



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO
LACTOBIÓNICO”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

MARÍA GONZÁLEZ RIVAS

JULIO, 2013



Master en Biotecnología Alimentaria

Universidad de Oviedo

C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España

Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **María González Rivas** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7ª promoción curso 2012-2013.

Oviedo, 15 de Julio de 2013

Dr. Manuel Rendueles

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es fruto del apoyo y colaboración prestado por mi director de proyecto, Manuel Rendueles de la Vega. Así, tengo a bien manifestar mi más sincero agradecimiento a quienes considero mis compañeros de laboratorio del Departamento de Ingeniería Química, especialmente a Amanda, Ana, Ismael y Saúl, por su gran paciencia ante mis preguntas, y por compartir desinteresadamente sus conocimientos conmigo, y conseguir llevar a buen término la labor emprendida.

Deseo hacer una pequeña reseña, pero no por ello deja de ser importante, a mis amigas y compañeras de aventuras desde hace muchos años ya, María y Sandra.

Un especial recuerdo para mis compañeros del Máster, especialmente a Derek, Laura y Miriam, que han sido partícipes en este viaje por “les Asturies” y cómo no a mis dos gallegos favoritos (Iván y Mercedes), gracias a todos ellos me llevo la maleta llena de recuerdos. Ya que todos, han aportado su granito de arena. Asimismo una breve mención a todos los profesores que implantaron en mí el germen de la investigación, y que me mostraron el camino para descubrir el valor de nuestros recursos.

Haciendo especial hincapié, al apoyo y tolerancia incondicional de mi familia. A esas tres personitas tan importantes en mi vida sólo puedo decirles mil y una veces con la boca bien abierta gracias, gracias por estar siempre ahí. Ya que sin ellos no hubiera sido posible ninguno de los logros conseguido.

Gracias por todo

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VII
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- CONSIDERACIONES TEÓRICAS	7
2.1.- LACTOSUERO.....	8
2.1.1.- Introducción.....	8
2.1.2.- Ácido lactobiónico.....	9
2.2.- MEMBRANAS	11
2.2.1.- Introducción: breve historia.....	11
2.2.2.- ¿Qué es una membrana?: conceptos-La filtración por membranas	13
2.2.3.- Tipos de membranas	15
2.2.4.- Modo de circulación del flujo en un proceso con membranas	17
2.2.5.- Módulos de membrana	18
2.2.6.- Ventajas e inconvenientes de los procesos de separación con membranas	21
2.2.7.- Ensuciamiento de la membrana.....	21
2.2.8.- Limpieza de la membrana.....	22
2.2.9.- Aplicaciones de las membranas en la industria	22

2.3.- ELECTRODIÁLISIS	23
2.3.1.- Introducción: breve historia.....	23
2.3.2.- Conceptos	24
2.3.3.- Tipos de resinas y propiedades	26
2.3.4.- Intercambio iónico en columna	27
2.3.5.- Aplicaciones en la industria.....	29
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	30
3.1.- DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO	31
3.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS.....	34
3.2.1.- Con agua	34
3.2.2.- Con suero	34
3.3.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA LACTOSA	36
3.3.1.- Contenido proteico	36
3.3.2.- Análisis cuantitativo de lactosa	37
3.4.- ESTUDIO DE LA MEMBRANA CERÁMICA FRENTE AL FERMENTADO	38
3.5.- RESINA DE INTERCAMBIO IÓNICO	39
3.5.1.- Purificación del ácido lactobiónico con resinas de intercambio iónico.....	39
3.5.2.- Experimentación en columna	40
3.5.3.-Análisis cuantitativo del ácido lactobiónico	41

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1.- MEMBRANAS	44
4.1.1.- Caracterización de las membranas	44
4.1.1.1.- Con agua	44
4.1.1.2.- Con suero lácteo.....	46
4.1.2.- Determinación del contenido proteico y análisis cuantitativo de la lactosa	48
4.1.3.- Estudio de la membrana cerámica frente al fermentado...50	
4.2.- RESINA DE INTERCAMBIO IÓNICO	54
4.2.1.- Purificación del ácido lactobiónico por intercambio iónico.....54	
4.2.1.1.- Equilibrio de intercambio iónico	54
❖ Determinación de la relación L/S óptima.....	54
❖ Determinación de la capacidad máxima de la resina	56
❖ Isotermas de equilibrio: Langmuir y Factor constante de separación.....	59
4.2.2.- Cinética de intercambio iónico	60
4.2.3.- Operación en columna	62
4.2.3.1.- Carga.....	62
4.2.3.2.- Elución	64
4.2.4.- Acoplamiento de procesos.....	67
4.2.4.1.- Membrana cerámica.....	67
4.2.4.2.- Resinas de intercambio iónico	68
5.- CONCLUSIONES	71
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	74

