

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Hidrolizados de levadura mediante
tratamientos hidrotérmicos: caracterización
y separación de componentes”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

MARÍA ANDRADE GULÍAS

JULIO, 2019



Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento mi tutor, el Dr. Sergio Collado, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, guiarme, y ayudarme siempre que lo he necesitado. Ha sido un placer trabajar en tu equipo.

Reconocimiento particular a la colaboración de la cervecera asturiana *Caleya*, de Langreo, por su generosidad, proporcionando la levadura utilizada para el desarrollo de este proyecto.

Especiales agradecimientos a Manu García, por estar siempre disponible para ayudarme con cualquier duda, resolver cualquier problema, escuchar mis ideas y animarme los momentos en los que nos hemos encontrado con obstáculos. Gracias por tu paciencia y tus conocimientos.

Gracias también a los compañeros de laboratorio, por ayudarme y animarme en las situaciones menos fáciles. También agradecer a los compañeros de clase, que me han incentivado a seguir adelante día tras día.

Agradecer a mis excompañeros y amigos del Grado de Biología, a mis dos buenas amigas Sara y Cristina, a mis compañeras de piso y amigas Ana y Paula, y a todos mis amigos de Avilés, por el apoyo incondicional recibido.

También agradezco el apoyo de toda mi familia, especialmente el de mi abuela Oliva, fundamental para hacer esto posible. Gracias a mis padres, Rosi y Fran, por ser mis pilares. Finalmente, gracias a mi pareja Rodrigo y a mi hermana Lucía, por ser las dos personas que más creyeron siempre en mí.

Índice

Resumen	I
Abstract.....	II
Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
Abreviaturas.....	V
1 Introducción	1
2 Consideraciones teóricas y experimentales.....	5
2.1 Levadura de cerveza	5
2.2 Tratamientos hidrotermales	6
2.3 Métodos de separación.....	7
3 Materiales y métodos	11
3.1 Levadura	11
3.2 Tratamientos hidrotérmicos	12
3.3 Métodos analíticos	13
3.4 Métodos de separación de biomoléculas	16
3.4.1 Precipitación con pH y sulfato de amonio.....	17
3.4.2 Retención de proteínas con IMAC	18
4 Resultados y discusión	20
4.1 Caracterización de hidrolizados de levadura de cerveza	20
4.1.1 pH.....	20
4.1.2 Número de color	21
4.1.3 DQO	21
4.1.4 Concentración de sólidos e IVL	23
4.1.5 Carbono soluble.....	24
4.1.6 Concentración de proteínas y carbohidratos.....	25
4.1.7 Variación del SUVA.....	26

4.2	Métodos de separación de componentes.....	27
4.2.1	Precipitación de proteínas: pH y sulfato de amonio.....	27
4.2.2	Retención de proteínas con resina: IMAC.....	34
5	Conclusiones	38
6	Referencias	39

Resumen

En la actualidad, una de las industrias de bebidas más importantes es la industria de la cerveza. Para llevar a cabo la producción de la cerveza, se utiliza la levadura *Saccharomyces* spp. durante la fermentación, dando lugar a determinados compuestos que darán a la cerveza sus características organolépticas finales. Tras la fermentación, la levadura se elimina y habitualmente es empleada como pienso animal o como abono. Ambas aplicaciones generan productos con poco valor añadido, por lo que se están investigando nuevas vías para su aprovechamiento que mejoren la gestión de levadura. Dentro de las diversas posibilidades, la recuperación de los compuestos intracelulares, como las proteínas y carbohidratos, es una opción muy interesante. En este trabajo, la liberación de estos compuestos desde la célula al medio extracelular mediante el empleo de tratamientos hidrotermales es evaluada, así como diferentes métodos de separación y purificación para la recuperación del hidrolizado obtenido.

Dos tipos de tratamientos hidrotermales fueron estudiados: oxidación húmeda (OH) e hidrólisis térmica (HT). Ambos procesos consisten en hidrolizar la biomasa celular a grandes temperaturas y presiones en presencia de oxígeno (OH) y nitrógeno (HT). En este trabajo, se emplearon 160 °C y 40 bar en todos los casos. Los hidrolizados fueron caracterizados y comparados en diferentes tiempos en términos de pH, número de color (NC), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV), Demanda Química de Oxígeno (DQO), carbono orgánico soluble total, proteínas y carbohidratos solubles y SUVA. Se observó el tiempo óptimo de tratamiento hidrotermal para la máxima concentración de proteínas a los 80 minutos (320 mg proteína/g SSV en OH y 445 mg de proteína/g SSV en HT).

Tras la hidrolización de la levadura, se probaron tres formas de recuperación de proteínas: precipitación con pH (isoelectrica), precipitación con sulfato de amonio (*salting out*) y cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). El método de pH resultó ser muy selectivo, pero con una baja recuperación. Todo lo contrario para el *salting out*. Finalmente, la IMAC resultó ser el mejor de los tres métodos, muy selectivo para las proteínas de la OH, pero menos selectivo para HT.

Abstract

Currently, one of the most important beverage industries is the brewing one. To make beer, *Saccharomyces* ssp. is used as microorganism during the fermentation to produce certain compounds, which will give beer its final organoleptic characteristics. Once finished the fermentation, the yeast is removed and usually used as animal feed or fertilizer. Both applications generate products with little added value, so new ways are being investigated to improve the management of this yeast. Within the wide variety of possibilities, the recovery of intracellular compounds, such as proteins and carbohydrates is a very interesting option. In this work, the release of these compounds from the cell to the extracellular medium by means of hydrothermal treatments is assessed, as well as different separation and purification methods for their recovery from the hydrolysate obtained.

Two different types of hydrothermal treatments were studied: wet oxidation (WO) and thermic hydrolysis (TH). Both processes consist on hydrolysing the cellular biomass under high temperatures and pressure in presence of oxygen (WO) or nitrogen (TH). In this work, 160 °C and 40 bar were selected as operating conditions in all cases. Hydrolysates were characterized and compared at different times in terms of pH, colour number (CN), total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS), Chemical Organic Demand (COD), total soluble organic carbon, soluble proteins and carbohydrates and SUVA. It was observed an optimum time of hydrothermal treatment for maximizing the protein concentration of 80 minutes (320 mg protein/g VSS for WO and 445 mg protein/g VSS for HT).

After hydrolysing the sludge, three different separation methods were tested in order recovering proteins: pH precipitation (isoelectric precipitation), ammonium sulphate precipitation (salting out) and immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC). pH precipitation turned out to be a very selective method, but with a low recovery, whereas the opposite behaviour was reported for the ammonium sulphate precipitation. Finally, the IMAC method proved to be the best of the three methods tested, being very selective to the WO proteins but less selective to the TH ones.

Índice de figuras

Figura 1.a. Tanque cilíndrico de fermentación de cerveza de la empresa Caley y	
1.b. Tipos de fermentación de cerveza	5
Figura 2. Esquema simplificado de las transformaciones de la OH.....	6
Figura 3. Esquema simplificado de los métodos de separación de proteínas.....	7
Figura 4. Representación de la solubilidad de las proteínas frente a la variación de pH..	8
Figura 5. Variación de la solubilidad de las proteínas en función de la concentración de sal.....	9
Figura 6. Simulación del complejo resina-IDA-Cobre-Proteína.....	10
Figura 7. Esquema del pretratamiento de la levadura para la generación de hidrolizados.	11
Figura 8. Esquema del reactor.	12
Figura 9. Esquema del protocolo de precipitación de proteínas por variación de pH.	17
Figura 10. Esquema del protocolo de precipitación de proteínas por adición de concentraciones de sulfato de amonio.	18
Figura 11. Resina Lewatit TP-207. A la izquierda, sin cobre. A la derecha, con cobre.	18
Figura 12. Esquema del protocolo de retención de proteínas por IMAC con diferentes cantidades de resina.	19
Figura 13. Evolución del pH del hidrolizado total por OH y HT. En todos los casos 160°C, 60 bar.	20
Figura 14. Evolución del número de color del hidrolizado por por OH y HT. En todos los casos, 160°C, 60 bar.	21
Figura 15. Evolución de la DQO total de los hidrolizados y DQO soluble de los hidrolizados por OH y HT. En todos los casos 160 °C, 60 bar.....	22
Figura 16. Evolución de la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) por OH y HT. En todos los casos 160 °C, 60 bar.	23
Figura 17. Evolución del índice volumétrico (IVL) del hidrolizado soluble por OH y HT. En todos los casos 160 °C, 60 bar.....	24
Figura 18. Evolución de la concentración de carbono soluble por OH y HT. En todos los casos 160 °C, 60 bar.	25
Figura 19. Evolución de la concentración de proteínas y carbohidratos por OH y HT. En todos los casos 160 °C, 60 bar.	26
Figura 20. Evolución del SUVA por OH y HT. En todos los casos, 160 °C, 60 bar.....	26

Figura 21. Histograma comparativo de los diferentes pHs con desviación estándar por OH y HT. En todos los casos, 160 °C, 60 bar.	28
Figura 22. Histograma comparativo de las diferentes concentraciones de sulfato de amonio por OH y HT. En todos los casos 160 °C, 60 bar.	29
Figura 23. Histograma comparativo de la precipitación de proteínas y carbohidratos tras la precipitación con pH y sulfato de amonio. En las barras de error se representa la desviación estándar. En todos los casos, 160 °C, 60 bar.	30
Figura 24. Relación DQO/DQO inicial, siendo la DQO inicial el valor previo a la retención. En todos los casos 160 °C, 60 bar.	33
Figura 25. Representación de la relación Cf/Ci frente a gramos de resina por OH y HT. En todos los casos 160 °C, 60 bar.	34
Figura 26. Representación de las curvas de adsorción de las proteínas a la resina en OH y HT.	37

Índice de tablas

Tabla 1. Características de la levadura recién llegada de la industria.	11
Tabla 2. Cuadro resumen de recuperación y selectividad de proteínas de método de precipitación para cada tipo de hidrolizado.	31
Tabla 3. Cuadro resumen de recuperación y selectividad de proteínas de cada cantidad de resina utilizada para 10 mL de hidrolizado soluble en IMAC.	35

Abreviaturas

AGCL	Ácidos Grasos de Cadena Larga
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
α	Selectividad
CAE	Coefficiente de Absorción Espectral
COT	Carbono Orgánico Total
DQO	Demanda Química de Oxígeno
HT	Hidrólisis Térmica
IDA	Ácido Iminodiacético
IMAC	Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados
IVL	Índice Volumétrico de Lodo
NC	Número de Color
NTA	Ácido nitrilotriacético
OH	Oxidación Húmeda
pHA	Polihidroxialcanoato
pHB	Poli-3-dihidroxi-butirato
q	Capacidad de adsorción
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
SUVA	Absorbancia Específica Ultravioleta
TED	Tris(carboximetil)etilendiamina

1 Introducción

Los alimentos o bebidas fermentadas se definen como productos comestibles elaborados a partir de la acción de microorganismos autóctonos o añadidos de un material crudo o cocinado de origen animal o vegetal. Las levaduras son los organismos tradicionalmente más utilizados para la elaboración de bebidas y alimentos fermentados. Una de las especies más utilizadas a lo largo de la historia de la humanidad es *Saccharomyces cerevisiae* para la elaboración de cerveza (Türker, 2014). De hecho, la industria de la cerveza es probablemente la biotecnología más antigua conocida, que emplea recursos vegetales (cebada y lúpulo) para generar una materia prima (mosto), que es fermentada por levaduras (principalmente especies del género *Saccharomyces*) (Bamforth, 2000). La fermentación da lugar no solo a alcohol y dióxido de carbono (CO₂), sino también a ciertos componentes que aportarán determinadas características organolépticas de la cerveza, tales como ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos, etc. (Ferreira *et al.*, 2010).

Inevitablemente y como cualquier otra industria, la industria cervecera genera residuos. A pesar de que la levadura se reutiliza varias veces para la fermentación, finalmente es un subproducto de poco valor añadido y muy mayoritario en la fabricación de cerveza. Es tanto por motivos económicos como medioambientales por los que se están realizando cada vez más esfuerzos en su reaprovechamiento. En la actualidad, su uso está muy limitado a la alimentación animal, aunque recientemente se están investigando otras alternativas como fuente de nutrientes para la nutrición humana, crecimiento microbiano o agentes de desintoxicación de efluentes. Una de estas posibles alternativas incluye la recuperación de las proteínas intracelulares para diversos usos industriales, tales como piensos animales, emulsificantes, generación de bioplásticos, etc. (Lamoolphak *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010; Suarez-Iglesias *et al.*, 2017).

Aplicación de tratamientos hidrotermales

Obviamente, antes de la recuperación de las proteínas, es imprescindible lisar la levadura. Se han utilizado varios procesos de lisis celular como autólisis, plasmólisis, empleo de soluciones salinas orgánicas o disolventes orgánicos no polares, hidrólisis con ácidos o bases o hidrólisis enzimáticas. Sin embargo, estos métodos pueden llegar a ser muy contaminantes, caros o lentos (Lamoolphak *et al.*, 2006). Recientemente, se ha optado por los tratamientos hidrotermales para la conversión de distintas biomásas en sustancias más valiosas, así como para el pretratamiento de aguas residuales y lodos como forma de

potenciar la producción de biogás por digestión anaerobia (Lamoolphak *et al.*, 2006; García *et al.*, 2017).

Los tratamientos hidrotermales consisten en tratamientos que someten a la materia en fase líquida a altas temperaturas y presiones, lo que provoca la ruptura de las paredes celulares en microorganismos. Se distinguen dos tipos de tratamientos: hidrólisis térmica (HT) y oxidación húmeda (OH). Estos tratamientos permiten la liberación de productos intracelulares tales como proteínas y carbohidratos en periodos de tiempo relativamente cortos. Estas sustancias pueden ser así posteriormente recuperadas y aprovechadas para otras aplicaciones.

La diferencia entre la OH y la HT radica en que la OH utiliza un agente oxidante, como puede ser el oxígeno (O₂). En la HT se utiliza un gas inerte, como el Nitrógeno (N₂), que desplaza el O₂ y evita las oxidaciones. Esto hará que los productos finales liberados presenten características diferentes, ya que la OH oxidará no solo a las células, sino también a los componentes liberados, lo que no ocurrirá en la HT. Es por ello que es importante determinar el tiempo óptimo de tratamiento para conseguir una buena solubilización de los componentes de la levadura, pero una baja degradación de ellos una vez disueltos. La caracterización posterior de los productos intracelulares liberados es fundamental para determinar qué tipo de tratamiento puede ser más adecuado, dependiendo de la aplicación que se quiera dar al producto de interés.

Como ya se ha mencionado, uno de los grupos de biomoléculas más relevantes son las proteínas. Una vez lisada la levadura, hay multitud de técnicas para separar las proteínas del resto de componentes de la muestra. Por un lado, existe la precipitación de proteínas. Uno de los métodos dentro de este grupo más utilizados por su simpleza y bajo coste es por ajuste de pH. Este método se basa en la insolubilización de las proteínas por debajo de su punto isoelectrico (Ersson *et al.*, 2011).

Otro método muy conocido y utilizado de precipitación de proteínas es por adición de sales, como puede ser el sulfato de amonio. Este fenómeno es conocido como *salting out* (Ersson *et al.*, 2011). El sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) presenta una alta solubilidad y fuerza iónica y es barato, lo que le hace un método muy interesante (Duong-Ly y Gabelli, 2014).

Finalmente, otra forma de retener las proteínas de la muestra mucho más específica pero quizás menos convencional es la Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados

(*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC). Esta técnica consiste en la utilización de una resina saturada de iones metálicos que interaccionarán con las proteínas de la muestra, reteniéndolas (Arévalo *et al.*, 2000).

Aplicaciones de los componentes intracelulares

Una de las más interesantes aplicaciones en los tiempos que corren es la producción de bioplásticos como una alternativa ecológica y renovable a la producción de plásticos derivados de petróleo, en la que se ha estado investigando estos últimos años (Rasheed, 2011; Muñoz de las Heras, 2017). Los bioplásticos, también conocidos como biopolímeros, se han estado intentando desarrollar a partir de proteínas o polisacáridos recuperados de distintos orígenes, vegetales y microbianos, como por ejemplo la proteína de gluten del trigo (Rasheed, 2011). Uno de los biopolímeros a los que se ha estado prestando mucha atención en los últimos años como fuente de energía renovable, biodegradable y biocompatible, es el polihidroxialcanoato (PHA), que puede ser recuperado del citosol de *S. cerevisiae* (Zhang *et al.*, 2006). Otro compuesto observado presente en el interior celular de *S. cerevisiae* utilizado como bioplástico también es el poli-3-dihidroxi-butirato (PHB), que es utilizado por la levadura en condiciones ambientales estresantes como fuente de energía y carbono (Muñoz de las Heras, 2017). También se ha estado estudiando la aplicación de quitina y de β -glucano para la biosorción de metales pesados del drenaje ácido de las minas (Ramírez-Paredes *et al.*, 2011).

