *CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS DE LOS SUBPRODUCTOS DE NARANJA MEDIANTE ASISTENCIA ACÚSTICA*.
- Umaña, M., Eim, V., Garau, C., Rosselló, C., & Simal, S. (2020). Ultrasound-assisted extraction of ergosterol and antioxidant components from mushroom by-products and the attainment of a β -glucan rich residue. *Food Chemistry*, 332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127390>
- Zeko-Pivač, A., Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Kulisic, B., Sakellaris, G., Hao, J., & Planinić, M. (2022). The Potential of Brewer's Spent Grain in the Circular Bioeconomy: State of the Art and Future Perspectives. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.870744>