RESUMEN

La industria láctea es una de las industrias alimentarias que más variedad de procesos productivos presenta, dicha diversidad genera como consecuencia grandes volúmenes de residuos con un alto poder contaminante. Un claro ejemplo de desecho obtenido en ellas, es el suero láctero, cuyo origen radica en la elaboración del queso. Este suero, debido a su contenido composicional es una excelente matriz para la bioconversión microbiana y la producción del ácido lactobiónico, compuesto muy apreciado en la actualidad debido al gran abanico de posibilidades y propiedades que posee.

En el presente trabajo se ha diseñado un proceso de purificación y separación del ácido lactobiónico contenido en el caldo de fermentación del lactosuero dulce. Para ello se ha estudiado el comportamiento de dos membranas, cerámica y plástica, ante distintos medios: agua, suero y caldo fermentado. Se ha determinado que el uso de la membrana cerámica tubular es más apropiado, ya que concentra la cantidad de proteína existente y sin pérdida del ácido lactobiónico en el concentrado. Obteniéndose a su vez una menor pérdida de la lactosa existente. Dicha membrana es introducida en una carcasa metálica de 60 mm de longitud, en un equipo a escala planta piloto. De esta forma, tras su filtrado se obtiene un producto más homogéneo y apropiado para posteriores etapas de purificación.

Posteriormente, se ha procedido a la purificación del ácido lactobiónico contenido en el permeado por un proceso de intercambio iónico en columna mediante el empleo de la resina Lewatit S4428. Se ha determinado la capacidad de retención del ácido lactobiónico por la resina, inicialmente con disoluciones sintéticas y posteriormente con producto de fermentación filtrado previamente por microfiltración. Se han encontrado diferencias entre el medio comercial y los fermentados. Dichas diferencias pueden ser debidas muy probablemente a la formación de compuestos secundarios generados durante la obtención de ácido lactobiónico a partir de *Pseudomonas taetrolens*. Se ha determinado la viabilidad del proceso combinado de purificación por membranas intercambio iónico para la obtención final del ácido lactobiónico.

ABSTRACT

The dairy industry is one of the food industries that have more production and processes; this diversity is result of the generation of large volumes of waste with high pollution. A clear example of waste obtained in them is dairy whey, whose origin lies in the manufacture of cheese. This whey, due to its composition is an excellent matrix for microbial bioconversion and production of lactobionic acid, compound very appreciate nowadays because its a lot of properties to be profit.

In this work we have designed a process of purification and separation of lactobionic acid content in the fermentation. For this we have studied the behavior of two membranes, ceramic and plastic, to several wherewithal water, serum and fermentation broth. It has been determined that the use of tubular ceramic membrane is more appropriate, because the amount of protein concentrates and not loss of lactobionic acid in the concentrate is detected. In turn, it is obtained a lower loss of lactose. This membrane is introduced into a metal housing 60 mm in length, on a pilot plant scale. Thus, after filtering it has obtained a product more homogeneous and suitable for subsequent purification steps.

Subsequently, it has proceeded to the purification of lactobionic acid content in the permeate through a process of ion exchange in a fixed bed column by using the resin Lewatit S4428. It was determined the retention capacity of lactobionic acid by the resin, firstly with synthetic solutions and secondly with fermentation product previously filtered by microfiltration. It was found differences between synthetic solutions and fermentation product. Such differences maybe have been a result of the formation of secondary compounds generated during production of lactobionic acid by *Pseudomonas taetrolens*. The final separation process combined membranes and ion exchange purification process to obtain finally lactobionic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Producción de leche de vaca en explotaciones ganaderas España 2011 (Fuente magrama).....	5
Figura 1.2. Proceso de elaboración del queso (CAR/PL, 2002).....	5
Figura 2.1. Ácido lactobiónico	9
Figura 2.2. Diagrama en el que se esquematizan las diferentes ventajas y puntos débiles de cada una de las modalidades de obtención de ácido lactobiónico	10
Figura 2.3. Acontecimientos históricos más importantes de las membranas	12
Figura 2.4. Esquema de la separación con membranas	13
Figura 2.5. Procesos con membranas cuyo potencial impulsor es una diferencia de presión	15
Figura 2.6. Esquema de los procesos comerciales con membranas en función de la fuerza impulsora responsable de la separación.....	16
Figura 2.7. Filtración perpendicular (a) y filtración tangencial (b) (Saavedra & Romero, 1999).....	18
Figura 2.8. Esquema de un módulo plano (Guizard, 1999).....	19
Figura 2.9. Esquema de un módulo espiral (Guizard, 1999).....	19
Figura 2.10. Representación esquemática de los elementos filtrantes tubulares y multicanales así como su ensamblaje en un módulo (Guizard, 1999)	20
Figura 2.11. Modos de funcionamiento de los módulos de fibras huecas o capilares en filtración tangencial (Guizard, 1999).....	20
Figura 2.12. Acontecimientos históricos más importantes.....	24
Figura 2.13. Propiedades más importantes de las resinas.....	26
Figura 2.14. Etapas en el proceso de intercambio iónico	27