Las proteínas recuperadas pueden tener otras aplicaciones. En el caso de enzimas, muchas de ellas pueden ser empleadas para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Taylor y Richardson, 1979). Algunos ejemplos son el empleo de pectinasas para la extracción de jugo de frutas (Ferreira *et al.*, 2010), el empleo de invertasas para la fabricación de sirope de miel artificial, como fármaco antimicrobiano (Kulshrestha *et al.*, 2013) o en el proceso de producción de caramelos (Lees, 2012) o la α -galactosidasa en piensos (Türker, 2014).

Otra proteína interesante que forma parte de la pared celular de las levaduras como *S. cerevisiae*, es la manoproteína. La manoproteína, puede ser utilizada como biosurfactante; esto es, un compuesto tensioactivo proveniente de una fuente biológica, de alta biodegradabilidad y baja toxicidad. Los biosurfactantes tienen aplicación en biorremediación de aguas y suelos, en limpieza de aceite en tuberías o en la formulación

de emulsiones de aceite en agua en industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, entre otras (Amaral *et al.*, 2010).

Dentro de los carbohidratos de extracto de levadura, los más destacables son los β -glucanos, presentes en la pared celular de *Saccharomyces*. Desde hace tiempo se han relacionado con la estimulación del sistema inmune como *modificadores de respuesta biológica*, un tipo de medicamento que promueve la acción de los mecanismos de defensa de un huésped infectado (Moran, 2004). Por tanto, la recuperación de estas moléculas podría aplicarse también a la industria farmacéutica.

Objetivos del trabajo

Los objetivos de este trabajo son:

- Evaluar la OH y la HT como técnicas de ruptura de la pared celular y liberación de componentes solubles a partir de levaduras.
- Caracterizar los hidrolizados obtenidos en términos de pH, color, sólidos e Índice Volumétrico de Lodos (IVL), carbohidratos y proteínas liberadas, materia orgánica, carbono orgánico soluble y Absorbancia Específica Ultravioleta (SUVA).
- Evaluar diferentes técnicas de separación de proteínas a partir de los hidrolizados obtenidos: precipitación con pH, precipitación con sulfato de amonio y adsorción por IMAC.

2 Consideraciones teóricas y experimentales

2.1 Levadura de cerveza

La cerveza se fabrica en tanques cilíndricos, como el de la Figura 1.a. Existen dos tipos principales de cervezas: las cervezas *lager* y las cervezas *ale*. Estas se diferencian en el proceso de fermentación. Una de las diferencias es la especie que utilizan para la fermentación: las cervezas *lager* utilizan *Saccharomyces pastorianus*, mientras que las cervezas *ale* utilizan *Saccharomyces cerevisiae* (Stewart, 2016). *S. pastorianus* durante la fermentación es capaz de utilizar la melibiosa (disacárido glucosa-galactosa) para crecer, lo que dará lugar a cervezas distintas. Otra diferencia principal es la temperatura de fermentación, la cual es mayor en las cervezas *ale* (18-25 °C) que en las cervezas *lager* (8-15 °C) y también la posición de las levaduras en el fermentador. Esto último se conoce como ‘fermentación alta’ para el caso de las *ales* y ‘fermentación baja’ para el caso de las *lagers* (Figura 1.b) (Ferreira et al, 2010; Stewart, 2016). Para este trabajo se empleó *S. pastorianus*. Esta levadura fue extraída directamente del tanque cervecero a través de un grifo situado en la parte inferior del fermentador.



Figura 1.a. Tanque cilíndrico de fermentación de cerveza de la empresa Caleyá.

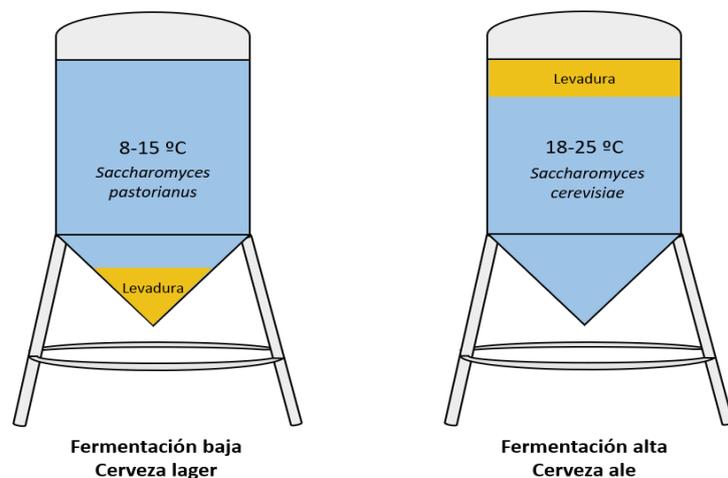


Figura 1.b. Representación de las principales diferencias entre cerveza *lager* y cerveza *ale* en los tanques cilíndricos donde tiene lugar la fermentación. A la izquierda, cerveza *lager*. A la derecha, cerveza *ale*.

Saccharomyces pastorianus es una especie perteneciente al orden Saccharomycetales. Se trata de una especie anaerobia facultativa capaz de crecer en un amplio espectro de azúcares, tales como glucosa, fructosa, manosa, galactosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa, rafinosa y melibiosa (Stewart, 2016). De forma más concreta, se dan azúcares que son introducidos al interior celular, como la maltosa y la maltotriosa, mientras que otros son

degradados por enzimas extracelulares, como la sacarosa (Ferreira, 2010). De esta forma, es capaz de fermentar los azúcares presentes en el mosto de cerveza. Por tanto, en el interior celular podremos encontrar tanto diferentes azúcares como enzimas degradativos de estos, entre otros muchos componentes.

2.2 Tratamientos hidrotermales

Las *reacciones hidrotérmicas* se definen como ‘cualquier reacción química heterogénea que ocurre en presencia de un disolvente (acuoso o no acuoso) por encima de la temperatura ambiente y a presiones superiores a 1 atm en un sistema cerrado’ (Hill *et al.*, 2014). Estas reacciones se llevan a cabo en los denominados *tratamientos hidrotérmicos o hidrotermales*. Estos tratamientos permiten, en combinación de elevadas temperaturas y presiones, la degradación de la materia orgánica compleja en materia orgánica más simple y biodegradable. Los tratamientos hidrotermales se dividen principalmente en hidrólisis térmica (HT) y oxidación húmeda (OH) en función de si se emplea una atmósfera inerte u oxidante, respectivamente.

La OH comenzó a comercializarse para la producción de saborizante artificial de vainilla (Hii *et al.*, 2014). En los últimos años, la OH ha sido muy utilizada para la conversión de compuestos orgánicos, presentes en aguas residuales industriales y lodos, a CO₂ y agua, utilizando temperaturas de entre 180 y 315 °C y presiones de entre 20 y 150 bar (Luck, 1999; Bhargava *et al.*, 2006). Otros productos formados son ácidos carboxílicos, acetaldehídos y alcoholes (Kolaczowski *et al.*, 1999), compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Este método fue patentado hace alrededor de 70 años por Zimmerman, y supone una forma de generar moléculas más simples y biodegradables sin falta de utilizar productos químicos (Bhargava *et al.*, 2006). Las reacciones que pueden ocurrir durante la OH, se muestran en la Figura 2.

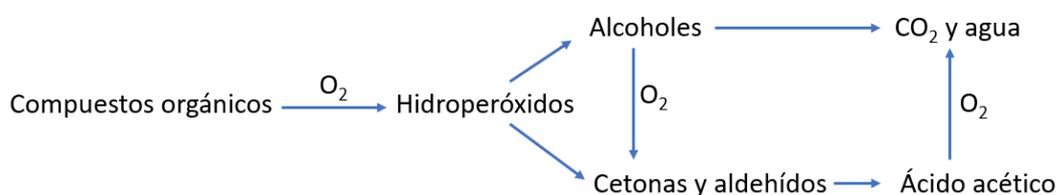


Figura 2. Esquema simplificado de las transformaciones de la OH (Debellefontaine y Foussard, 2000).

Además, los compuestos con contenido en nitrógeno (como, por ejemplo, los aminoácidos de las proteínas), podrían también transformarse fácilmente en amoníaco (Luck, 1999).

Por otra parte, la HT es un proceso degradativo en el que los compuestos presentes en una muestra compleja se degradan hasta compuestos más simples. Da lugar a la formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Este tratamiento hidrotérmico tiene su mayor nicho de aplicación como tratamiento previo a la digestión anaerobia de lodos, ya que mejora su digestibilidad (Hii *et al.*, 2014; García *et al.*, 2017). El tratamiento de hidrólisis también se puede usar, al igual que la OH, como forma de recuperar biomoléculas, no solo para la digestión anaerobia. A diferencia de la OH, las biomoléculas generadas con este proceso estarán menos degradadas, ya que se hidrolizarán, pero no se oxidarán.

2.3 Métodos de separación

Los métodos de separación de biomoléculas en este trabajo se focalizaron en la separación de proteínas del resto de compuestos. Se utilizaron tres métodos de separación de biomoléculas: precipitación de proteínas por variación de pH, precipitación de proteínas por *salting out* y retención de proteínas por IMAC. En la Figura 3 se muestra un esquema resumen del procedimiento de los métodos empleados. El procedimiento detallado se explicará en Materiales y métodos.

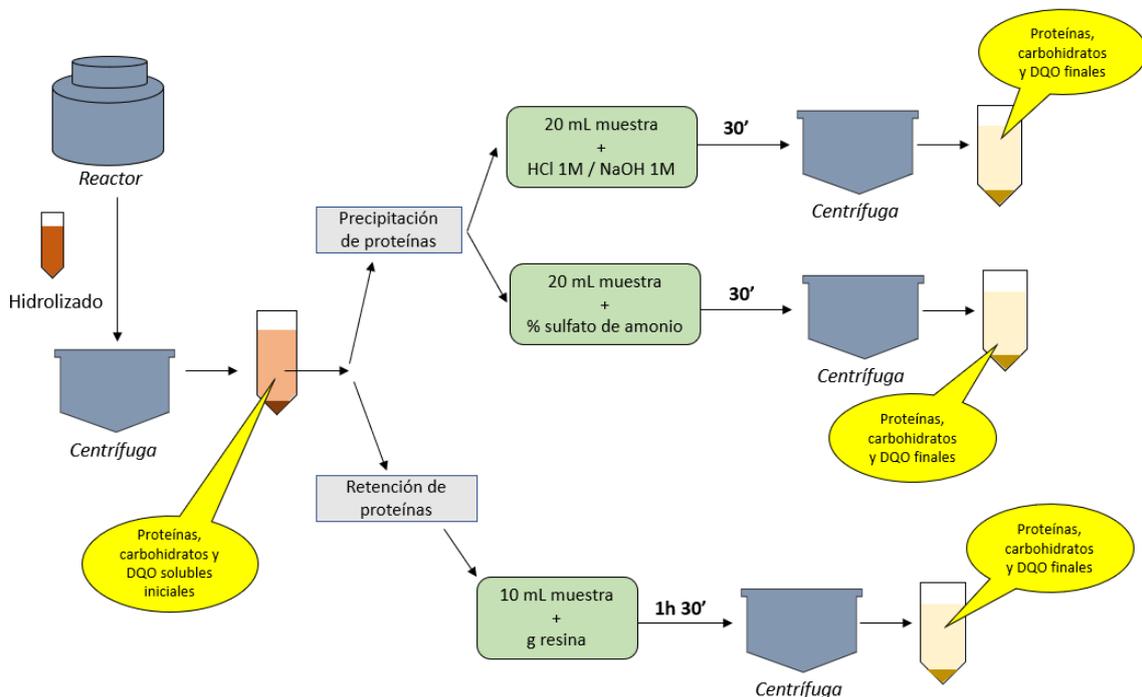


Figura 3. Esquema simplificado de los métodos de separación de proteínas.

La precipitación por variación de pH, también denominada precipitación isoelectrica, se basa en la insolubilidad de las proteínas cuando el pH se ajusta al punto isoelectrico (Scopes, 2013). El punto isoelectrico es aquel pH para el cual la carga neta de una proteína es cero. Las proteínas con carga neta cero presentan zonas cargadas positiva y negativamente, que interactúan con las zonas de carga opuesta de otras proteínas, haciendo que se formen redes de proteínas (Figura 4). Así pues, un pH igual a su punto isoelectrico conseguirá un alto grado de insolubilización de la proteína, haciendo que precipite cuando es centrifugada y separada así del resto de los componentes de la muestra.

Esta sencilla técnica, que tan solo requiere un ácido y una base para ajustar el pH, se ve influenciada por las propiedades fisicoquímicas específicas de cada proteína (Muroi *et al.*, 1973). Esto perjudica la separación en muestras de composición compleja. La precipitación con pH se considera un método bueno para la preparación de extractos con alta pureza de proteínas (Boye *et al.*, 2010), por lo que quizás sería un método más adecuado a posteriori, optimizando así la extracción de proteínas.

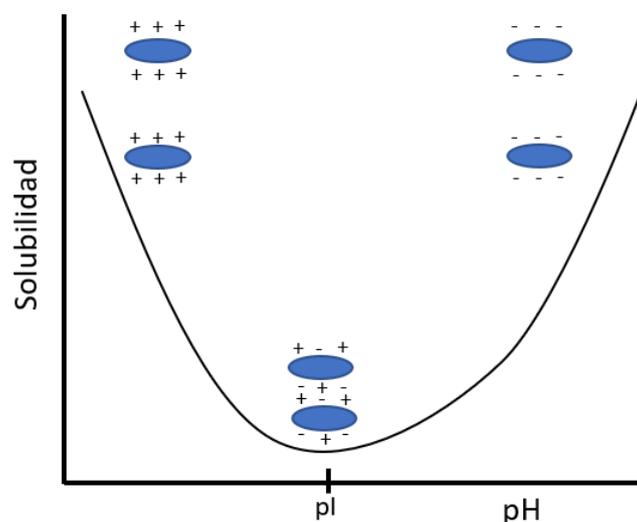


Figura 4. Representación de la solubilidad de las proteínas frente a la variación de pH.

Otra de las formas de precipitación es la precipitación con sales o *salting out*. Este fenómeno se da gracias a la capacidad de algunas sales y otros compuestos como ciertos solventes o polímeros orgánicos, denominados agentes cosmotrópicos o anticatrotropicos. Estos agentes tienen la capacidad de incrementar las interacciones hidrofóbicas de

determinadas moléculas, como pueden ser las proteínas, haciendo que precipiten en el medio (Scopes, 2013). La distribución de las cargas y la presencia de grupos hidrofóbicos de la superficie de las proteínas va a determinar la cantidad de sal necesaria para que se produzca la precipitación (Englard y Seifter, 1990). En concentraciones bajas de sal, podría darse el efecto contrario, el de solubilización de las proteínas, efecto denominado *salting in* (Burguess, 2009) (Figura 5).

La capacidad cosmotrópica dependerá también de otros factores, como la temperatura o del tipo de soluto (Scopes, 2013), así como su tamaño y forma (Englard y Seifter, 1990). Según las series de Hofmeister, donde se define una clasificación de iones en base a su capacidad de precipitar o solubilizar las proteínas, el anión sulfato es uno de los aniones más con mayor efecto cosmotrópico o, lo que es lo mismo, mayor capacidad de inducir la precipitación (Scopes, 2013).

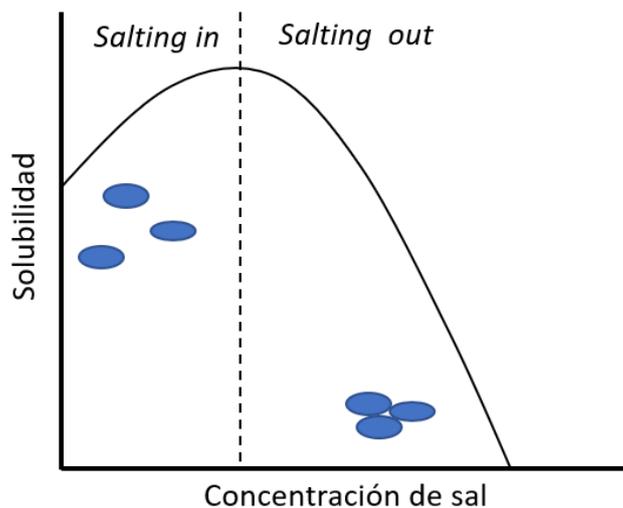


Figura 5. Variación de la solubilidad de las proteínas en función de la concentración de sal.

