

ACONDICIONAMIENTO TERMOQUÍMICO ÁCIDO DE BAGAZO CERVECERO: SEVERIDAD, HEMICELULOSAS Y DIGESTIBILIDAD ENZIMÁTICA

R.J. Leonardi¹, M. Gil Rolón², T. Llano³, A. Coz³, R.N. Comelli^{2,4}

¹ Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas (FICH), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina (rodrigoleonardi8950@gmail.com).

² Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas (FICH), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina.

³ Departamento de Química e Ingeniería de Procesos y Recursos, Universidad de Cantabria, Santander, España.

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina.

El bagazo cervecero es una biomasa lignocelulósica residual con potencial de valorización. Este trabajo evaluó su pretratamiento termoquímico ácido mediante un diseño experimental y ensayos cinéticos, integrando temperatura, tiempo y concentración de H_2SO_4 en parámetros de severidad. Se analizaron la solubilización de hemicelulosas y la digestibilidad enzimática de la celulosa, identificando condiciones que favorecen la apertura estructural del material.

Palabras clave: acondicionamiento termoquímico; biomasa lignocelulósica; bagazo de cervecería gastado; hidrólisis enzimática; severidad

INTRODUCCIÓN

El bagazo cervecero, conocido internacionalmente como *brewery spent grain* (BSG), es el principal residuo sólido generado durante la producción de cerveza. Este material se origina luego de la maceración y filtración del mosto, y está constituido principalmente por fracciones fibrosas no solubilizadas del grano. Debido al crecimiento sostenido de la industria cervecera y al volumen de residuo generado, el BSG representa una biomasa residual de interés para el desarrollo de estrategias de valorización en el marco de la bioeconomía circular (Llano et al., 2024).

Desde el punto de vista composicional, el BSG presenta una matriz lignocelulósica formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (Comelli et al., 2025). La estrecha asociación entre estos componentes confiere recalcitrancia estructural al material y limita la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas a la fracción celulósica. Por este motivo, el aprovechamiento biotecnológico del BSG puede beneficiarse de etapas de acondicionamiento capaces de modificar parcialmente su estructura, favorecer la remoción de hemicelulosas y aumentar la susceptibilidad del sólido residual a la hidrólisis enzimática.

Entre las estrategias disponibles, el pretratamiento termoquímico con ácido diluido constituye una alternativa ampliamente considerada para la desestructuración de materiales lignocelulósicos (Gil Rolón et al., 2023). En particular, el uso de ácido sulfúrico permite promover la hidrólisis de la fracción hemicelulósica y la liberación de azúcares solubles, al mismo tiempo que puede mejorar la accesibilidad de la celulosa remanente. Sin embargo, la respuesta del sistema depende de la combinación entre temperatura, tiempo de residencia y concentración de ácido sulfúrico, por lo que resulta necesario emplear enfoques integradores que permitan interpretar el avance del proceso.

En este contexto, los parámetros de severidad térmica y termoquímica permiten relacionar las condiciones operativas del pretratamiento con las respuestas observadas.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el pretratamiento termoquímico ácido de bagazo cervecero mediante un enfoque basado en severidad, integrando el efecto de la temperatura, el tiempo y la concentración de H_2SO_4 sobre la solubilización de hemicelulosas y la digestibilidad enzimática de la celulosa. Para ello, se empleó un diseño experimental

complementado con ensayos cinéticos, orientado a interpretar la relación entre las condiciones de operación, la apertura estructural de la matriz lignocelulósica y la respuesta enzimática del material pretratado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de partida y caracterización composicional

El BSG utilizado fue provisto por una cervecería industrial de gran envergadura ubicada en la ciudad de Santa Fe, Argentina. El material fue lavado con agua para remover almidón residual visible, y secado en estufa a 50 °C hasta alcanzar una humedad aproximada del 10 %. Posteriormente, fue almacenado en frascos herméticos hasta su utilización. La composición estructural del material, incluyendo glucanos, xilano y arabinano, fue determinada mediante hidrólisis ácida en dos etapas con H₂SO₄. La hemicelulosa total fue calculada como la suma de xilano y arabinano, empleando factores estequiométricos para convertir los azúcares monoméricos en sus polímeros de origen.