Figura 2.15. Evolución de la concentración en un lecho de intercambio iónico (Gilarranz, 2006)	28
Figura 2.16. Diagrama concentración efluente-tiempo iónico (Gilarranz, 2006)	29
Figura 3.1. Equipo de membranas	32
Figura 3.2. Esquema del equipo de membranas	33
Figura 3.3. Esquema del proceso para la obtención de proteína	37
Figura 3.4. Equipo de Cromatografía de Alta Eficacia	38
Figura 3.5. Resina Lewatit S4428	40
Figura 3.6. Columna Vantage-L32x250	41
Figura 3.7. Cromatograma de la capacidad de carga obtenido del fermentado a tiempo 4 min	42
Figura 3.8. Cromatograma de la elución del lactobiónico obtenido del fermentado a tiempo 1 min.....	42
Figura 4.1. Caracterización con agua de la membrana plástica.....	45
Figura 4.2. Caracterización con agua de la membrana cerámica	45
Figura 4.3. Comportamiento de la membrana plástica.....	46
Figura 4.4. Comportamiento de la membrana cerámica.....	46
Figura 4.5. Comparación del comportamiento de las membranas frente a distintos caudales	47
Figura 4.6. Comparación de la velocidad de filtrado frente al tiempo del fermentado y el suero	52
Figura 4.7. Comparación de las presiones transmembranales (entrada y salida) existentes en la membrana cerámica	53
Figura 4.8. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit MP500 a distintas relaciones L/S	55

Figura 4.9. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit S4428 a distintas relaciones L/S	56
Figura 4.10. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit MP500 a distintas concentraciones y L/S 400.....	58
Figura 4.11. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit S4428 a distintas concentraciones y L/S 600.....	58
Figura 4.12. Isotherma de Langmuir para Lewatit MP500 y S4428	59
Figura 4.13. Isotherma del Factor Constante de Separación para Lewatit MP500 y S4428	60
Figura 4.14. Ajuste de los datos experimentales al modelo de difusión a través del poro de la partícula.....	61
Figura 4.15. Ajuste de los datos experimentales al modelo de transferencia de masa a través de la película	61
Figura 4.16. Carga de la resina Lewatit S4428 con LBA comercial	63
Figura 4.17. Carga de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 1.....	63
Figura 4.18. Carga de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 2.....	64
Figura 4.19. Carga de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 3.....	64
Figura 4.20. Elución de la resina Lewatit S4428 con LBA comercial	65
Figura 4.21. Elución de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 1	65
Figura 4.22. Elución de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 2.....	65
Figura 4.23. Elución de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 3.....	66
Figura 4.24. Diagrama del proceso de separación de LBA fermentación 3	67
Figura 4.25. Diagrama del proceso de purificación de LBA fermentación 3.....	68
Figura 4.26. Diagrama del proceso de separación y purificación LBA fermentación 3 ..	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Identificación de los efectos ambientales de la actividad de la industria alimentaria (Restrepo Gallego, 2006).....	3
Tabla 1.2. Composición del lactosuero dulce y ácido (Panesar et al, 2007)	4
Tabla 3.1. Características de las membranas empleadas	31
Tabla 3.2. Características de las resinas MP500 y Lewatit S4428	39
Tabla 4.1. Concentración de proteínas en el permeado según el flujo en las dos membranas empleadas	49
Tabla 4.2. Comparación de la cantidad de lactosa existente en los permeados obtenidos con las dos membranas	49
Tabla 4.3. Comparación de las velocidades obtenidas a partir de dos muestras (fermentación y lactosuero)	51
Tabla 4.4. Concentración de LBA en la resina MP500 y en la disolución a diferentes relaciones L/S	54
Tabla 4.5. Concentración de LBA en la resina S4428 y en la disolución a diferentes relaciones L/S	55
Tabla 4.6. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit MP500 a distintas concentraciones y L/S 400.....	57
Tabla 4.7. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit S4428 a distintas concentraciones y L/S 600.....	57
Tabla 4.8. Constantes de las isothermas de Langmuir y del Factor Constante de Separación	59
Tabla 4.9. Parámetros cinéticos	62
Tabla 4.10. Concentración de LBA existente en el proceso de separación con membranas.....	70