Las proteínas también se pueden separar selectivamente reteniéndolas. La Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC) es una de las técnicas más efectivas de cromatografía para la retención de proteínas. El fundamento de esta técnica consiste en el establecimiento de una fuerte interacción entre un metal, como pueden ser, Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} o Co^{2+} , con determinados aminoácidos presentes en las proteínas, como histidina, triptófano o cisteína, principalmente. Estos metales se encuentran unidos a un quelante, como el ácido iminodiacético (IDA), el cual se encuentra en una matriz o resina. Otros posibles quelantes a veces utilizados también son el tris(carboximetil)etilendiamina

(TED) o el ácido nitrilotriacético (NTA) (Le Dévédec *et al.*, 2008). El Cu^{2+} es el metal que presenta una mayor afinidad cuando se trata del IDA (Block *et al.*, 2009). Una de las mayores ventajas de la técnica IMAC, es su capacidad de separación de proteínas desnaturalizadas (Gaberc-Porekar y Menart, 2001), lo que puede ser muy útil tras la aplicación de un tratamiento hidrotermal. Además, la IMAC es capaz de retener un amplio rango de proteínas, desde metaloproteínas hasta anticuerpos, proteínas fosforiladas, etc. (Block *et al.*, 2009). Se muestra un esquema del complejo resina-IDA-cobre en la Figura 6.

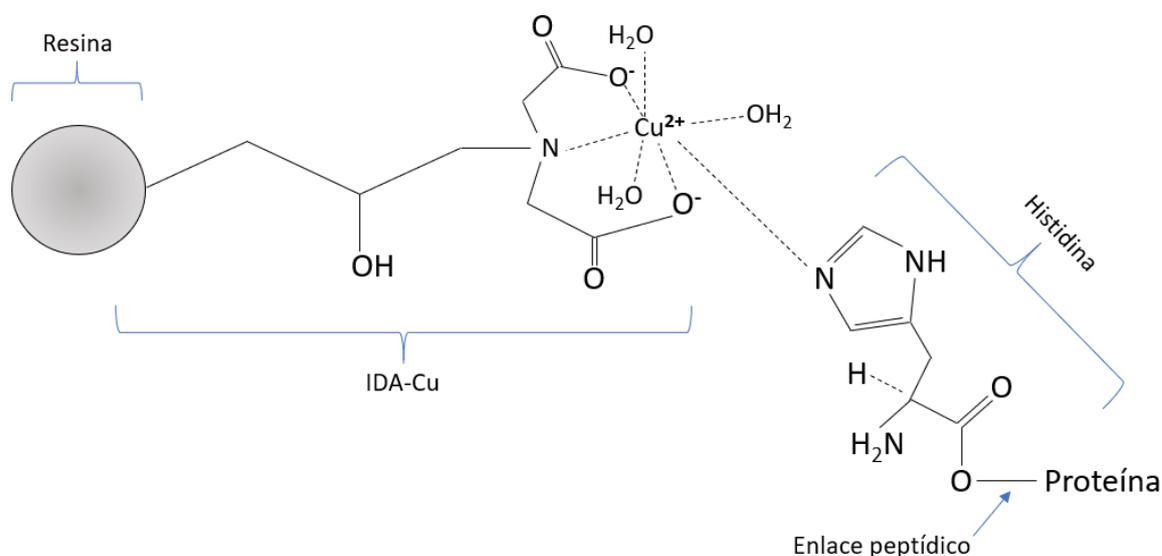


Figura 6. Simulación del complejo resina-IDA-Cobre-Proteína (modificada de: Le Dévédec *et al.*, 2008).

Un parámetro que determinar en esta técnica muy importante es la curva de progreso (*breakthrough curve*) de la capacidad de adsorción, que define la capacidad máxima de la resina. Se ha observado que la capacidad de adsorción en una IMAC varía dependiendo del tipo de proteína que se trate (Jain *et al.*, 2007). Por tanto, en una mezcla de proteínas diferentes, esto habrá que tenerlo en cuenta.

3 Materiales y métodos

3.1 Levadura

La levadura utilizada fue proporcionada por la empresa cervecera *Caleya* (La Felguera, Asturias), tratándose de la especie *Saccharomyces pastorianus*. Las levaduras, tipo *lager*, fueron recogidas directamente del fermentador de la empresa y conservadas a 4°C hasta el momento de su uso. En primer lugar, se realizó un breve análisis de las características iniciales de la levadura recién llegada de la industria, para determinar la dilución necesaria para introducir en el reactor. Se midió el pH, los sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV) y la Demanda Química de Oxígeno (DQO) total. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Debido a la elevada concentración inicial de sólidos y de DQO, se realizó una dilución 1:3 de la levadura con agua destilada. Los resultados consiguientes se mostrarán en relación a la levadura diluida.

Tabla 1. Características de la levadura recién llegada de la industria.

Características de la levadura inicial			
pH	SST (g/L)	SSV (g/L)	DQO total (mg O ₂ /L)
5.3	146	124	177500

Con el fin de eliminar los restos de cerveza, la levadura se lavó con agua tres veces (hasta que el sobrenadante se observó limpio) y se ajustó su concentración de sólidos suspendidos totales a 50 g/L. El lavado de la levadura también sirvió para disminuir la multiplicación celular en el tiempo y evitar reacciones de Maillard. Todo este proceso de lavado se representa esquemáticamente en la Figura 7.

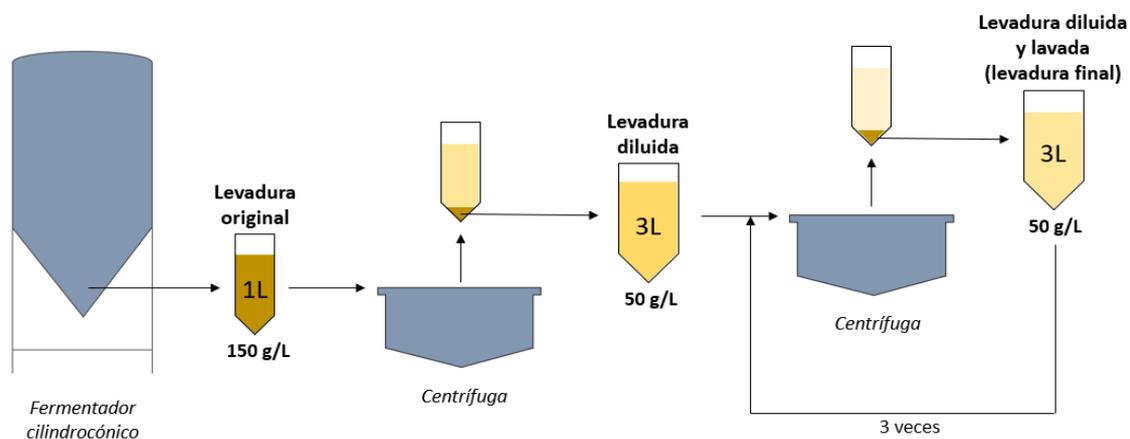


Figura 7. Esquema del pretratamiento de la levadura para la generación de hidrolizados.

3.2 Tratamientos hidrotérmicos

Una vez lavada la levadura y ajustada su concentración de SSV, se introdujo en un reactor modelo PARR 4520, de acero, de 1000 mL de capacidad máxima. Se trabajó al 70 % de su capacidad máxima (700 mL de levadura pretratada) por razones de seguridad. El reactor constó de un agitador de turbina de seis palas, refrigerado con agua proveniente de la red pública de abastecimiento de agua, para establecer condiciones de mezcla perfecta en su interior.

Una vez cerrado el reactor, se procedió a su calentamiento y presurización hasta las condiciones de trabajo. Se utilizó un controlador PID para mantener una temperatura constante de 160 °C y un flujo de gas constante de 1200 mL/min, mientras que la presión del gas se mantuvo a 40 bares. Según el gas empleado, la ruptura de la levadura se debe a mecanismos de HT (N_2) o de oxidación húmeda (O_2). En ambos casos, el gas pasa previamente por un humidificador para precalentarse y saturarse en humedad. En la Figura 8 se muestra un esquema del equipo.

La toma de muestras se realizó cada 20 minutos durante 180 minutos, lo que supone un total de 10 muestras para cada tipo de hidrolizado, y se caracterizaron. Finalmente, se escogió el tiempo óptimo en base a la concentración más alta de proteínas para ensayar los métodos para la separación de biomoléculas.

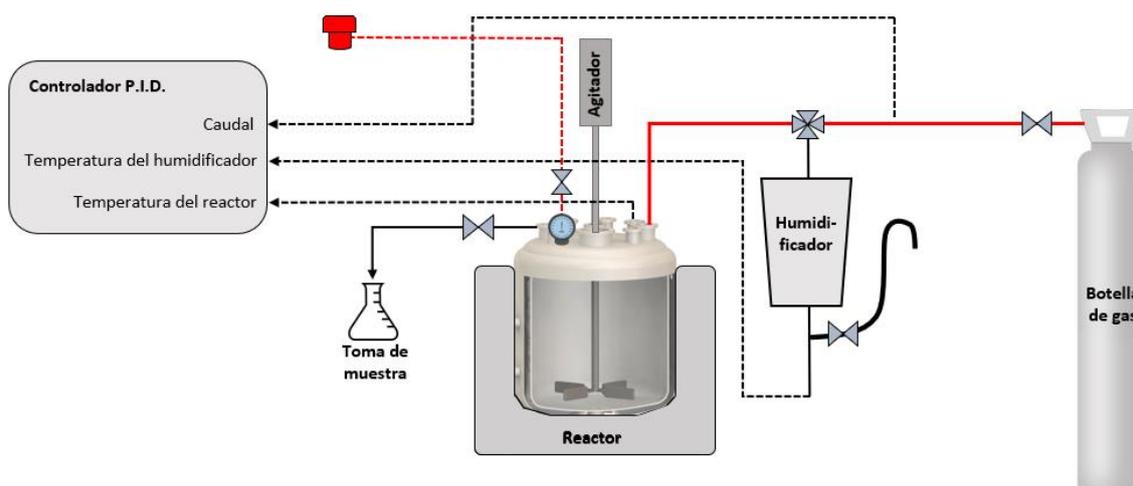


Figura 8. Esquema del reactor. En rojo, línea de gas.

3.3 Métodos analíticos

La caracterización de los hidrolizados permite conocer su evolución con el tiempo dentro del reactor. Para la caracterización, se mide el pH, el color, la carga orgánica, los sólidos totales y los sólidos volátiles, IVL, la concentración de proteínas, carbohidratos y carbono orgánico total soluble y el SUVA. Dependiendo del ensayo, se utilizará el hidrolizado total o soluble, siendo:

- Hidrolizado total: aquel que sale directamente del reactor (hidrolizado soluble más sólidos no solubles).
- Hidrolizado soluble: corresponde al sobrenadante del hidrolizado total, tras centrifugado a 10000 g durante 10 minutos.

El pH se midió en el hidrolizado total, a temperatura ambiente, con el pH-metro Ion 700 (Eutech™). Para el color, se empleó el número de color (NC), un índice basado en la absorbancia del hidrolizado soluble a tres longitudes de onda distintas: 436 nm, 525 nm y 620 nm. A partir de éstas, se calcula el NC según la siguiente ecuación (Ec. 1):

$$NC = \frac{CAE_{436}^2 + CAE_{525}^2 + CAE_{620}^2}{CAE_{436} + CAE_{525} + CAE_{620}} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

CAE₄₃₆: Coeficiente de Absorción Espectral a 436 nm.

CAE₅₂₅: Coeficiente de Absorción Espectral a 525 nm.

CAE₆₂₀: Coeficiente de Absorción Espectral a 620 nm.

Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro modelo 1500 Analytik Jena AG (SPEKOL®) usando el hidrolizado soluble.

La carga orgánica se determinó con el método estandarizado de la DQO (A.P.H.A., 1995). Este método determina las sustancias presentes en la muestra susceptibles de ser oxidadas por medios químicos, lo que correspondería con la materia orgánica y una pequeña parte de compuestos inorgánicos. Se utiliza un agente oxidante fuerte, dicromato potásico, y se mide su consumo. Para llevar a cabo la determinación de la DQO, se utilizan 3 mL de muestra. Se utilizan dos reactivos preparados en dos disoluciones: 2 mL de la disolución B (disolución de dicromato potásico) y 4 mL de la disolución A (disolución de sulfato de plata). La reacción se lleva a cabo durante 2 horas en un digestor a 150 °C y finalmente se mide la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro modelo DR 2400 (Hach®). El

resultado se expresa en concentración de oxígeno (mg/L o ppm) tras un calibrado previo con ftalato potásico (de 0 a 1000 ppm). La DQO se realizó tanto para el hidrolizado total (DQO total) como para el hidrolizado soluble (DQO soluble).

Del análisis de la DQO total y la DQO soluble de los puntos inicial y final, se obtiene el porcentaje de solubilización (% solubilización), parámetro que indica la fracción de compuestos intracelulares que pasan a la fracción soluble. Este porcentaje se calcula a partir de la siguiente ecuación (Ec. 2):

$$\% \text{ solubilización} = \frac{(DQO_{t_0} - DQO_{s_0}) - (DQO_{t_f} - DQO_{s_f})}{DQO_{t_0} - DQO_{s_0}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

DQO_{t_0} : DQO del hidrolizado total inicial (minuto 0).

DQO_{s_0} : DQO del hidrolizado soluble inicial (minuto 0).

DQO_{t_f} : DQO del hidrolizado total final (minuto 180).

DQO_{s_f} : DQO del hidrolizado soluble final (minuto 180).

Los sólidos suspendidos totales (SST) son todos aquellos sólidos no disueltos presentes en la muestra. Para calcularlos, se somete el pellet obtenido por centrifugación de un volumen dado del hidrolizado total de muestra a secado a 105 °C durante 24 horas en un recipiente previamente secado y pesado (peso 1). Los sólidos totales corresponden a la diferencia de peso entre el vaso con muestra seca y el vaso sin muestra (peso 2). Estos cálculos se corresponden con la siguiente ecuación (Ec. 3):

$$\text{Sólidos suspendidos totales} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{peso 2} - \text{peso 1}}{\text{volumen de muestra}} \quad \text{Ec. 3}$$

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) son aquellos sólidos suspendidos que se volatilizan rápidamente al ser sometidos a altas temperaturas y suelen ser una excelente estimación de la cantidad de materia orgánica insoluble en la muestra. Para calcularlos, el mismo recipiente con muestra seca obtenido durante la determinación de SST se calcina a 550 °C durante 4 horas. Al peso inicial de la muestra seca (peso 2) se le resta el de las

cenizas obtenidas (peso 3) tras el calcinado, obteniéndose la concentración de SSV. Esto se representa en la siguiente ecuación (Ec. 4):

$$\text{Sólidos suspendidos volátiles } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{peso 3} - \text{peso 2}}{\text{volumen de muestra}} \quad \text{Ec. 4}$$

Con respecto al índice volumétrico de lodos (IVL), este parámetro determina el volumen que ocupa un gramo de levadura, expresado en L/g SST. Se calcula a partir de un volumen dado de muestra del hidrolizado total, que se deja sedimentar durante 30 minutos y se mide el volumen de sólidos. Posteriormente, se centrifuga la muestra 10 minutos a 10000 g y se descarta el sobrenadante para estimar los gramos de sólidos suspendidos tras ser secados a 105°C en estufa. Para calcular el IVL, se divide el volumen sedimentado por litro entre la concentración de sólidos suspendidos totales.

Para la medida de la concentración de proteínas, se empleó el método de Lowry, (Lowry *et al.*, 1951) sobre el hidrolizado soluble. Este método consiste en la utilización del reactivo Folin-Ciocalteu para la detección colorimétrica de color azul. Este color se forma cuando este reactivo reacciona con iones Cu^+ producidos por la oxidación de los enlaces peptídicos. Los iones Cu^+ son proporcionados en un reactivo previo de sulfato de cobre (II). Para llevar a cabo este método, se utilizó 1 mL de muestra al que se le añadieron 5 mL de una mezcla en proporción 50:0.5:0.5 de los siguientes reactivos:

- Reactivo A: carbonato de sodio (Na_2CO_3 2%) e hidróxido de sodio (NaOH 0,1M).
- Reactivo B1: sulfato de cobre (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 1 %).
- Reactivo B2: tartrato sódico potásico ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 2%).