Pretratamiento termoquímico ácido

El pretratamiento termoquímico ácido fue evaluado mediante un diseño compuesto central, considerando como factores la temperatura (T), el tiempo de residencia (t) y la concentración de ácido sulfúrico ([H₂SO₄]). Se realizaron 17 tratamientos por duplicado, en los rangos de 93–127 °C, 13–97 min y 0,82–4,18 % m/v de H₂SO₄. Los ensayos se llevaron a cabo en tubos de borosilicato con tapa roscada, utilizando un volumen de reacción de 7 mL y una carga de BSG seco de 133 g/L. Finalizado cada tratamiento, la reacción fue detenida mediante enfriamiento en baño de agua fría y se recuperó una alícuota de la fracción líquida para el análisis de productos solubles.

Ensayos cinéticos

Con el fin de complementar el diseño experimental y describir la dinámica de liberación de productos solubles, se realizaron ensayos cinéticos empleando la misma metodología experimental. Las condiciones evaluadas fueron 120 °C y 3,5 % m/v de H₂SO₄; 120 °C y 1,5 % m/v de H₂SO₄; 110 °C y 2,5 % m/v de H₂SO₄; y 100 °C y 1,5 % m/v de H₂SO₄, con una duración máxima de 80 min.

Hidrólisis enzimática y criterios de desempeño

Luego del pretratamiento, las suspensiones fueron neutralizadas hasta pH 5,50 ± 0,50 mediante adición de NaOH 10 N. La hidrólisis enzimática del material pretratado se realizó con el preparado comercial Cellic CTec2® a una carga aproximada de 13 FPU/g de celulosa, a 50 °C, bajo agitación orbital durante 24 h.

Como criterios de desempeño se calcularon la eficiencia de solubilización de hemicelulosas (HS, %) y la eficiencia de hidrólisis enzimática de celulosa (HE, %), a partir de las concentraciones de xilosa, arabinosa y glucosa liberadas.

Determinaciones analíticas y análisis de datos

Las pentosas totales fueron estimadas mediante un método colorimétrico basado en floroglucinol, mientras que la glucosa fue determinada mediante un kit enzimático colorimétrico. Adicionalmente, las concentraciones de glucosa, xilosa, arabinosa, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y furfural fueron determinadas por cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción (HPLC-RID; Thermo UltiMate 3000, RefractoMax 520), empleando una columna Shodex SUGAR SH1011 y H₂SO₄ 5 mM como fase móvil. El análisis de los resultados del diseño experimental se realizó mediante herramientas estadísticas y de modelado (Statgraphics Centurion XV v15.2.06, MATLAB R2019a), complementadas con el cálculo de parámetros de severidad térmica y termoquímica para interpretar el efecto combinado de las variables operativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química del bagazo cervecero

La caracterización composicional permitió confirmar la naturaleza lignocelulósica del BSG utilizado. El material estabilizado presentó un contenido de humedad de 10,41 ± 1,56 %. En base seca, la biomasa estuvo compuesta por 16,28 ± 0,80 % de glucano, 14,79 ± 0,72 % de xilano, y 7,19 ± 0,53 % de arabinano.

El contenido total de hemicelulosa, calculado como la suma de xilano y arabinano, fue de 21,98 ± 0,89 %.

No se detectó glucosa luego del tratamiento con enzimas hidrolíticas de almidón ni en la fracción líquida obtenida durante los ensayos de pretratamiento ácido, por lo que el glucano determinado fue asignado principalmente a celulosa. Este resultado indica que, bajo las condiciones de estabilización y preparación empleadas, el aporte de polímeros glucosídicos no celulósicos fue despreciable.

Los valores obtenidos se encontraron dentro de los rangos reportados para BSG, aunque próximos al límite inferior para el contenido de celulosa y en un rango intermedio para la fracción hemicelulósica. Estas diferencias son esperables, ya que la composición del BSG puede variar en función de la variedad y condiciones de cultivo de la cebada, el proceso de malteado, el tipo de cerveza producida, las condiciones de maceración, las operaciones de filtración y lavado, y las etapas posteriores de estabilización del residuo.