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Acondicion.	Acondicionamiento
Alfa(α)	Factor de separación
°C	Grados Celsius
Ca	Calcio
$(C_A/C_B)_P$	(Concentración A/ Concentración B) Permeado
$(C_A/C_B)_F$	(Concentración A/ Concentración B) Alimentación
Ce	Concentración
cm ² /s	Centímetros cuadrados/ segundo
CP	Concentración permeado
CR	Concentración retenido
CT	Concentración del liquido
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
Dp	Diámetro de partícula
DQO	Demanda química de oxígeno
Empaquet.	Empaquetamiento
FC	Factor de concentración
g	Gramos
g/L	Gramo/Litro
h	Horas
HPLC	Cromatografía de Alta Eficacia
ILAS S.A.	Industrias Lácteas Asturianas
J	Densidad de flujo

KDa	Kilo Dalton
Keq Lang	Constante de equilibrio de Langmuir
Keq CSF	Constante de equilibrio del Factor Constante de Separación
Kf	Constante cinética de transferencia de materia en el film
L	Litros
LBA	Ácido lactobiónico
[LBA]	Concentración de LBA
L/h	Litros/horas
L/S	Líquido/ Sólido
M	Molar
MC	Membrana cerámica
mL	Mililitros
mL/L	Mililitro/litro
mL/min	Mililitro/ minuto
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MP	Membrana plástica
ng/μL	Nanogramo/ microlitro
nm	Nanómetros
OI	Ósmosis inversa
PES	Poli-éter-Sulfona
ppm	Partes por millón
Q	Caudal

q	Carga
QT Lang	Capacidad máxima de retención en la resina (isoterma Langmuir)
QT CSF	Capacidad máxima de retención en la resina (isoterma CSF)
R	Retención o rechazo
Regene.	Regeneración
s	Segundos
T	Tiempo
T ^a	Temperatura
T _R	Tiempo ruptura
T equilibrio	Tiempo de equilibrio
UCLA	Universidad de California Los Ángeles
VCR	Factor de concentración de volumen
V _{FILTRADO}	Velocidad filtrado
V _{PERMEADO}	volumen permeado
WCR	Factor de concentración de peso
Y	Rendimiento

1. INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

El elemento diferenciador de la época en que vivimos, es la producción empresarial a partir de fuentes renovables, siguiendo los principios de producción más limpia. Consiguiendo con ello una mayor calidad y productividad sin el deterioro del medio ambiente.

La ciencia que cementa las bases de dichos procesos productivos es la biotecnología. Considerada en la actualidad la alternativa más viable ya no solo a nivel económico sino también a nivel tecnológico ya que con ella se reutilizarán los residuos obtenidos en los distintos procesos industriales. Convirtiéndolos en nuevas materias primas a la vez que otorga al producto de origen un valor añadido, y una nueva salida en los mercados a este subproducto obtenido, generando con ello un potencial nicho económico por descubrir.

Esta nueva ciencia nos proporciona las herramientas y conocimientos necesarios para poder llevar a cabo esta reutilización de los residuos para así conseguir un producto con un valor añadido. Además con el empleo de estas técnicas de bioconservación microbiana se consigue la reducción de los efectos nocivos ambientales generados por las actividades de la industria alimentaria. En la siguiente Tabla 1.1 se muestran algunos de los efectos que se generan en el entorno ambiental.

Un claro ejemplo de esta conversión oxidativa microbiana es el caso del ácido lactobiónico procedente del lactosuero que se tratará a lo largo del presente proyecto.