Esta mezcla se dejó en oscuridad durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 300 μL del reactivo comercial Folin-Ciocalteu en dilución 1:2. Se dejó reaccionar de nuevo en oscuridad durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 580 nm en un espectrofotómetro modelo 1500 Analytik Jena AG (SPEKOL®). El calibrado se realizó empleando albúmina de suero bovino (BSA de Sigma) como patrón, de 0 a 500 ppm.

Los carbohidratos se determinaron por el método de Dubois (Dubois *et al.*, 1956), en el hidrolizado soluble. Este método colorimétrico se fundamenta en la reacción de los grupos reductores libres presentes en los azúcares simples, polisacáridos y otros derivados de metilo al contacto con fenol y ácido sulfúrico. Esta reacción da lugar a un color

anaranjado fácilmente cuantificable. Para llevar a cabo este método se utilizó 1 mL de muestra al que se le añadieron 0.5 mL de fenol 5% y 2,5 mL de ácido sulfúrico 96%. Se dejó reposar 30 minutos finalmente se midió su absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro modelo modelo DR 2400 (Hach®). El patrón utilizado para el calibrado fue D-glucosa (Sigma), de 0 a 1000 ppm.

La concentración de carbono orgánico total (COT) se midió con el equipo Shimadzu TOC-V CSH. Este equipo determina directamente la concentración en ppm de COT presente en el hidrolizado soluble.

Se determinó asimismo la absorbancia específica ultravioleta (SUVA) a partir de la absorbancia del hidrolizado soluble a 254 nm y la concentración de COT para determinar los grupos aromáticos de la materia orgánica total (Karanfil *et al.*, 2002).

3.4 Métodos de separación de biomoléculas

El fundamento de los métodos utilizados se basa en la medición de proteínas y carbohidratos solubles antes y después de la aplicación del método, para determinar el porcentaje de recuperación y la selectividad. También se midió la DQO soluble para comprobar que la carga orgánica del sobrenadante disminuye tras el método de separación empleado. Se realizó tanto para hidrolizados por OH como por HT, empleando el sobrenadante obtenido al tiempo óptimo de tratamiento hidrotérmico (ver Resultados y discusión, 4.1.6). Para calcular el parámetro *recuperación* de proteínas y carbohidratos, se emplean las siguientes fórmulas (Ecs. 5 y 6):

$$\text{Recuperación CH} = \frac{P_i - P_f}{P_f} \times 100 \quad \text{Ec. 5}$$

$$\text{Recuperación CH} = \frac{CH_i - CH_f}{CH_f} \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde:

P_f : concentración final de proteínas en el sólido retenido (concentración después del tratamiento en la parte retenida).

CH_f : concentración final de carbohidratos en el sólido retenido (concentración después del tratamiento en la parte retenida).

P_i : concentración inicial de proteínas (concentración antes del tratamiento).

CH_i : concentración inicial de carbohidratos (concentración antes del tratamiento).

Por otro lado, el parámetro *selectividad* indica la selectividad entre las proteínas y los carbohidratos durante la separación. La selectividad (α) se calcula de la siguiente manera (Ec. 7):

$$\alpha_{P/CH} = \frac{P_f/CH_f}{P_i/CH_i} \quad \text{Ec. 7}$$

Si α resulta próximo 1, significa que la selectividad durante la separación de carbohidratos y proteínas no ha sido buena. Si α resulta superior a 1, significa que se han retenido o precipitado más proteínas que carbohidratos. Si α resulta inferior a 1, significa que se han retenido o precipitado más carbohidratos que proteínas.

3.4.1 Precipitación con pH y sulfato de amonio

Se ajustó el pH con NaOH 1M y HCl 1M en 20 mL de hidrolizado soluble. Se ensayaron los siguientes valores de pH: 2; 2,5; 3; 3,5; 4 y 9. Tras 30 minutos, se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 10 minutos y se midieron las concentraciones de proteínas y carbohidratos no precipitados en el sobrenadante. Se realizaron triplicados para cada valor de pH inicial. Se muestra un esquema en la Figura 9.

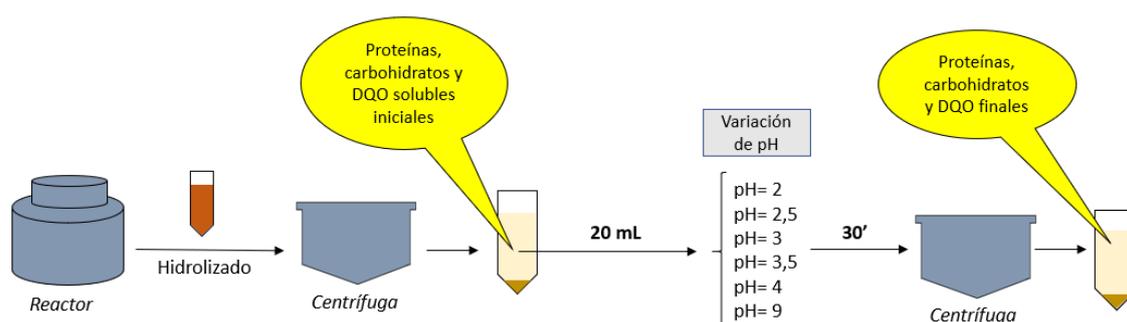


Figura 9. Esquema del protocolo de precipitación de proteínas por variación de pH.

Para la precipitación con distintas concentraciones de sulfato de amonio, se tomó de referencia la solubilidad máxima del sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) en agua, siendo 74,4 g/100 mL (20 °C). En base a este valor, se ensayaron cuatro porcentajes de saturación:

100 %, 90 %, 80 % y 50 % sobre 20 mL del hidrolizado soluble. Tras 30 minutos desde la adición del sulfato de amonio, se realizó una centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos. Se midieron las concentraciones de proteínas y carbohidratos no precipitados en el sobrenadante. Se realizaron triplicados para cada valor de pH utilizado. Se muestra un esquema del procedimiento en la Figura 10.

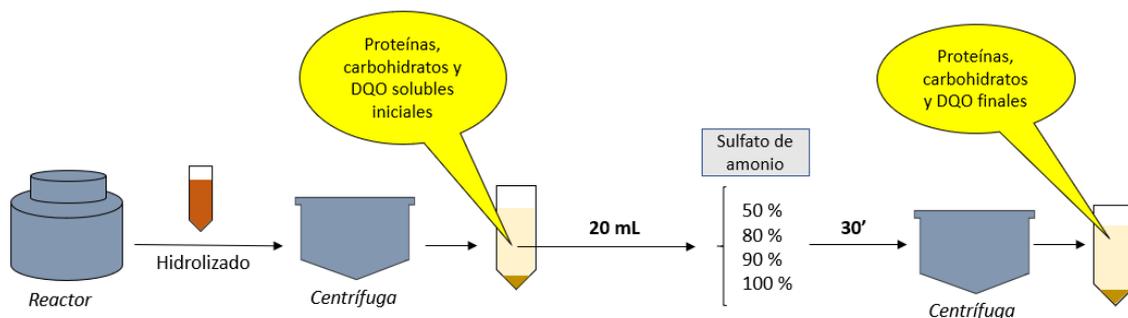


Figura 10. Esquema del protocolo de precipitación de proteínas por adición de concentraciones de sulfato de amonio.

3.4.2 Retención de proteínas con IMAC

La Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC), consiste en la preparación de una resina de intercambio catiónico saturada de iones cobre, los cuales interactuarán de forma selectiva con las proteínas presentes en la muestra, pero no con los carbohidratos.

Los ensayos IMAC se realizaron en discontinuo. Para activar la resina, se preparó una disolución 1M de CuCl_2 y se puso en contacto con una resina comercial Lewatit TP-207 en una relación de 5mL/1 g de resina. Este contacto se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el líquido y se lavó la resina varias veces con agua destilada. Se muestra una imagen a continuación de la diferencia de las resinas sin y con Cu^{2+} (Figura 11).

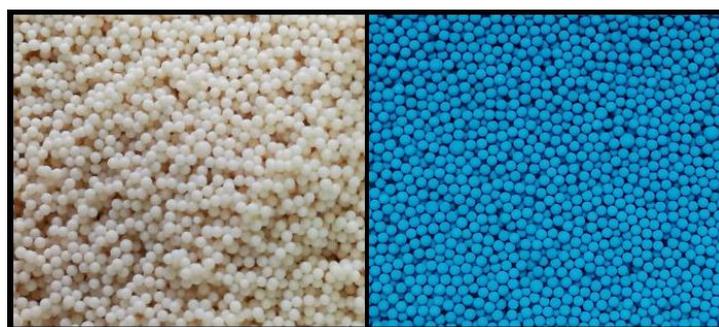


Figura 11. Resina Lewatit TP-207. A la izquierda, sin cobre. A la derecha, con cobre.

Se retiró con papel absorbente el exceso de agua de la resina, obteniendo la resina húmeda. Diferentes cantidades de resina se añadieron a 10 mL de hidrolizado: 0.25g, 0.5g, 1 g, 1.5g 2 g, 3 g, 4 g, 5 g,6 g, 9g, 12g y 15g. Tras una hora de agitación a 70 rpm y temperatura ambiente, se midieron las concentraciones de proteínas y carbohidratos solubles y la carga orgánica en el líquido. Se realizaron triplicados para cada cantidad de resina probada. Se muestra un esquema del procedimiento en la Figura 12.

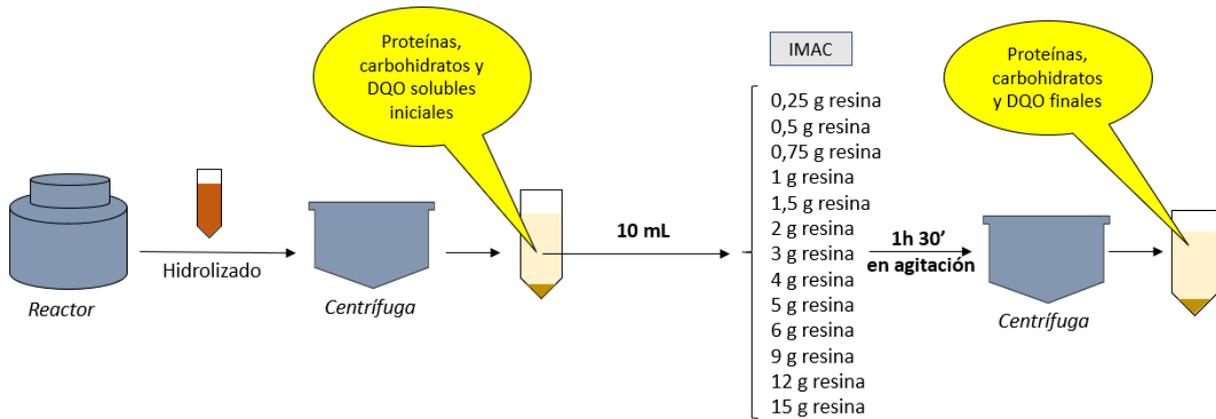


Figura 12. Esquema del protocolo de retención de proteínas por IMAC con diferentes cantidades de resina.

La expresión matemática empleada para calcular la capacidad de adsorción (q), es la siguiente (Ec. 8):

$$q = \frac{V \times (C_i - C_f)}{g \text{ resina}} \quad \text{Ec. 8}$$

Donde:

V: Volumen de hidrolizado utilizado para la separación (L).

C_i : concentración de proteínas antes de la interacción de la resina (mg/L).

C_f : concentración de proteínas después de la interacción con la resina (mg/L).

g resina: cantidad de resina utilizada en la interacción (g).

4 Resultados y discusión

4.1 Caracterización de hidrolizados de levadura de cerveza

Antes de iniciar las pruebas de separación de proteínas, se procedió a la caracterización de los hidrolizados de levadura obtenidos por OH y por HT. Se tomaron muestras cada 20 minutos durante 180 minutos para ambos tratamientos a 160 °C y 40 bar. Se evaluó la evolución temporal durante los procesos de oxidación e hidrólisis de distintos parámetros: pH, número de color, DQO, concentración de sólidos e IVL, concentración de COT soluble, concentración de proteínas y carbohidratos solubles y SUVA. Los resultados se discuten a continuación.

4.1.1 pH

Se observó que tanto el pH de la levadura original (Tabla 1) como el de los dos hidrolizados (Figura 13) era ligeramente ácido en todos los casos. Se observó que el pH de la HT se mantiene más o menos constante entre valores de 5 y 6, es decir, ligeramente ácido. Sin embargo, se observó que el pH de la OH aumenta en los primeros 20 minutos hasta casi 6 y posteriormente disminuye progresivamente hasta cerca de 4.

La acidificación durante la OH se explica porque durante este proceso la materia orgánica se transforma en CO₂, agua y otros productos intermediarios como ácidos carboxílicos, acetaldehídos y alcoholes. También se han reportado las conversiones de sulfuro elemental en sulfato, halógenos en haluros y fósforos en fosfatos, que forman sales inorgánicas y ácidos (Kolaczkowski *et al.*, 1999). Estos últimos pueden generar la acidificación observada.

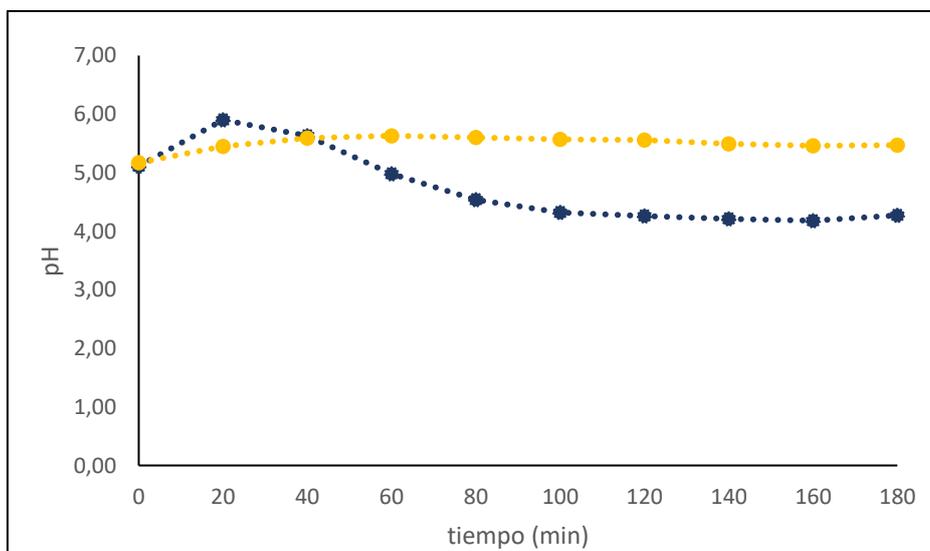


Figura 13. Evolución del pH del hidrolizado total por OH (●) y por HT (●). En todos los casos 160°C, 60 bar.

4.1.2 Número de color

La Figura 14 muestra la evolución en el tiempo del número de color del hidrolizado soluble. Se observó que el hidrolizado soluble por HT presenta un ligero y progresivo aumento del número de color, mientras que para el caso del hidrolizado por OH se observó un aumento mucho más brusco y más rápido desde el minuto 60.

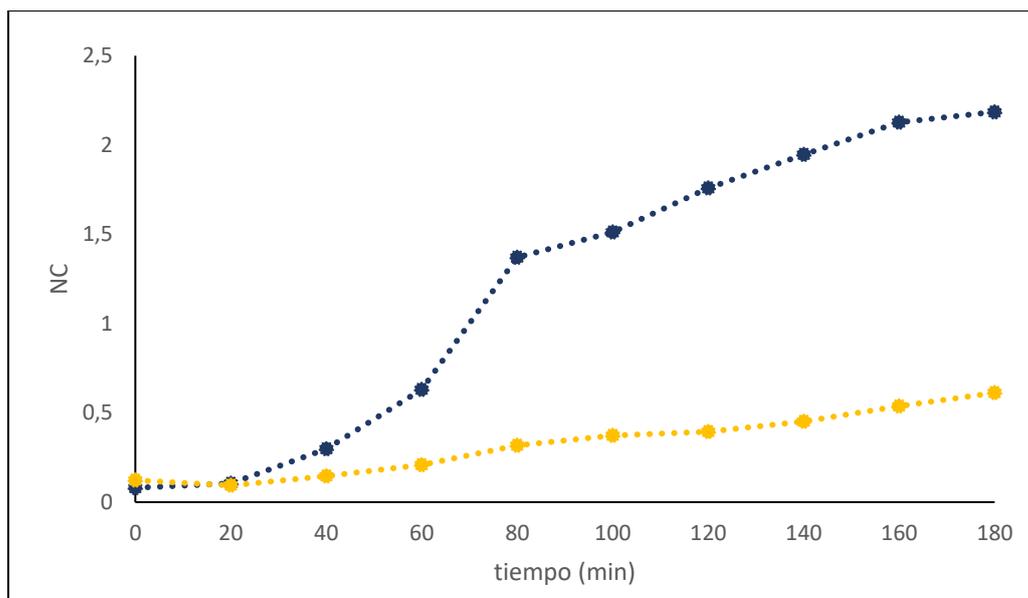


Figura 14. Evolución del número de color del hidrolizado por OH (●) y por HT (●). En todos los casos, 160°C, 60 bar.