Efecto del pretratamiento ácido sobre la digestibilidad enzimática

La eficiencia de hidrólisis enzimática de la celulosa (HE) fue evaluada a las 24 h de sacarificación con el fin de analizar el efecto del pretratamiento ácido sobre la accesibilidad de la fracción celulósica del BSG. En

el rango experimental estudiado, la HE varió entre 38,11 y 69,78 % (Figura 1), indicando una influencia clara de las condiciones de acondicionamiento termoquímico. El análisis estadístico indicó que la temperatura fue el factor de mayor influencia sobre la HE, seguida por el tiempo de residencia y, en menor medida, por la concentración de H_2SO_4 .

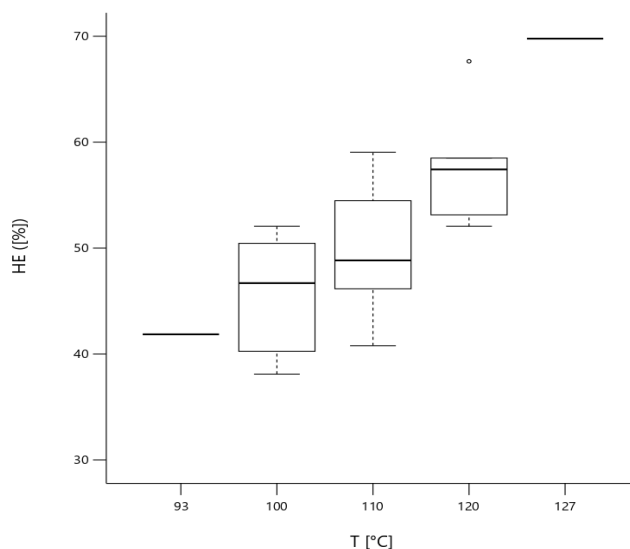


Figura 1. Diagrama de caja que muestra el efecto de la temperatura sobre HE.

Limitaciones del diseño experimental para describir la solubilización de hemicelulosas

A diferencia de lo observado para la hidrólisis enzimática de la celulosa, la solubilización de hemicelulosas (HS) no pudo ser descrita adecuadamente mediante un modelo matemático ajustado a partir del diseño experimental. Esto se atribuyó a la rápida liberación de pentosas bajo determinadas condiciones operativas, alcanzándose valores elevados de HS en varios tratamientos dentro del intervalo evaluado. Por este motivo, el análisis fue complementado con ensayos cinéticos orientados a describir la evolución temporal de los principales productos solubles de la fracción hemicelulósica.

Análisis integrado mediante severidad

Se utilizaron parámetros de severidad como herramientas integradoras para vincular las condiciones operativas con las respuestas fisicoquímicas y enzimáticas observadas.

El primer parámetro considerado fue el factor de severidad térmica clásico simplificado, $\log R_0$, que integra los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia:

$$\log R_0 = \log \left[te^{\left(\frac{T(t) - T_{Ref}}{w} \right)} \right] \quad (1)$$

donde T corresponde a la temperatura de tratamiento, T_{Ref} a una temperatura de referencia y w a un parámetro empírico asociado a la sensibilidad térmica del proceso.

Dado que los resultados del diseño experimental mostraron que la temperatura fue el factor dominante sobre la eficiencia de hidrólisis enzimática, seguida por el tiempo y luego por la concentración de H_2SO_4 , se propuso además un parámetro de severidad combinado térmico-químico, R_0^* , que incorpora la contribución de la acidez del medio:

$$R_0^* = \log R_0 - pH \quad (2)$$

El uso del parámetro combinado R_0^* permitió interpretar mejor la variabilidad experimental que el uso exclusivo de $\log R_0$. La Figura 2 muestra la relación entre la solubilización de hemicelulosas (HS) y la eficiencia de hidrólisis enzimática de celulosa (HE) en función del parámetro R_0^* . Se observa que la HS alcanzó valores elevados a severidades intermedias. En cambio, la HE continuó aumentando progresivamente a lo largo de todo el rango de severidad estudiado. Este comportamiento sugiere que la solubilización de la fracción hemicelulósica ocurre principalmente a severidades intermedias, mientras que la mejora de la respuesta enzimática del sólido continúa a severidades mayores.