La elección de dicho producto, es consecuencia de los miles de Tms de leche (6487,60 Tms) generados por la industria láctea como muestra la Figura 1.1. Este gran volumen de materia prima da lugar a una gran diversidad de procesos y productos, generando como consecuencia una gran cantidad de residuos sólidos, líquidos y gaseosos, los cuales se incrementan con la mejora de la productividad, calidad y sanidad de los mismos. Siendo el lactosuero un subproducto obtenido de la elaboración de quesos (Figura 1.2). Se considera un residuo muy contaminante, por causar grandes daños medioambientales debido a los altos valores de demanda química y bioquímica de oxígeno (DQO> 60000ppm, DBO>35000) que presenta. A pesar de ser un desecho muy peligroso también se considera una muy buena matriz (Tabla 1.2) para la conversión oxidativa microbiana, convirtiéndose en una gran alternativa para la

producción de por ejemplo, ácido lactobiónico. Producto muy demandado en la actualidad debido al abanico de posibilidades de su uso

Tabla 1.1. Identificación de los efectos ambientales de la actividad de la industria alimentaria (Restrepo Gallego, 2006)

ENTORNO	EFECTO
Atmósfera	Emisiones ácidas Gases peligrosos Humo Cenizas
Agua	DBO DQO Sustancias peligrosas Espumas Turbidez Color
Suelo	Residuos peligrosos Residuos no peligrosos
Molestias	Visual Polvo Olor Vibraciones acústicas
Recursos Naturales	Energía Agua Combustibles

Tabla 1.2. Composición del lactosuero dulce y ácido (Panesar et al, 2007)

COMPONENTE	LATOSUERO DULCE g/L	LATOSUERO ÁCIDO g/L
Sólidos Totales	63,0-70,0	63,0-70,0
Lactosa	46,0-52,0	44,0-46,0
Proteína	6,0-10,0	6,0-8,0
Grasa	0,5-7,0	0,4-0,6
Calcio	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfatos	1,0-3,0	2,0-4,5
Lactatos	2,0	6,4
Cloruros	1,1	1,1
pH	5,6-6.1	4,3-4,7

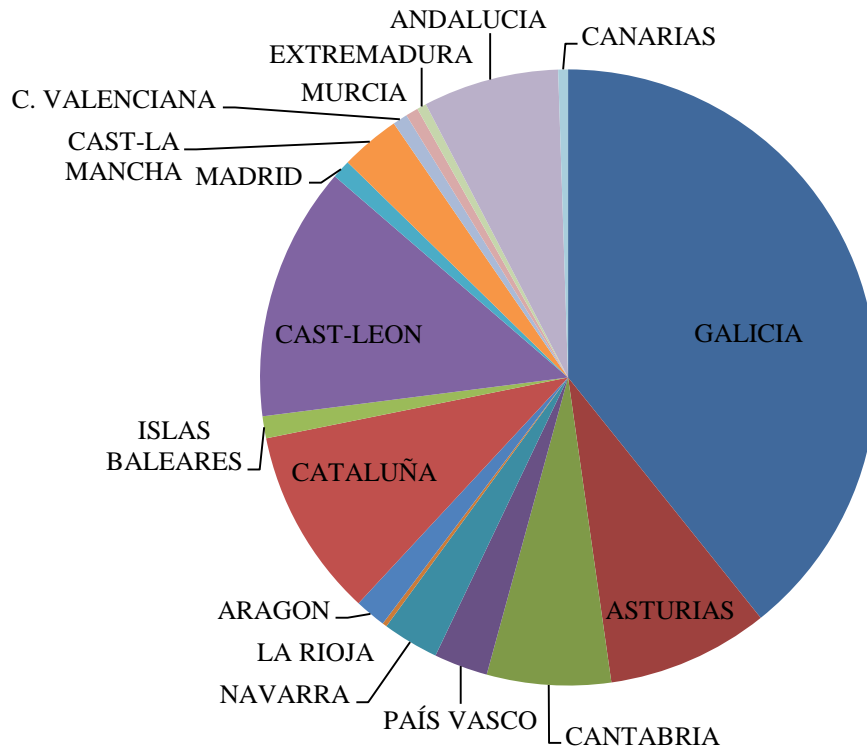


Figura 1.1. Producción de leche de vaca en explotaciones ganaderas España 2011 (Fuente magrama)