El aumento del NC podría deberse a la formación de determinados compuestos fenólicos solubles coloreados, como quinhidronas, por reacciones de oxidación (Urrea *et al.*, 2018), lo que explica que la OH de lugar a una muestra mucho más oscura. Sin embargo, en HT no se observa un incremento tan drástico del NC, lo que podría deberse a la ausencia de una atmósfera oxidante.

4.1.3 DQO

En la siguiente figura (Figura 15) se muestra la evolución de la DQO, en relación a la DQO inicial (DQO total del minuto 0). Se midieron tanto DQO totales (incluyendo la fracción no hidrolizada, el hidrolizado total) como solubles (sólo de la fracción soluble, el hidrolizado soluble).

Como era de esperar, la DQO total de los hidrolizados por HT se mantuvo más o menos constante en el tiempo, ya que durante el proceso no se produce oxidación de las

moléculas. Se observó cierta inestabilidad en esta constancia entre el minuto 60 y el 160, lo que podría deberse a errores experimentales o de medida – la muestra de HT presenta mucha más capacidad espumante que la muestra de OH, lo que dificulta la realización de los experimentos. Por otra parte, sí que se observó una tendencia descendiente en la DQO total de los hidrolizados por OH, ya que los procesos de oxidación van degradando la carga orgánica. Al final del tiempo de experimentación, un 24% en la OH y un 3% en la HT de la DQO total inicial se había mineralizado.

En lo que respecta a la DQO soluble, en ambos procesos se esperaba un incremento de la carga orgánica, como se observó experimentalmente, ya que se están liberando progresivamente compuestos intracelulares que van aumentando la carga orgánica soluble. Concretamente, para la OH se produjo un aumento de hasta 4 veces el valor inicial y para la HT de 6,7 veces en la DQO soluble tras 3 horas de tratamiento. Según esto, se consiguió una mayor liberación de carga orgánica en la fracción soluble con la oxidación. Esto es debido a que las condiciones oxidantes de la OH provocan una mayor lisis celular que la alcanzada meramente por temperatura, como ocurre en la HT.

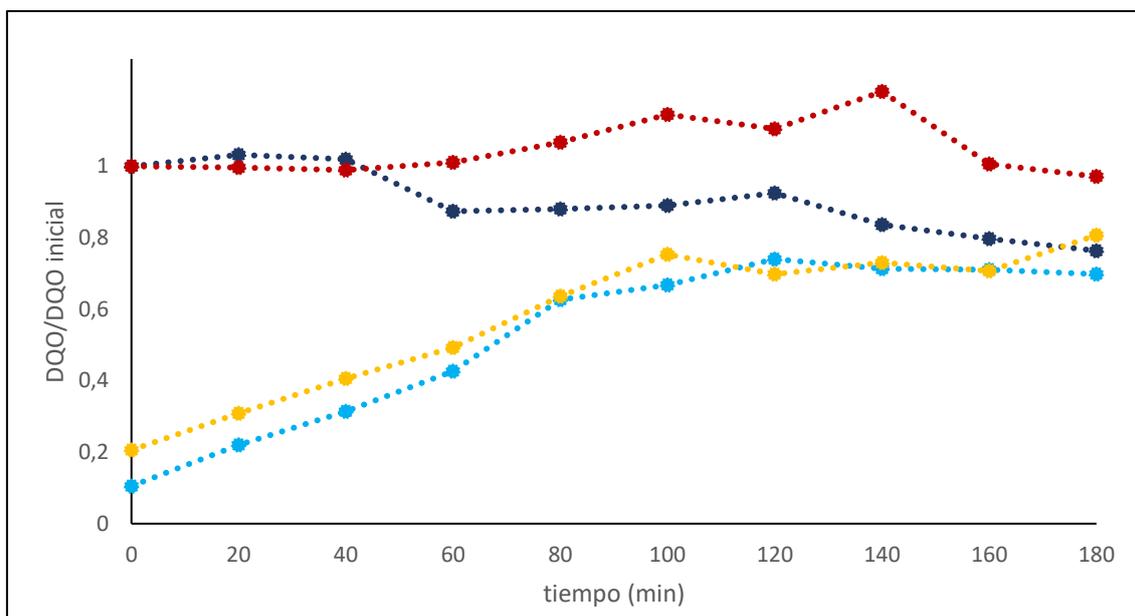


Figura 15. Evolución de la DQO total de los hidrolizados por OH (●) y por HT (●) y DQO soluble de los hidrolizados por OH (●) y por HT (●). En todos los casos 160 °C, 60 bar.

A partir de la DQO también se calculó el porcentaje de solubilización. Para la OH se obtuvo un porcentaje de solubilización del 92,6%, mientras que para la HT se obtuvo un porcentaje de solubilización del 79,3%. Por tanto, estos resultados también apoyan el hecho de que con la oxidación se consigue una mayor liberación de componentes intracelulares.

4.1.4 Concentración de sólidos e IVL

Se observó una disminución en la concentración de sólidos a medida que progresaba las reacciones de oxidación y/o hidrólisis (Figura 16). Sin embargo, la disminución fue mucho más acusada durante la OH, principalmente desde el minuto 40 hasta el 100, debido a las condiciones de lisis más agresivas en presencia de oxígeno, como ya se ha comentado. Además, cabe destacar que la inmensa mayoría de los sólidos suspendidos eran volátiles, es decir, materia orgánica.

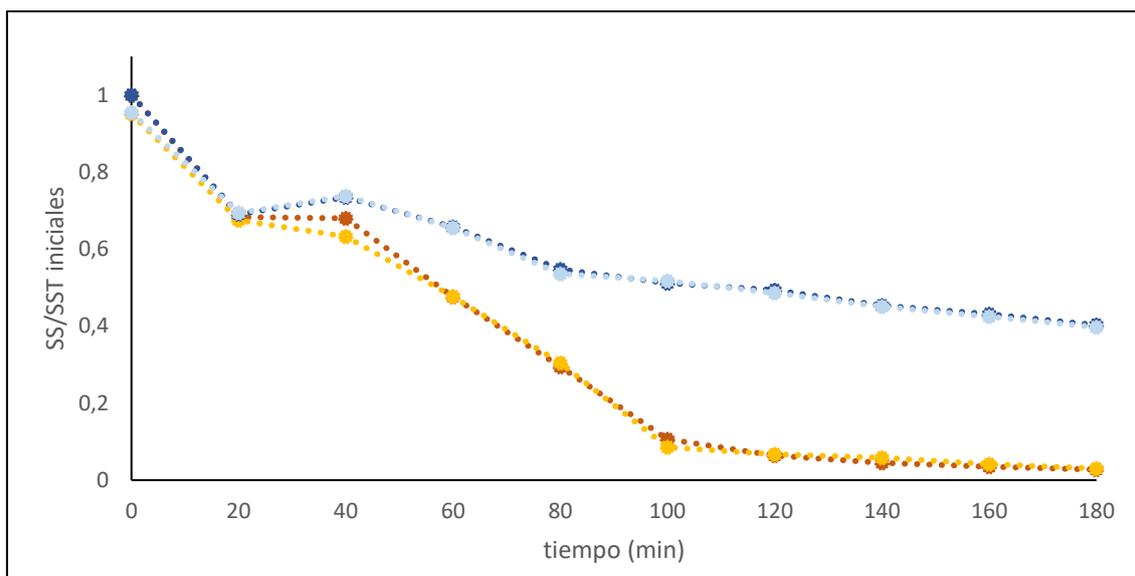


Figura 16. Evolución de la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) por OH (●) y por HT (●) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) por OH (●) y por HT (●). En todos los casos 160 °C, 60 bar.

Los resultados de SST son los esperados: una disminución en la concentración, ya que la levadura se va rompiendo en fracciones más pequeñas, de menor peso molecular y más solubles. Así, la reducción en sólidos para OH y HT fueron del 97 y del 60%, respectivamente.

Por otra parte, la evolución del IVL se muestra en la Figura 17. El IVL se define como el volumen que ocupa 1 g de levadura. La HT mostró un IVL bajo a lo largo del tiempo, aunque se incrementó paulatinamente durante el tratamiento, lo que significa que su densidad va disminuyendo. Esto se debe porque, a pesar de que los SST van disminuyendo, se van liberando biopolímeros solubles que hacen incrementar el IVL (Urrea *et al.*, 2018). Sorprendentemente, para la OH, se observó un incremento muy brusco desde el minuto 80 hasta el 120, seguida de una disminución brusca al minuto 140. Visualmente, durante el proceso de sedimentación para la determinación del IVL, para el

OH no se observó una sedimentación perfectamente clara en los puntos de los minutos 100 y 120, es decir, se produce una sedimentación difusa. Esto podría deberse a la oxidación de los biopolímeros liberados (Urrea *et al.*, 2018), que afectan a la viscosidad del líquido y hacen que la sedimentación del sólido no hidrolizado no sea buena por la disminución de la densidad en la muestra. Comparando los IVL iniciales y finales (tras 180 minutos) se obtiene un aumento del IVL en ambos tratamientos, con incrementos de hasta 3 veces para el caso de la OH y 3,5 veces para la HT. Por tanto, los sólidos generados al final del tratamiento generan una materia menos compacta que el de la levadura de partida o, lo que es lo mismo, su separación por sedimentación es más complicada.

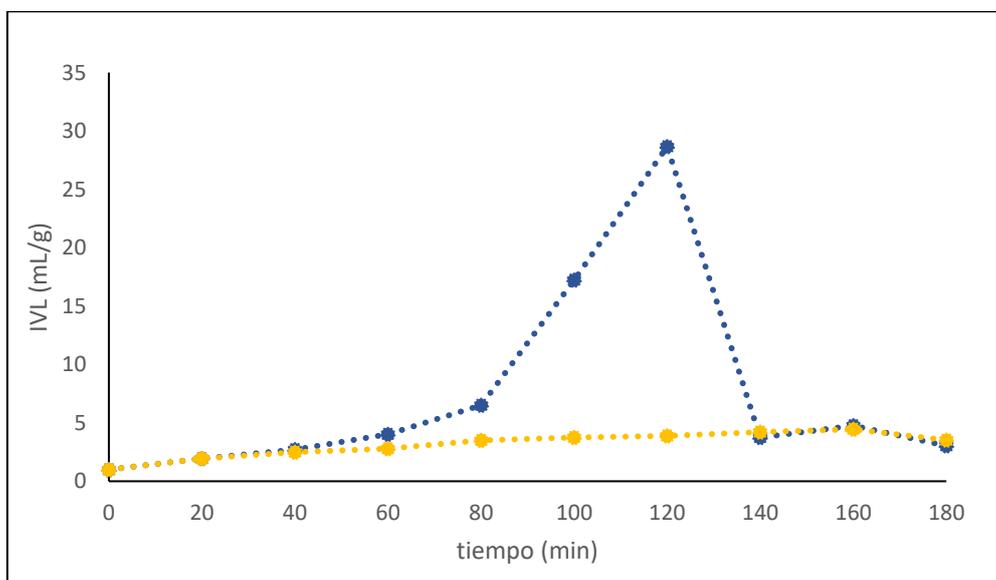


Figura 17. Evolución del índice volumétrico (IVL) del hidrolizado soluble por OH (●) y por HT (●). En todos los casos 160 °C, 60 bar.

4.1.5 Carbono orgánico soluble

Al liberarse los componentes intracelulares de las levaduras durante la oxidación/hidrólisis, la concentración de carbono orgánico soluble también aumenta, tal y como se muestra en la Figura 18. De nuevo se debe a la liberación progresiva de materia orgánica soluble, con una pendiente más pronunciada hasta el minuto 80 ya que la liberación en estos primeros minutos ocurre a mayor velocidad. En OH, a partir del minuto 120 se observó un ligero descenso del carbono, lo que demuestra la oxidación de la materia hacia CO₂. Como era previsible, para la HT no se observó esta disminución en ningún momento al no producirse oxidaciones.

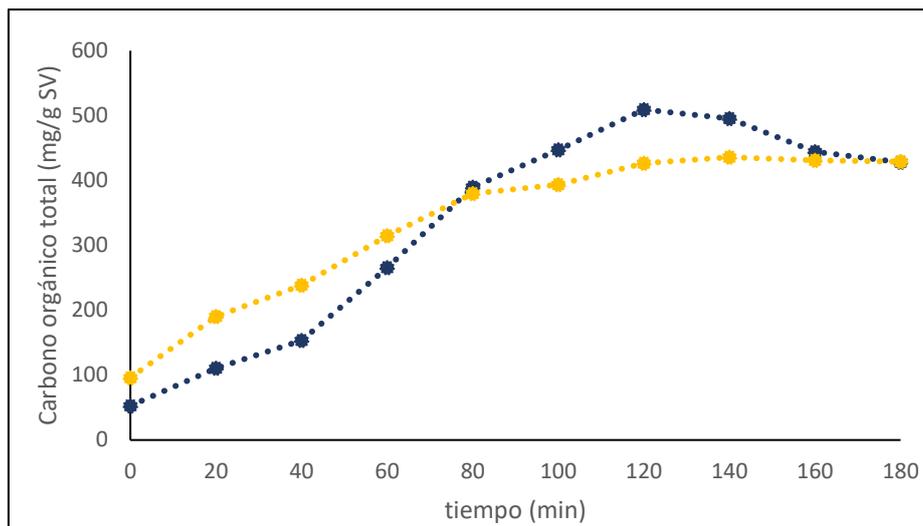


Figura 18. Evolución de la concentración de carbono orgánico total soluble por OH (●) y por HT (●). En todos los casos 160 °C, 60 bar.

4.1.6 Concentración de proteínas y carbohidratos

Durante los procesos de oxidación o hidrólisis, las paredes de las levaduras se van rompiendo, liberando al medio las sustancias de su interior, que pasan a la fase líquida o soluble (García *et al.*, 2017). Los componentes intracelulares de mayor importancia son las proteínas y los carbohidratos, cuya liberación progresiva se muestra en la Figura 19.

Se observó que se liberaron más proteínas mediante la HT que la OH. En lo que respecta a la OH, se observó una ligera disminución a partir del minuto 120 en su contenido en proteínas, lo que podría deberse a procesos de oxidación. Concretamente, se produjo una reducción de 95 ppm desde el minuto 120 hasta minuto final, 180. Esta ligera disminución no ocurrió en la HT, lo que podría justificarse porque los procesos de oxidación son mucho más agresivos para las moléculas (García *et al.*, 2017).

Por otro lado, en los carbohidratos producidos por HT se observó un aumento paulatino de su concentración. El incremento también se produjo para la OH, pero de forma más brusca y escalonada, así como de nuevo un descenso en la concentración a partir del minuto 120, de hasta 130 ppm, pudiendo justificarse también por procesos de oxidación (García *et al.*, 2017).

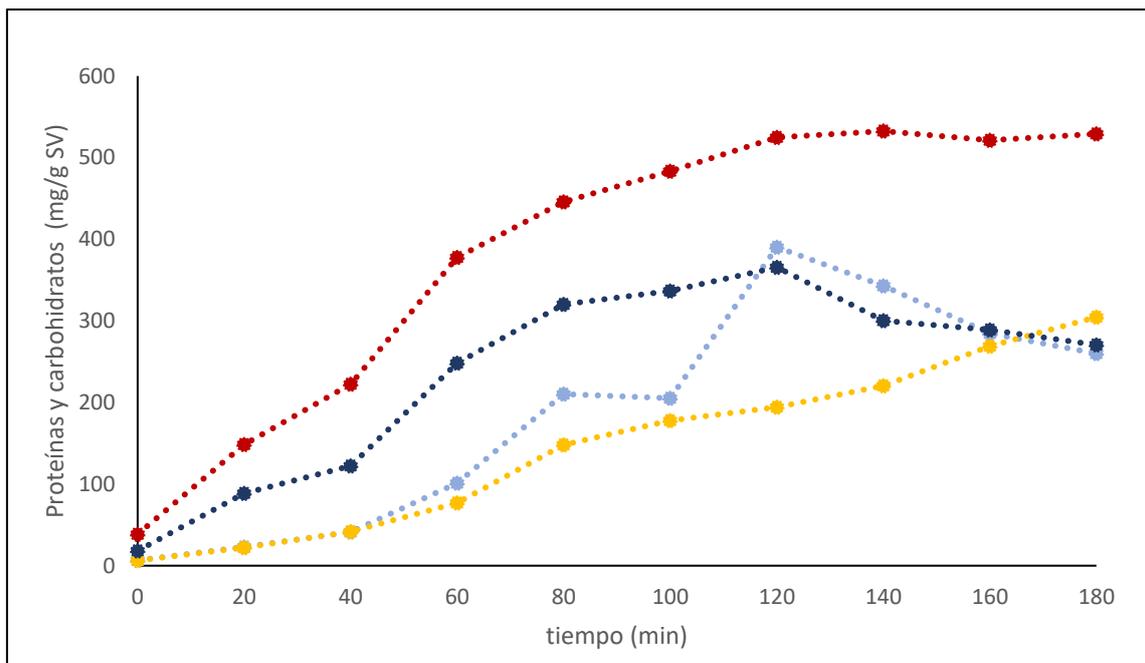


Figura 19. Evolución de la concentración de proteínas por OH (●) y por HT (●) y carbohidratos por OH (●) y por HT (●). En todos los casos 160 °C, 60 bar.