La ausencia de glucosa y HMF en la fracción líquida luego del pretratamiento ácido indica que, dentro del rango experimental evaluado, la celulosa no sufrió una solubilización o degradación significativa durante la etapa termoquímica. Por lo tanto, el aumento de HE puede atribuirse principalmente a modificaciones estructurales del sólido pretratado, asociadas a la

remoción de hemicelulosas y a la mayor exposición de la fracción celulósica. Por su parte, las concentraciones de furfural fueron bajas en las condiciones evaluadas.

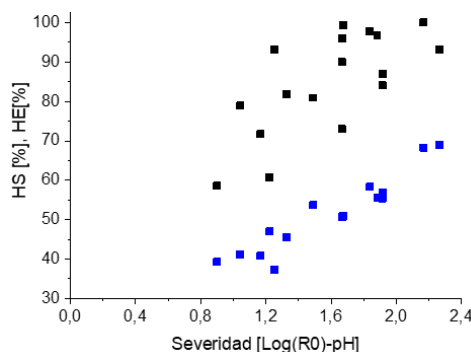


Figura 2. Relación entre la solubilización de hemicelulosas (HS, □ negro) y la eficiencia de hidrólisis enzimática de celulosa (HE, □ azul) en función del parámetro de severidad combinado R_0^* .

Dinámica de solubilización de hemicelulosas

Los ensayos cinéticos permitieron analizar la evolución temporal de la liberación de productos asociados a la hidrólisis de la fracción hemicelulósica del BSG. Las condiciones evaluadas fueron 120 °C y 3,5 % m/v de H_2SO_4 ; 120 °C y 1,5 % m/v de H_2SO_4 ; 110 °C y 2,5 % m/v de H_2SO_4 ; y 100 °C y 1,5 % m/v de H_2SO_4 , con una duración máxima de 80 min. La Figura 3 muestra la evolución de pentosas totales para estas condiciones, permitiendo comparar el efecto combinado de la temperatura y la concentración de ácido sobre la velocidad de solubilización.

La liberación de pentosas totales presentó una marcada dependencia con las condiciones de pretratamiento. A 120 °C y 3,5 % m/v de H_2SO_4 , la concentración máxima de pentosas, cercana a 27 g/L, se alcanzó en aproximadamente 30 min. Cuando la concentración de ácido se redujo a 1,5 % m/v

manteniendo la misma temperatura, se observaron valores finales similares, aunque con una cinética más lenta, requiriéndose entre 30 y 40 min para aproximarse al máximo. En cambio, a 100 °C y 1,5 % m/v de H_2SO_4 , la liberación de pentosas fue más gradual y no alcanzó la saturación completa dentro de los 80 min evaluados.

La condición intermedia de 110 °C y 2,5 % m/v de H_2SO_4 mostró una dinámica situada entre las condiciones de 120 °C y 1,5 % m/v de H_2SO_4 , y 100 °C y 1,5 % m/v de H_2SO_4 . Este resultado evidencia que diferentes combinaciones de temperatura y acidez pueden conducir a trayectorias cinéticas distintas, aun cuando las recuperaciones finales de hemicelulosa puedan resultar similares. Desde el punto de vista del diseño de proceso, esta información permite comparar condiciones que difieren no solo en el rendimiento final, sino también en el tiempo requerido para alcanzar altos grados de solubilización.