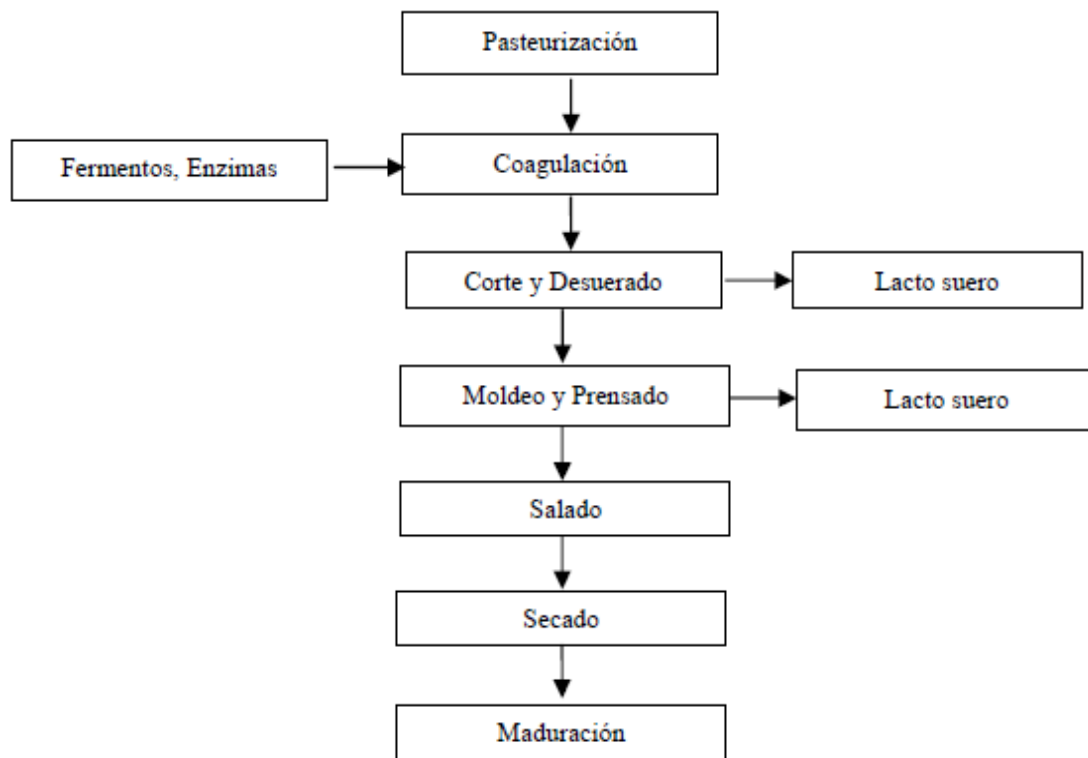


Figura 1.2. Proceso de elaboración del queso (CAR/PL, 2002)

En el presente trabajo nos centraremos en los procesos de purificación y separación del ácido lactobiónico a través de fermentación de suero lácteo para su uso comercial. Ya que mediante una conversión microbiana de la lactosa existente en el suero lácteo no sólo se obtiene el producto estrella (ácido lactobiónico) sino que a su vez también se generan otros subproductos indeseables tales como: biomasa, proteínas, sales y otras impurezas que afectan al proceso de recuperación del mismo, generando una disminución del valor del producto obtenido. Para poder subsanar dicho problema existe una alternativa de separación que actualmente se encuentra en proceso de expansión y es la técnica de filtración mediante la tecnología de membranas, con las que se pueden obtener un producto más homogéneo.

Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo ha sido el diseño de un proceso de purificación y separación del ácido lactobiónico contenido en el caldo de fermentación de lactosuero dulce. Para ello se utilizarán técnicas de filtración por membrana y de intercambio iónico. Para llevar a cabo este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos particulares:

- Seleccionar el tipo de membrana más apropiada para poder realizar una filtración previa del lactosuero y así eliminar las impurezas generadas en el proceso de fermentación.
- Llevar a cabo la caracterización de las dos membranas con: agua, suero lácteo y medio fermentado. Mediante el análisis de la presión transmembranal existente durante la filtración a través de las membranas y la determinación del contenido proteico y análisis cuantitativo la lactosa de las muestras tras su filtrado para determinar el caudal óptimo de trabajo.
- Valoración del comportamiento de la resina de intercambio iónico Lewatit S4428 y MP500 para su posterior selección y acondicionamiento para el proceso de purificación.
- Probar la eficacia de la resina tanto en disoluciones sintéticas como productos de fermentación reales, para determinar la capacidad y la viabilidad del proceso en columna.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.- CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1.- LACTOSUERO

2.1.1.- Introducción

Ante las ansias y tenacidad por mejorar de los investigadores, así como la evolución de las nuevas tecnologías nos han dado pie a poner en vías de solución problemas que antes eran irresolubles a la vez que costosos. Generando una batalla de ideas e hipótesis de las que con el tiempo se van obteniendo pequeños resultados que nos van proporcionando el continuo estudio de los diversos caminos ofertados por la biotecnología.