En resumen, se observaron mayores concentraciones de proteínas y carbohidratos en HT que en OH y, además, se observó una disminución a partir del minuto 120 en OH (coincidiendo con el descenso del COT) , lo que podría deberse a procesos de oxidación.

4.1.7 Variación del SUVA

La absorbancia específica ultravioleta (SUVA) se muestra en la Figura 20. Se observó cierta estabilidad a partir del minuto 40 en ambos tratamientos, y un gran incremento de la detección de dobles enlaces en el minuto 20 en la OH.

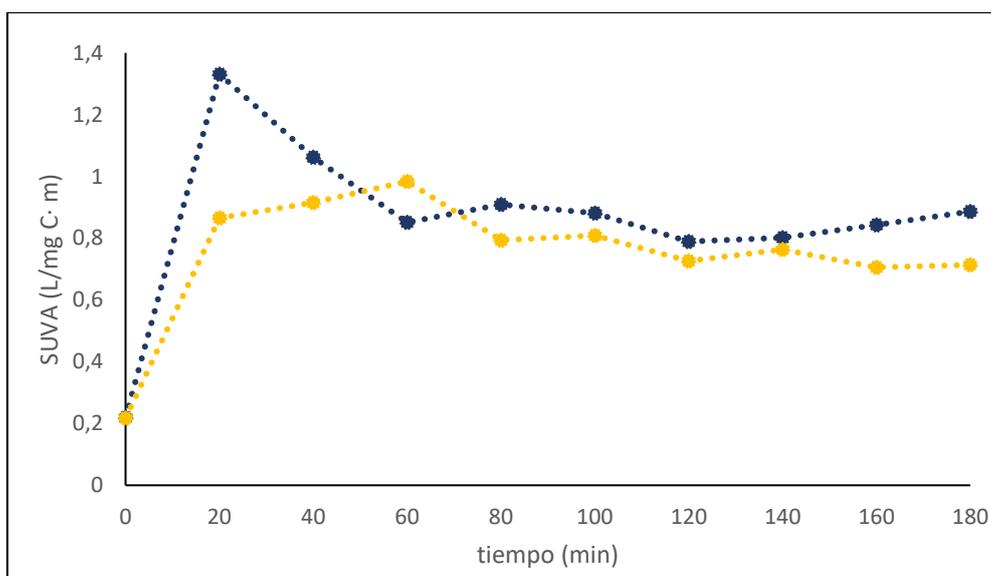


Figura 20. Evolución del SUVA por OH (●) y por HT (●). En todos los casos, 160 °C, 60 bar.

Es posible que la presencia de O₂ en la ruptura prematura haga que determinados compuestos que son liberados de la pared celular de la levadura o del interior celular en un primer momento formen dobles enlaces que posteriormente son degradados por la oxidación.

4.2 Métodos de separación de componentes

Tras la caracterización de los hidrolizados, se escogió el minuto 80 de tratamiento como tiempo óptimo para utilizar el hidrolizado en los experimentos de separación, en base a la concentración de proteínas solubles obtenida (Figura 19), tanto para OH como para HT. En el minuto 80, la concentración de proteínas ya es muy elevada, mientras que tiempos más avanzados podría dar lugar a una degradación excesiva. En base a este punto de oxidación/hidrólisis, se experimentaron con distintos métodos de separación de proteínas del resto de componentes presentes en el hidrolizado soluble.

4.2.1 Precipitación de proteínas: pH y sulfato de amonio

En primer lugar, se utilizó el método de separación de proteínas con pH. Se utilizaron valores de pH distintos: pH=2, pH=2,5, pH=3, pH=3,5 y pH=4. No se espera una gran precipitación proteica en valores de pHs básicos, ya que los hidrolizados en el minuto 80 presentaron un valor de pH ácido, por lo que la mayoría de las proteínas estarían cargadas positivamente, y requerirían de ácidos para ser neutralizadas (insolubilizándose así). A modo de comprobación de este último argumento, se utilizó también el pH=9.

La figura 21 muestra la recuperación de las proteínas para los dos tipos de hidrolizados (Figura 21). Para el caso de OH, se observó una gran precipitación a pH=2,5 y pH=3, mayor del 80 % en ambos casos (88,3 y 87,5 %, respectivamente). Sin embargo, las precipitaciones a pH=2, pH=3,5, pH=4 y pH=9 fueron muy bajas (21,7 %, 17,4 %, 14,9 % y 11,8 %, respectivamente), siendo decrecientes conforme disminuye la acidez.

Para el caso de la HT, no se observó ningún valor de pH que consiguiese una precipitación muy alta. La precipitación más alta se consiguió a pH=4, siendo del 20,9 %. Se observó que cuanto más se aleja del pH original (pH=6) hacia la acidez, menos precipita, siendo una precipitación del 16,1 % para los pHs 3,5 y 3, del 12,5 % para el pH=2,5 y del 11,7 % para el pH=2. También se observó el menor valor de precipitación a pH=9 (9,5 % de precipitación).

Como ya se ha comentado (ver Consideraciones teóricas y experimentales: Métodos de separación), la precipitación por variación de pH depende del punto isoeléctrico de las

proteínas. El punto isoeléctrico es distinto para cada proteína. Las altas precipitaciones para el pH 2,5 y 3 para las proteínas presentes en la OH, debe estar relacionada con modificaciones en el tipo de proteínas generadas por oxidación durante el tratamiento hidrotérmico. Es posible que la oxidación consiga proteínas más parecidas en su estructura y distribución de cargas, que hagan que presenten un punto isoeléctrico más similares entre ellas, haciendo que precipiten más.

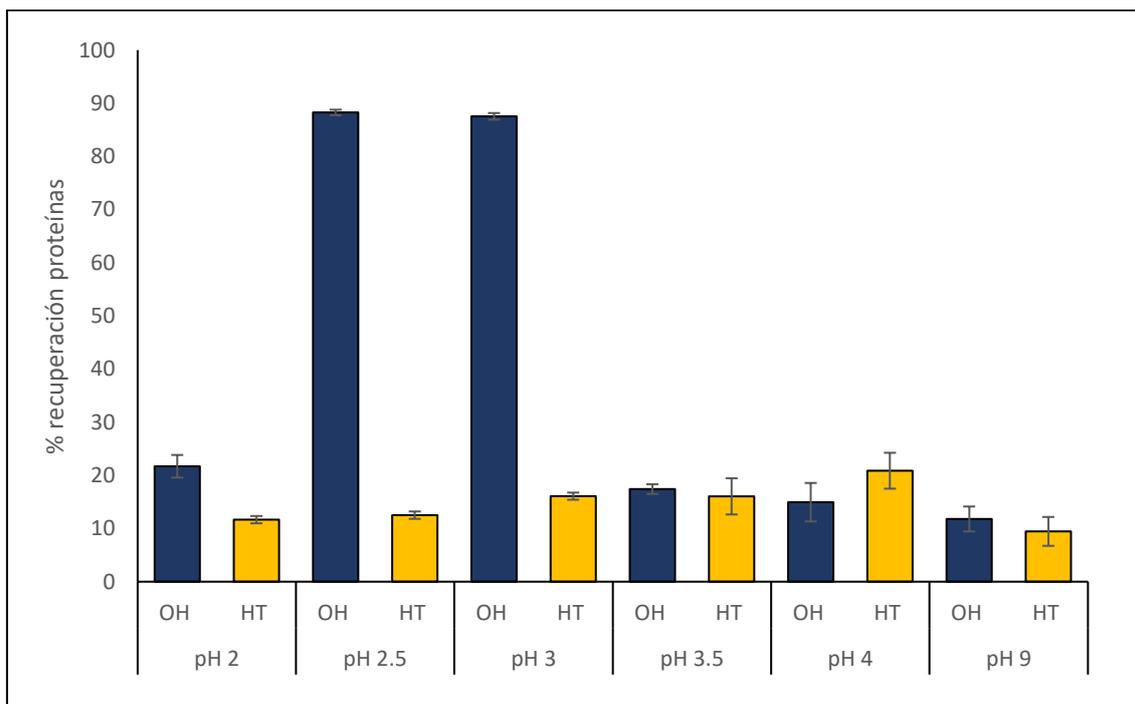


Figura 21. Histograma comparativo de los diferentes pHs con desviación estándar por OH (●) y por HT (●). En todos los casos, 160 °C, 60 bar.

Por otro lado, para la separación con sulfato de amonio, se tomó de referencia la solubilidad máxima de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) en agua, siendo de 7,4 g/100 mL (20 °C). Se realizaron cuatro concentraciones diferentes en base a este punto de saturación: 100 %, 90 %, 80 % y 50 %. Los resultados se representan en la Figura 22.

En la OH, la precipitación con sal no resultó ser tan eficiente como para la HT. Cantidades mayores de la sal consiguieron mayores precipitaciones, siendo la máxima para el 100% (57,9% de precipitación), y decreciendo conforme se disminuía la cantidad. La precipitación más baja se observó con el 53,7%, siendo una precipitación del 11%. Precipitaciones intermedias se consiguieron con el 80 y el 90%, siendo de 43,2 y 53,7%, respectivamente.

Por el contrario, en la HT, se alcanzaron valores de precipitación mayores del 50% en todos los casos, siendo el valor más alto la concentración de 80% con una precipitación del 65,2%. A esta le siguió la concentración de 100% (64,5%), el 90% (62,3%) y finalmente el 50% (55%). Por tanto, se observaron que las concentraciones intermedias son más eficientes.

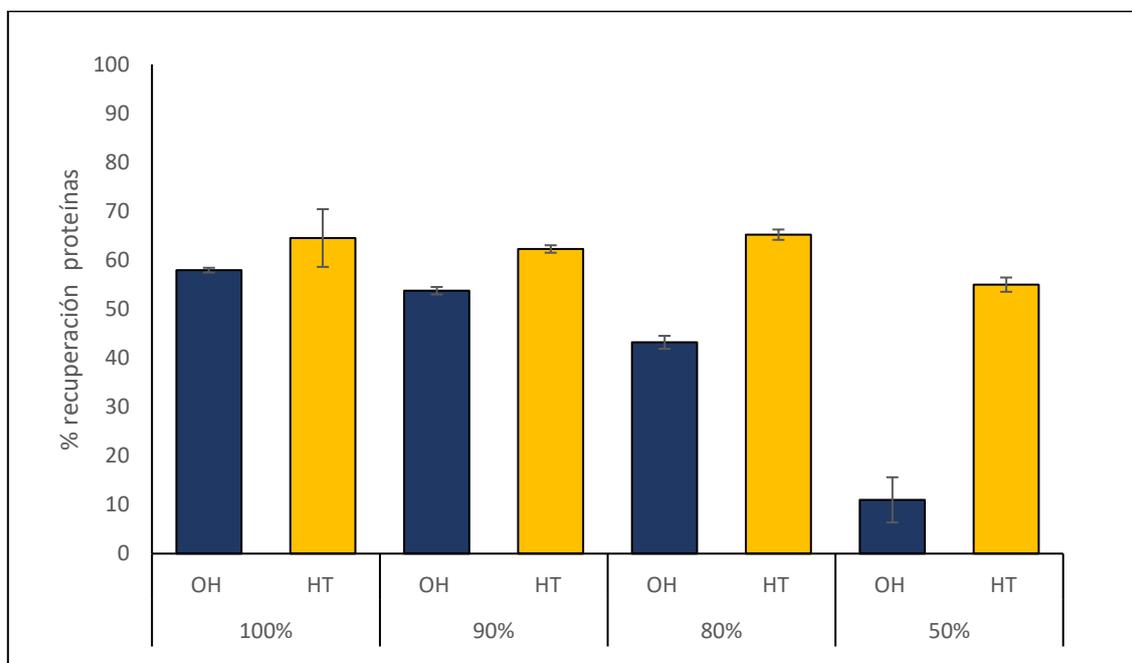


Figura 22. Histograma comparativo de las diferentes concentraciones de sulfato de amonio por OH (●) y por HT (●). En todos los casos 160 °C, 60 bar.

Que se observe una mayor precipitación en todas las concentraciones utilizadas para HT que para OH quizás se deba a que el tamaño generado en las proteínas liberadas por HT sea mayor (García *et al.*, 2017), y esto haga que sean más susceptibles a la precipitación salina. En cambio, al ser más pequeñas las proteínas liberadas por OH debido a las reacciones de oxidación, hace que sean más difíciles de precipitar, lo que se manifiesta en los resultados obtenidos.

Del mismo modo, se puede comparar la recuperación de proteínas con la recuperación de carbohidratos para observar la selectividad de la precipitación. La siguiente figura (Figura 23) muestra un histograma comparativo de los porcentajes de recuperación de proteínas (barras verdes) y de recuperación de carbohidratos (barras amarillas) con sus respectivas selectividades, que determinan si se precipitan más proteínas, más carbohidratos o si no hay una separación efectiva. También se representa un cuadro resumen de los resultados (Tabla 2).

Se puede observar que los pHs más ácidos producen una mayor retención en los carbohidratos, especialmente los pHs 2, 2,5 y 3. Esto indica que la separación de las proteínas no es demasiado selectiva, pues precipitan también carbohidratos. A pesar de esto, pHs ácidos son más adecuados para OH que para HT ya que consiguen mayor precipitación de proteínas que de carbohidratos. Por otra parte, a pHs menos eficaces, como pueden ser 3,5, 4 y 9 no hay precipitación de carbohidratos, a excepción del HT a pH=4, siendo la selectividad es muy alta, pero la recuperación de proteínas baja.