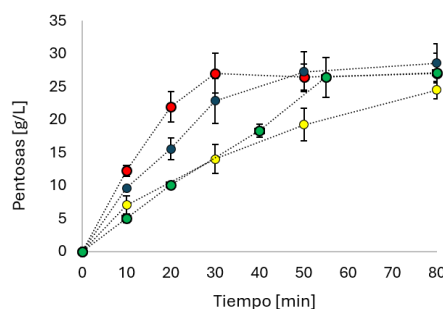


Figura 3. Dinámica de solubilización de hemicelulosas durante el pretratamiento ácido de BSG. a) Evolución temporal de pentosas totales para las condiciones cinéticas evaluadas. Referencias: a) círculo rojo ($T = 120$ °C, $[H_2SO_4] = 3,5$ % m/v), círculo azul ($T = 120$ °C, $[H_2SO_4] = 1,5$ % m/v), círculo verde ($T = 110$ °C, $[H_2SO_4] = 2,5$ % m/v) y círculo amarillo ($T = 100$ °C, $[H_2SO_4] = 1,5$ % m/v).

En conjunto, los resultados obtenidos permiten proponer una interpretación integrada del pretratamiento ácido del BSG, donde el incremento de severidad favorece la solubilización de hemicelulosas, la liberación de pentosas, y cambios en el sólido pretratado que favorecen su posterior respuesta enzimática. Este enfoque resulta de interés no solo para la selección de condiciones operativas, sino también como base para el desarrollo de modelos dinámicos capaces de describir la evolución temporal de los principales componentes solubles y la respuesta del sólido pretratado. Asimismo, la obtención de hidrolizados con baja generación de productos de degradación destaca el interés del BSG como materia prima para procesos biotecnológicos orientados a la obtención de metabolitos y compuestos de valor agregado.

CONCLUSIONES

El pretratamiento termoquímico ácido permitió modificar la respuesta del bagazo cervecero frente a la hidrólisis enzimática, observándose una influencia clara de las variables operativas evaluadas. La temperatura fue el factor de mayor impacto sobre la digestibilidad enzimática de la celulosa, seguida por el tiempo de residencia y, en menor medida, por la concentración de H_2SO_4 .

El análisis mediante parámetros de severidad permitió integrar el efecto combinado de temperatura, tiempo y acidez sobre las respuestas del proceso. En particular, el parámetro combinado R_0^* resultó útil para interpretar de manera conjunta la solubilización de hemicelulosas y la eficiencia de hidrólisis enzimática, aportando un criterio comparativo entre condiciones operativas diferentes.

En el rango experimental evaluado, se alcanzaron altos grados de solubilización de hemicelulosas y una mejora progresiva de la digestibilidad enzimática del sólido pretratado. Estos resultados indican que el acondicionamiento ácido del BSG constituye una estrategia de interés para favorecer la apertura estructural de esta biomasa residual y aportar información útil para el diseño de procesos de valorización biotecnológica.

AGRADECIMENTOS

This work was supported by the Universidad Nacional del Litoral (UNL) through the CAI + D Program (grant number 50620190100054LI), by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), and by the CELISE (<https://celise.unican.es/>) project from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (Marie Skłodowska Curie grant agreement No 101007733).

REFERENCIAS

COMELLI, R. N.; LEONARDI, R. J.; COZ, A. CELISE: un proyecto para la valorización de biomasa a base de celulosa para nuevos procesos y productos. In: ENCuentro DE REDES DE BIOTECNOLOGÍA DE ARGENTINA REDBIO SAPROBIO – REDTEZ, 1., 2025, Argentina. Actas [...]. Argentina: REDBIO SAPROBIO – REDTEZ, 2025. Póster. ISBN 978-950-766-267-6.

GIL ROLÓN, M.; LEONARDI, R. J.; BOLZICO, B. C.; SELUY, L. G.; BENZZO, M. T.; COMELLI, R. N. Multi-response optimization of thermochemical pretreatment of soybean hulls for 2G-bioethanol production. *Fermentation*, v. 9, n. 5, art. 454, 2023. DOI: 10.3390/fermentation9050454.

LLANO, T.; GARCÍA, P.; COMELLI, R. N.; LEONARDI, R. J.; GIL ROLÓN, M.; COZ FERNÁNDEZ, A. Bioethanol factory based on brewery spent grains: kinetics of diluted acid hydrolysis and plant simulation. In: IBEROAMERICAN CONGRESS ON BIOREFINERIES, 5., 2024, Jaén, España. Anais [...]. Jaén: 5-CIAB, 2024. Apresentação oral.