Frente a la posibilidad de que se nos presente una escasez de recursos naturales por el constante aumento de demanda de la población, en continuo crecimiento y evolución de sus costumbres a la vez que la influencia de los cambios climáticos que inciden en la producción de dichos productos. Encontramos en esta nueva ciencia una alternativa viable a la par que económica, porque nos proporciona las herramientas necesarias para la reutilización de los subproductos de materias primas tales como el caso del ácido lactobiónico procedente del lactosuero subproducto obtenido por la industria láctea tras la elaboración de quesos. Antes desechado y ahora considerado una potencial fuente de diversos productos. Situación ésta que nos viene dada tras una primera etapa de bonanza económica en la que no se reparaba en la reutilización de los residuos obtenidos en los distintos procesos y ante la acuciante situación provocada por la crisis que venimos sufriendo a nivel mundial nos lleva a agudizar el ingenio para la obtención de mejores resultados, empleando menos medios ofertándonos esta posibilidad las ciencias biotecnológicas. Siendo estas una fuente de potencial económico en distintos campos, pasando desde el sanitario por el alimentario y finalmente el industrial. Lo que conlleva a su vez la apertura de un potencial nicho de mercado laboral aún por explotar.

El ácido lactobiónico presenta un amplia gama de campos de aplicación ya que en la industria biosanitaria se puede emplear como solución para la preservación de órganos de trasplante, como antibiótico, excipiente en desinfectantes. En la industria cosmética se emplea como hidratante, antioxidante...; industria química se usa como detergente biodegradable, agente quelante, adyuvante en piensos de animales, protector

de los metales ante la corrosión y finalmente en la industria alimentaria se utiliza como antioxidante, conservante, regulador de pH, aromatizante, gelificante.

El uso del mismo en campos de índole tan diversa es debido a que la materia prima de la que procede, lactosuero dulce, es rico en lactosa, proteínas (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, inmunoglobulina G, proteasa peptona, seroalbúmina bovina y otras), minerales (potasio, cloro, fósforo, calcio, sodio, magnesio y elementos traza), grasas (triglicéridos, fosfolípidos, diglicéridos y ácidos grasos libres), nitrógeno no proteico (urea, aminoácidos libres, ácido orótico y colina), vitaminas (vitamina B5, vitamina B2, vitamina C y vitamina B6) y agua.

2.1.2.- Ácido Lactobiónico

El ácido lactobiónico es un polihidroxiácido complejo (consta de 8 grupos hidroxilo), compuesto por una molécula de galactosa unida por enlace éster a una molécula de ácido glucónico. Se caracteriza por ser una molécula higroscópica, con una gran capacidad antioxidante, y un poder inhibidor frente a enzimas metaloproteinasas. (Figura 2.1)

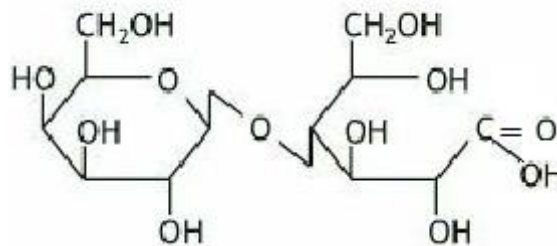


Figura 2.1. Ácido lactobiónico

Para su obtención a partir del suero de la leche se nos ofertan cuatro vías fundamentalmente: catálisis química, catálisis enzimática, la electroquímica y la biotecnológica (Figura 2.2.). Siendo ésta última la mejor de las alternativas como se indica anteriormente.

La bioconservación oxidativa de la lactoda llevada a cabo por *Pseudomonas taetrolens* a partir del suero lácteo se presenta como una vía económicamente rentable a pesar de la existencia de otros componentes presentes en el suero como biomasa, proteínas, sales y otras impurezas que también afectan al proceso de recuperación del ácido lactobiónico.