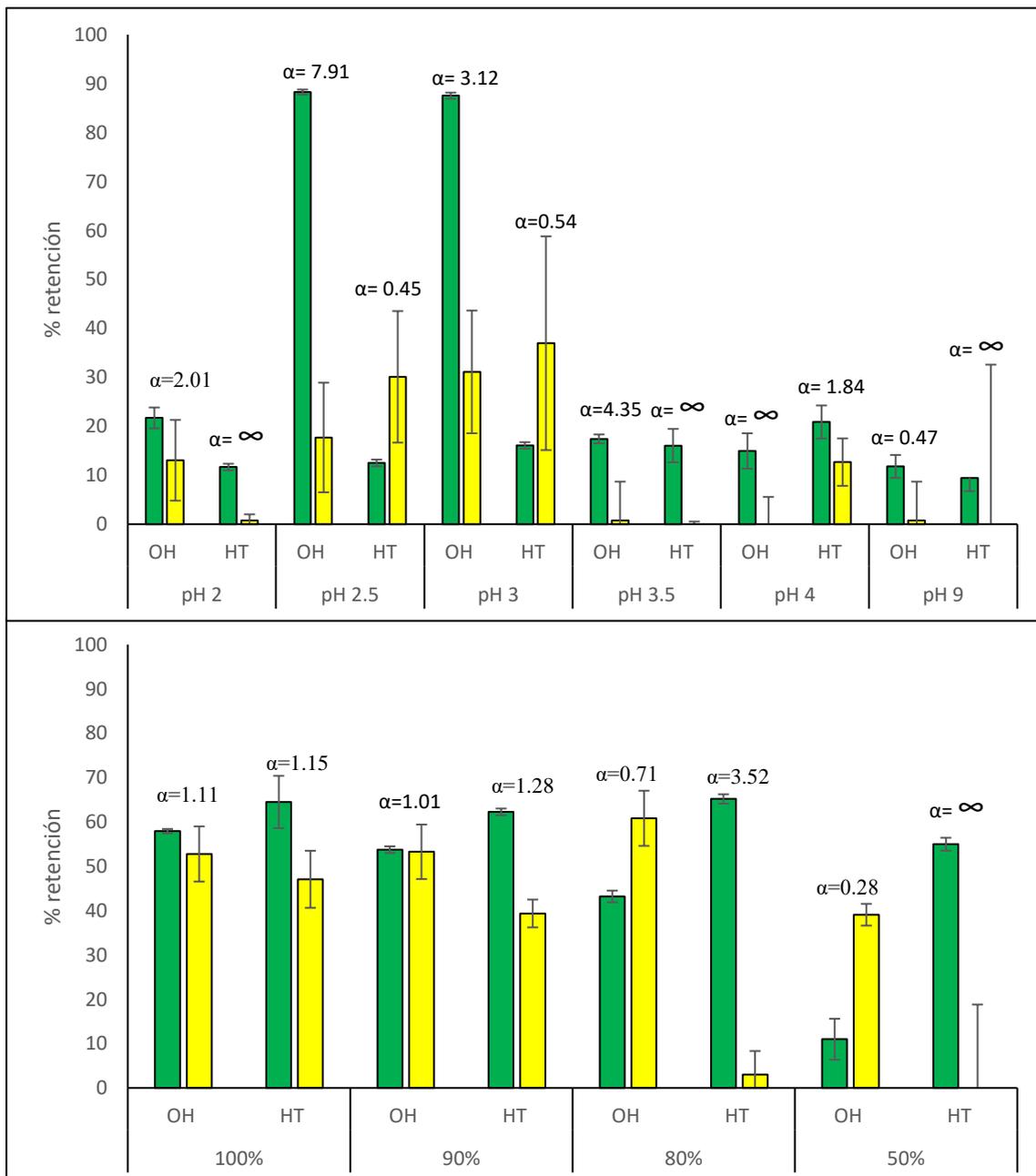


Figura 23. Histograma comparativo de la precipitación de proteínas (●) y carbohidratos (●) tras la precipitación con pH y sulfato de amonio. En las barras de error se representa la desviación estándar. Se muestra la selectividad (α). Arriba, precipitación con pH. Abajo, precipitación con sulfato de amonio.

Tabla 2. Cuadro resumen de recuperación y selectividad de proteínas de método de precipitación para cada tipo de hidrolizado.

	Recuperación*		Selectividad (α)**	
	OH	HT	OH	HT
pH 2	21,7%	11,7%	2,01	∞
pH 2.5	88,3%	12,5%	7,91	0,45
pH 3	87,5%	16,1%	3,12	0,54
pH 3.5	17,4%	16,0%	4,35	∞
pH 4	14,9%	20,9%	∞	1,84
pH 9	11,8%	9,5%	0,47	∞
Sulfato de amonio 100%	57,9%	64,5%	1,11	1,15
Sulfato de amonio 90%	53,7%	62,3%	1,01	1,28
Sulfato de amonio 80%	43,2%	65,2%	0,71	3,52
Sulfato de amonio 50%	11,0%	55,0%	0,28	∞

*Recuperación de proteínas: azul (<25%), amarillo (25-70%) o verde (>70%).

**Selectividad: verde (precipitan mayoritariamente proteínas, $\alpha > 1,3$), azul (precipitan mayoritariamente carbohidratos, $\alpha < 0,7$) o amarillo (precipitan proteínas y carbohidratos por igual, $0,7 > \alpha > 1,3$).

Existen estudios que muestran que determinadas proteasas liberadas por levaduras de *S. pastorianus* son en su mayoría glicoproteínas, proteínas con residuos principalmente de manosa y glucosa (Maddox y Hough, 1970). También se describe la α -galactosidasa (melibiasa) de *S. pastorianus* como una exoproteína con hasta un 57% de contenido de carbohidratos (manosa, glucosa y glucosamina) (Lazo *et al.*, 1978), al igual que otras glicoproteínas presentes en la pared celular. Las proteínas precipitadas en pHs ácidos (especialmente en OH) podrían ser en su mayoría proteínas glicosiladas que compartiesen puntos isoeléctricos similares y que diesen lugar a señales de carbohidratos que en realidad estuviesen presentes en las proteínas, y no fuesen carbohidratos libres (Martínez *et al.*, 2011).

En lo que respecta a la precipitación con sulfato de amonio, se observó que concentraciones del 100 y 90% de sulfato amónico precipitan la misma proporción de carbohidratos que de proteínas, por lo que no son métodos selectivos. Concentraciones más bajas, como la del 80 y 50% consiguen mejores selectividades. Concretamente, en OH se consigue una mayor precipitación de carbohidratos, mientras que en HT se consigue una mayor precipitación de proteínas. La misma explicación a los pHs ácidos podríamos encontrar aquí. Es posible que la mayoría de las proteínas producidas en la OH sean glicoproteínas que precipiten con el sulfato de amonio, por lo que, una precipitación, no solo de glicoproteínas, también de carbohidratos, daría un balance positivo hacia la precipitación de carbohidratos.

También se han encontrado estudios que demuestran que la presencia de sulfato de amonio puede producir una sobreestimación del contenido proteico en la medición de proteínas con el método de Lowry (Niamke *et al.*, 2005), por lo que es posible que el método de Lowry para medir proteínas no sea el más adecuado en la posibilidad de presencia de restos del sulfato de amonio utilizado para la precipitación.

Una forma de determinar que realmente ha ocurrido precipitación es a través de la DQO. Teóricamente, cuando ocurre precipitación la DQO debería disminuir puesto que se está separando materia orgánica de la muestra. Se realizó un histograma donde representa la relación de la DQO tras el tratamiento frente a la DQO antes del tratamiento (Figura 24).

En la precipitación con pH, se observó que la disminución de la DQO ha sido muy pequeña, lo que probablemente se deba a que es un método más selectivo para proteínas y los carbohidratos precipitan significativamente menos. Sin embargo, para la precipitación con sulfato de amonio, la diferencia de la DQO inicial y la DQO final en todas las concentraciones es muy acusada, lo que se podría deberse a que es un método mucho menos selectivo y que produce una mayor precipitación de carbohidratos (como se ha visto en la Figura 23).

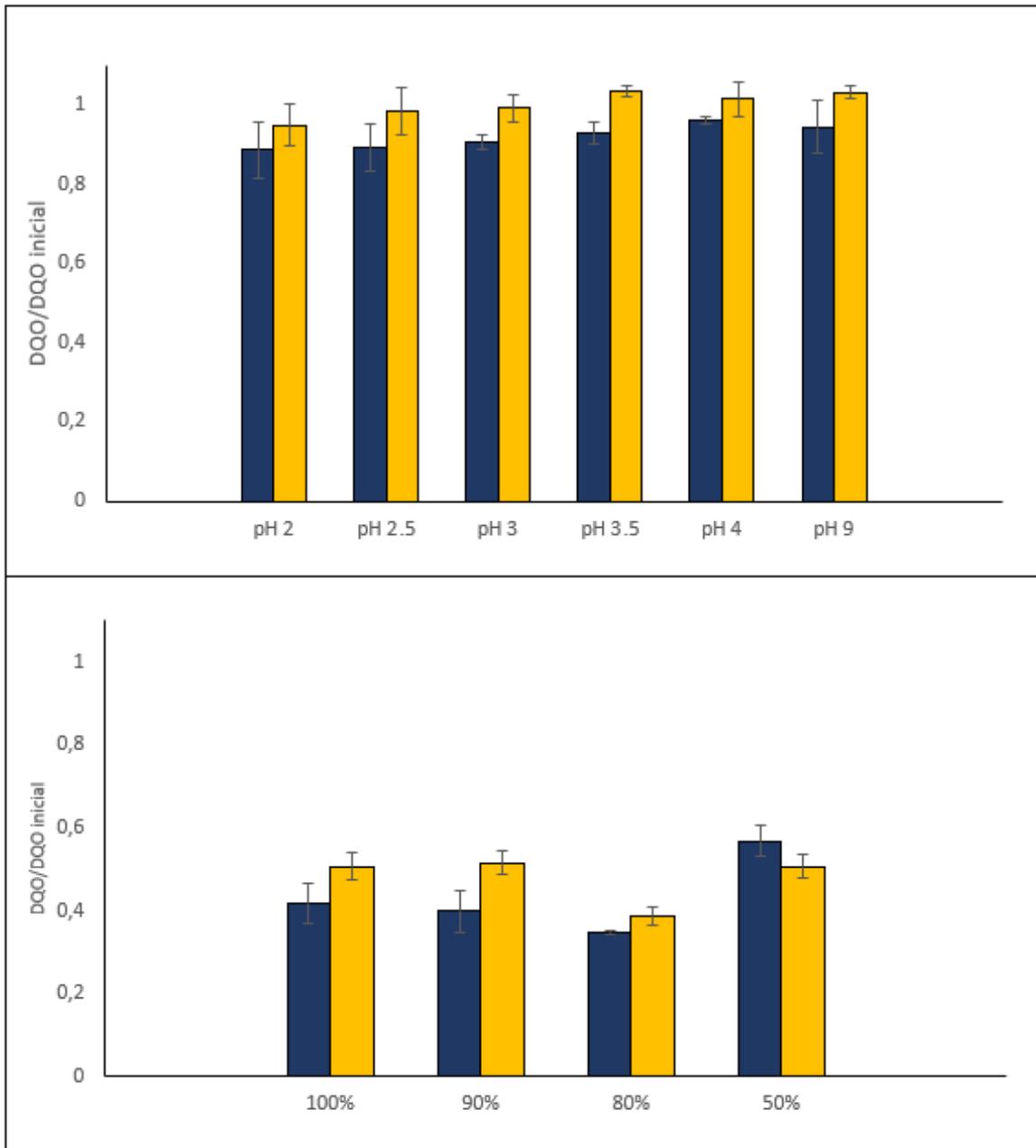


Figura 24. Relación DQO/DQO inicial, siendo la DQO inicial el valor previo a la retención. En azul (●), hidrolizado por OH. En amarillo (●), hidrolizado por HT. Gráfico superior: precipitación con pH. Gráfico inferior: precipitación con Sulfato de Amonio. En todos los casos 160 °C, 60 bar.

4.2.2 Retención de proteínas con resina: IMAC

Para representar la retención de proteínas en la resina, se realizaron gráficos donde se representa la relación de las concentraciones de proteínas, carbohidratos y DQO, C_f/C_i , frente a la cantidad de resina utilizada, siendo C_f la concentración después de la interacción con la resina y C_i la concentración antes de la interacción (Figura 25).

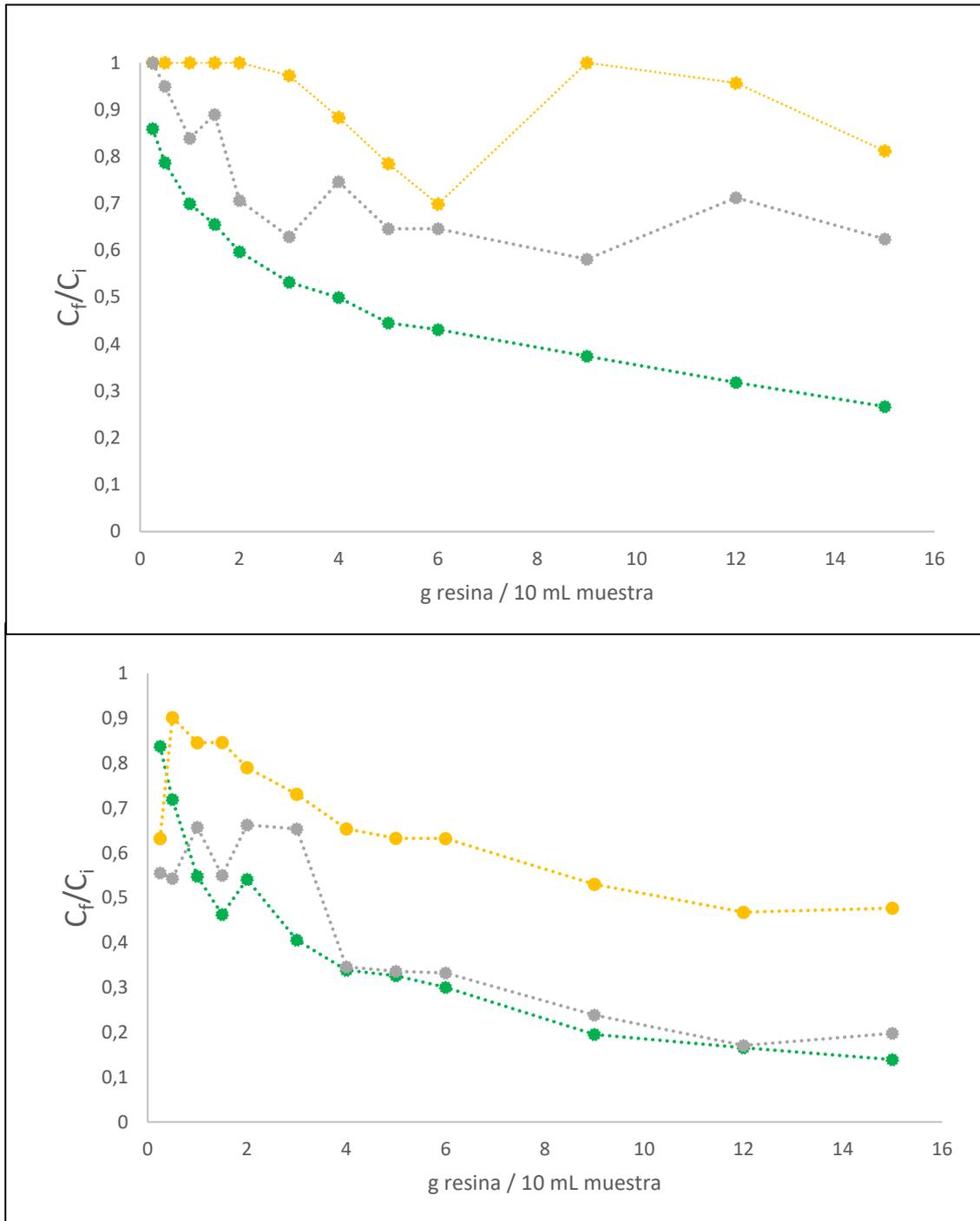


Figura 25. Representación de la relación C_f/C_i frente a gramos de resina. En verde (●), proteínas. En amarillo (●), carbohidratos. En gris (●), DQO. C_f : concentración tras la interacción con la resina. C_i : concentración antes de la interacción con la resina. Arriba, OH Abajo, HT. En todos los casos 160 °C, 60 bar.

En la Tabla 3 se puede observar como a medida que se aumentó la cantidad de resina utilizada, la relación Cf/Ci fue disminuyendo para los tres parámetros. Esto era lo esperado, ya que cuanto más resina, más cantidad de proteínas y otras sustancias será capaz de retener, disminuyendo así la DQO. Esta tendencia se observó tanto en las proteínas de la OH como en las de HT. Sin embargo, la cantidad máxima de resina utilizada (15 gramos) consiguió una mayor retención en HT que en OH. Esto podría suponer que las proteínas generadas en HT, por alguna razón – bien por su tamaño, bien por su composición – son más susceptibles a la retención que las proteínas generadas en OH debido a una menor degradación por reacciones de oxidación. Por otra parte, se debe tener en cuenta que también se retuvieron más carbohidratos en la HT, lo que podría ser por el mismo motivo (carbohidratos menos degradados en HT).

En la Tabla 3 se muestran se muestran los valores de recuperación y selectividad de proteínas de la IMAC para cada concentración de resina utilizada. Se observaron valores de recuperación medios como predominantes para la OH, siendo por encima del 50% a partir de 4 gramos de resina. Además, la selectividad para proteínas fue en todos los casos muy alta. Por otra parte, la HT obtuvo recuperaciones superiores al 50% a partir de 1,5 g de resina, sin embargo, valores de selectividad por debajo de 1 en todos los casos a excepción de los 0,25 g de resina con valores intermedios (es decir, no selectivo).

Tabla 3. Cuadro resumen de recuperación y selectividad de proteínas de cada cantidad de resina utilizada para 10 mL de hidrolizado soluble en IMAC.

	Recuperación*		Selectividad (α)**	
	OH	HT	OH	HT
0,25 g resina	14,10%	16,23%	∞	1,19
0,5 g resina	21,29%	28,09%	∞	0,38
1 g resina	30,07%	43,07%	∞	0,12
1.5 g resina	34,49%	53,77%	∞	0,02
2 g resina	40,30%	57,23%	∞	0,14
3 g resina	46,81%	65,28%	∞	0,08
4 g resina	50,06%	66,70%	1,68	0,08
5 g resina	55,48%	68,88%	1,93	0,12
6 g resina	56,90%	71,03%	2,55	0,03
9 g resina	62,61%	75,14%	∞	0,15
12 g resina	68,22%	77,78%	10,51	0,02
15 g resina	73,35%	78,26%	2,87	0,03

*Recuperación de proteínas: azul (<25%), amarillo (25-70%) o verde (>70%).

**Selectividad: verde (se retienen mayoritariamente proteínas, $\alpha > 1,3$), azul (se retienen mayoritariamente carbohidratos, $\alpha < 0,7$) o amarillo (se retienen proteínas y carbohidratos por igual, $0,7 > \alpha > 1,3$).

Se ha descrito que la IMAC es una buena técnica para detectar y/o cuantificar polisacáridos fosforilados y glicoconjugados (carbohidratos unidos a otros grupos como proteínas o lípidos) (Bosques *et al.*, 2010). Es posible que, al darse menos degradación de estos polisacáridos en HT, estos interaccionen con más probabilidad en la resina, lo que aumentaría su retención, disminuyendo la selectividad para muestras de HT. Todo lo contrario, en OH, si se da una menor cantidad de polisacáridos que puedan ser susceptibles a la interacción con la resina, la selectividad sería mayor para proteínas en dicho caso.

En resumen, observando los valores de esta tabla, se obtienen los mejores resultados empleando 15 gramos/10 mL para el hidrolizado por OH, en lo que respecta a recuperación y selectividad buenas (por encima del 75% y 1,3, respectivamente).

Por otra parte, también se realizaron gráficas para la representación las isothermas de adsorción, para determinar la capacidad de adsorción (q) de las proteínas a la resina. Estos resultados se muestran en la Figura 26. No se llegó a alcanzar la saturación en ninguno de los puntos experimentados. Por tanto, tan solo se observó el comportamiento exponencial inicial y se requerirían de más puntos para extraer $q_{\text{máx}}$ para ambos hidrolizados, concretamente, puntos en los que se utilizase menos concentración de resina de las utilizadas en este experimento.

En la OH, se observó un comportamiento más exponencial, lo que se relacionaría con la primera parte de la curva de saturación. Sin embargo, con la HT se observó una curva más atenuada con una pendiente menos acusada e indicios de llegada al punto de saturación. Otra diferencia notoria fue la distribución de los puntos. La curva de saturación para la OH presentó unos puntos mucho menos dispersos que formaban una curva con una forma exponencial muy clara a simple vista. Sin embargo, para la curva de HT no pareció observarse una distribución continua de los puntos. Esto podría deberse a la presencia de una mezcla de proteínas mucho más heterogénea en los productos resultantes de la HT, ya que, al no producirse oxidación, las proteínas resultantes serían menos similares. Ya se ha comentado que las curvas de adsorción serán distintas dependiendo del tipo de proteínas (véase en Consideraciones teóricas y experimentales: Métodos de separación). Nuestra hipótesis es que, en una muestra como la extraída en una OH donde las proteínas presentarán tamaños más similares entre sí (predominando fragmentos más pequeños) (García *et al.*, 2017; Urrea *et al.*, 2018), las curvas de adsorción para las proteínas presentes serán más parecidas. Todo lo contrario, para la HT,

cuya mezcla de proteínas será más heterogénea y diversa y, por tanto, podría dar lugar a una curva de adsorción más difusa (por la combinación de distintas curvas de adsorción).

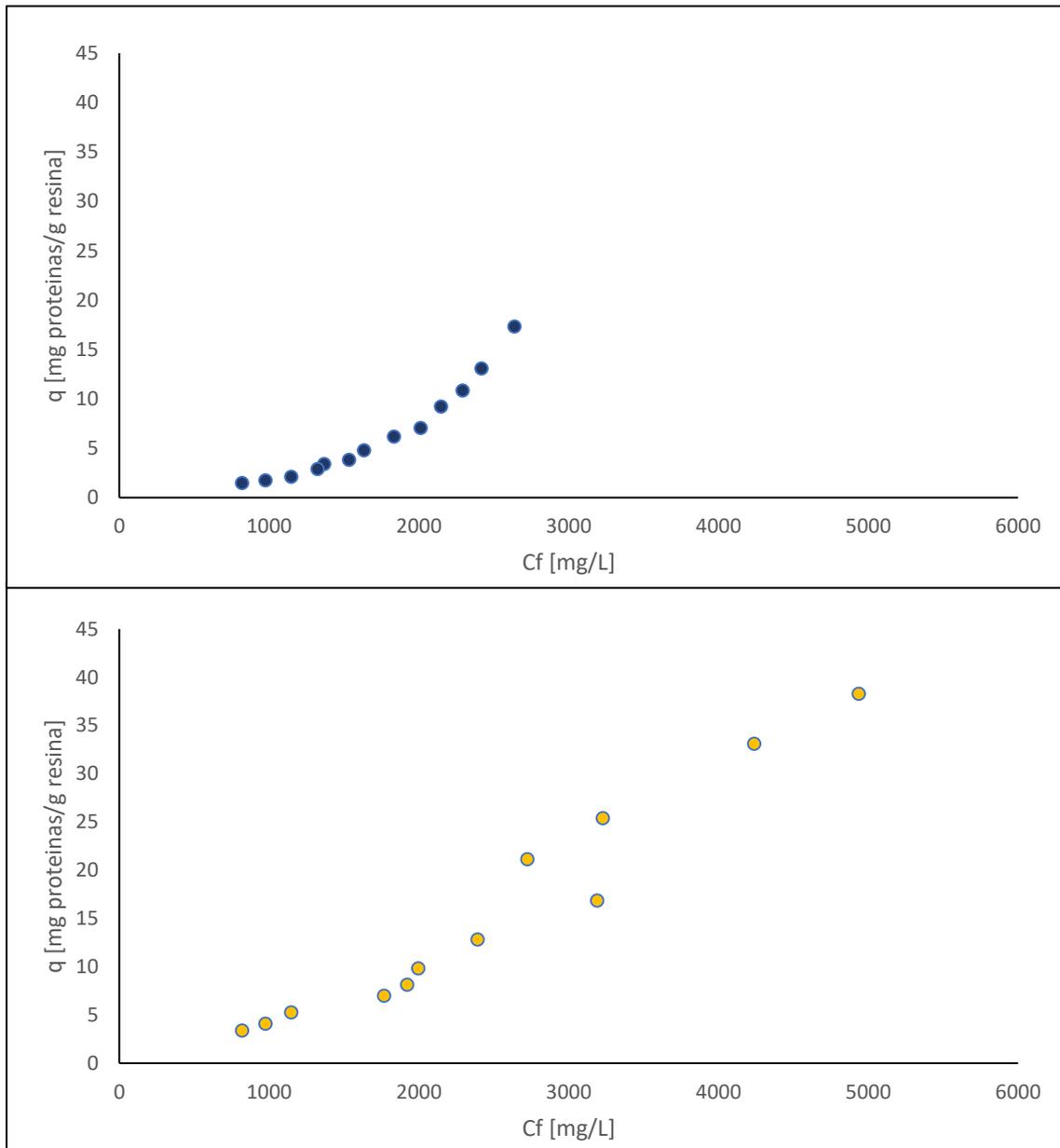


Figura 26. Representación de las curvas de adsorción de las proteínas a la resina en OH (●) y HT (●). Eje x: concentración de proteínas. Eje y: capacidad de adsorción (q).

5 Conclusiones

- ❖ La oxidación y la hidrólisis son tratamientos hidrotermales capaces de producir una liberación de componentes intracelulares de levaduras de cerveza. La caracterización de los hidrolizados permite la determinación del tiempo óptimo (80 min) para el que se da la concentración máxima de las biomoléculas de interés.
- ❖ Los componentes intracelulares liberados pueden ser separados por diferentes métodos, cuya selectividad dependerá tanto del tratamiento hidrotermal como del propio método empleado.
- ❖ De los métodos de precipitación empleados (pH y sulfato de amonio), el único capaz de obtener una precipitación alta de proteínas con una buena selectividad es el método de variación de pH a 2,5 y 3 para la OH. Para la HT, pareció ser más adecuado el sulfato de amonio en concentraciones al 80 y 50% de su valor de saturación en agua.
- ❖ El método de retención por IMAC permite retener proteínas de forma mucho más selectiva y eficaz que los métodos de precipitación, siendo mucho más selectivo para las proteínas de la OH. La capacidad de adsorción máxima ($q_{\text{máx}}$), es un parámetro interesante, pero se requieren más ensayos de adsorción para establecer el punto de saturación de la resina.
- ❖ Los métodos analíticos de detección de proteínas y carbohidratos permiten determinar su concentración, aunque métodos analíticos más específicos serían necesarios para saber diferenciar glicoproteínas de carbohidratos.

6 Referencias

Amaral, P. F., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., y Coutinho, J. A.. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. *Biosurfactants*. Pág. 236-249. (2010).

American Public Health Association, A. P. H. A.. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Vol. 21. Washington, DC: American public health association (1995).

Arévalo, E., Rendueles, M., Fernández, A., y Díaz, M.. Equilibrium and simulation of the operation for the adsorption of albumin proteins in an iminodiacetic-Cu bounded ion exchange resin (IMAC). *Separation and purification technology*. Vol. 18, N° 3. Pág 217-225. (2000).

Bamforth, C. W.. Beer: an ancient yet modern biotechnology. *The Chemical Educator*, Vol. 5(3). Pág. 102-112. (2000).

Bhargava, S. K., Tardio, J., Prasad, J., Föger, K., Akolekar, D. B., & Grocott, S. C.. Wet oxidation and catalytic wet oxidation. *Industrial y engineering chemistry research*. Vol. 45(4). Pág. 1221-1258. (2006).

Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., ... y Schäfer, F.. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in enzymology*. Academic Press. Vol. 463. Pág. 439-473. (2009).

Bosques, C. J., Thiruneelakantapillai, L., y Parsons, I. C.. Analysis of phosphorylated glycans, glycopeptides or glycoproteins by imac. *U.S. Patent Application*. N° 12. Pág. 595-945. (2010).

Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., y Rajamohamed, S. H.. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*. Vol. 43(2). Pág. 537-546. (2010).

Debellefontaine, H., y Foussard, J. N.. Wet air oxidation for the treatment of industrial wastes. Chemical aspects, reactor design and industrial applications in Europe. *Waste management*. Vol. 20(1). Pág. 15-25. (2000).

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., y Smith, F.. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. Vol. 28(3). Pág. 350-356. (1956).
- Duong-Ly, K. C., y Gabelli, S. B.. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in enzymology*. Academic Press. Vol. 541. Pág. 85-94. (2014).
- Englard, S., y Seifter, S.. Precipitation techniques. *Methods in enzymology*. Academic Press. Vol. 182. Capítulo 22. Pág. 285-300. (1990).
- Ersson, B., Rydén, L., y Janson, J. C.. Introduction to protein purification. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. Pág. 1-22. (2011).
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., y Tavarela, J. G.. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in food science y technology*. Vol. 21(2). Pág. 77-84. (2010).
- Gaberc-Porekar, V., y Menart, V.. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*. Vol. 49(1-3). Pág. 335-360. (2001).
- García, M., Urrea, J. L., Collado, S., Oulego, P., y Díaz, M.. Protein recovery from solubilized sludge by hydrothermal treatments. *Waste Management*. Vol. 67. Pág. 278-287. (2017).
- Hii, K., Baroutian, S., Parthasarathy, R., Gapes, D. J., y Eshtiaghi, N.. A review of wet air oxidation and thermal hydrolysis technologies in sludge treatment. *Bioresource technology*. Vol. 155. Pág. 289-299. (2014).
- Jain, P., Sun, L., Dai, J., Baker, G. L., y Bruening, M. L.. High-capacity purification of his-tagged proteins by affinity membranes containing functionalized polymer brushes. *Biomacromolecules*. Vol. 8(10). Pág. 3102-3107. (2007).
- Karanfil, T., Schlautman, M. A., & Erdogan, I.. Survey of DOC and UV measurement practices with implications for SUVA determination. *Journal-American Water Works Association*. Vol. 94(12). Pág. 68-80. (2002).
- Kolaczowski, S. T., Plucinski, P., Beltran, F. J., Rivas, F. J., y McLurgh, D. B.. Wet air oxidation: a review of process technologies and aspects in reactor design. *Chemical Engineering Journal*. Vol. 73(2). Pág. 143-160. (1999).

- Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V., & Yadavilli, K. S.. Invertase and its applications—a brief review. *Journal of pharmacy research*. Vol. 7(9). Pág. 792-797. (2013).
- Lamoolphak, W., Goto, M., Sasaki, M., Suphantharika, M., Muangnapoh, C., Prommuag, C., y Shotipruk, A.. Hydrothermal decomposition of yeast cells for production of proteins and amino acids. *Journal of hazardous materials*. Vol. 137(3). Pág. 1643-1648. (2006).
- Lazo, P. S., Ochoa, A. G., y Gascon, S.. α -Galactosidase (melibiase) from *Saccharomyces carlsbergensis*: Structural and kinetic properties. *Archives of biochemistry and biophysics*. Vol. 191(1). Pág. 316-324. (1978).
- Le Dévédec, F., Bazinet, L., Furtos, A., Venne, K., Brunet, S., y Mateescu, M. A.. Separation of chitosan oligomers by immobilized metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1194(2). Pág. 165-171. (2008).
- Lees, R.. *Sugar confectionery and chocolate manufacture*. Springer Science & Business Media. (2012).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J.. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. Vol. 193. Pág. 265-2. (1951).
- Luck, F.. Wet air oxidation: past, present and future. *Catalysis today*. Vol. 53(1). Pág. 81-91. (1999).
- Maddox, I. S., y Hough, J. S.. Proteolytic enzymes of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochemical Journal*. Vol. 117(5). Pág. 843-852. (1970).
- Martínez, P., Pabón, M. L., Gómez, D. A., y Albarracín, S. L.. Purificación y determinación de carbohidratos en la vicilina de *Canavalia ensiformis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. Vol. 40(1). (2011).
- Moran, C. A.. Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan. *Nutritional biotechnology in the feed and food industries*. Pág. 283-296. (2004).
- Muñoz De Las Heras, A.. *Application of Synthetic Biology for Biopolymer Production using *Saccharomyces cerevisiae** (Doctoral dissertation, Lund University). (2017).

- Muroi, T., Oguri, Y., y Ishida, M.. Method of recovering proteins from microbial cells. *U.S. Patent N° 3*. Pág. 725-1075. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. (1973).
- Niamke, S., Kouame, L. P., Kouadio, J. P., Koffi, D., Faulet, B. M., y Dabonne, S.. Effect of some chemicals on the accuracy of protein estimation by the Lowry method. *Biokemistri*. Vol. 17(2). Pág. 73-81. (2005).
- Rasheed, F. Production of sustainable bioplastic materials from wheat gluten proteins. *Introductory paper at the Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science*. N° 2011: 4. (2011).
- Ramírez-Paredes, F. I., Manzano-Muñoz, T., Garcia-Prieto, J. C., Zhadan, G. G., Shnyrov, V. L., Kennedy, J. F., y Roig, M. G.. Biosorption of heavy metals from acid mine drainage onto biopolymers (chitin and $\alpha(1,3)\beta$ -D-glucan) from industrial biowaste exhausted brewer's yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* L.). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Vol. 16(6). Pág. 1262-1272. (2011).
- Scopes, R. K. *Protein purification: principles and practice*. Springer Science y Business Media. (2013).
- Stewart, G.. *Saccharomyces* species in the production of beer. *Beverages*. Vol. 2(4). Pág. 34. (2016).
- Suarez-Iglesias, O., Urrea, J. L., Oulego, P., Collado, S., y Diaz, M.. Valuable compounds from sewage sludge by thermal hydrolysis and wet oxidation. A review. *Science of the Total Environment*. Vol. 584. Pág. 921-934. (2017).
- Taylor, M. J., y Richardson, T.. Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. *Advances in applied microbiology*. Vol. 25. Pág. 7-35. Academic Press. (1979).
- Türker, M.. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. *Advances in Science and Industrial Production of Baker's Yeast, Istanbul*. Pág. 1-26. (2014).
- Urrea, J. L., García, M., Collado, S., Oulego, P., y Díaz, M.. Sludge hydrothermal treatments. Oxidising atmosphere effects on biopolymers and physical properties. *Journal of environmental management*. Vol. 206. Pág. 284-290. (2018).

Zhang, B., Carlson, R., y Srienc, F.. Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 72(1). Pág. 536-543. (2006).