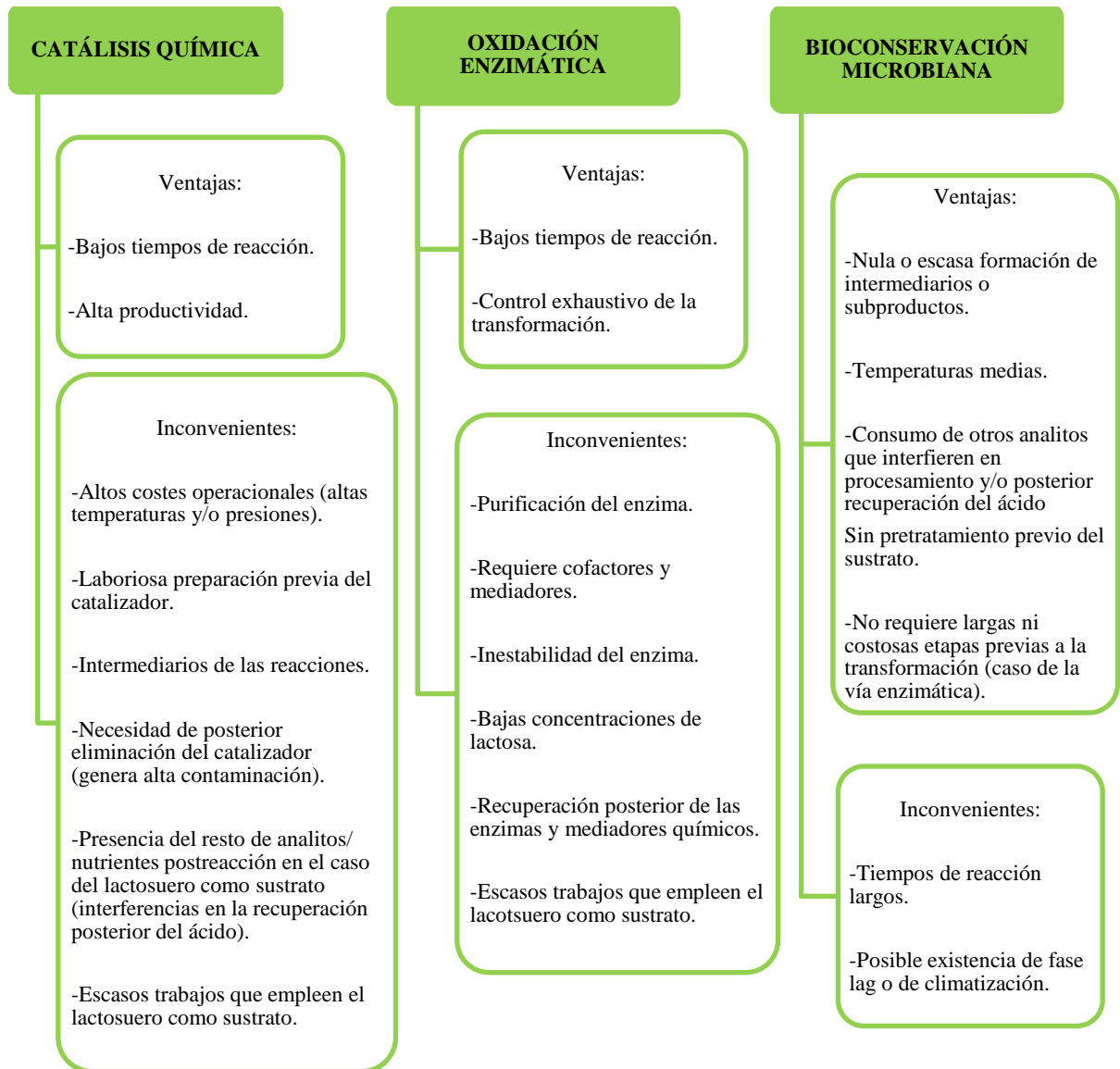


Figura 2.2. Diagrama en el que se esquematizan las diferentes ventajas y puntos débiles de cada una de las modalidades de obtención de ácido lactobiónico. (Alonso, 2009)

2.2.- MEMBRANAS

2.2.1.- Introducción: breve historia

El uso de las membranas como proceso de transferencia de materia no es nada novedoso ya que la vida en sí depende de la relación que se establece a través de las membranas biológicas existentes en nuestro cuerpo (piel) con el medio.

A pesar del conocimiento de la utilización de procesos de filtración para la purificación y el ablandamiento de aguas, tuvieron que pasar años hasta la llegada del eclesiástico francés J.A. Nollet (1700 -1770) y del nacimiento de la físicoquímica como ciencia para poder explicar los fenómenos que sucedían durante dichos procesos.

El descubrimiento del proceso de ósmosis fue realizado por J.A. Nollet, quien dio con ella al realizar pruebas con ayuda de una vejiga animal. Sentando con ello las bases de lo que sucedía a ambos lados.

Con ayuda del nacimiento de la físicoquímica como ciencia y el resultado del trabajo de numerosos investigadores se han ido explicando las reacciones termoquímicas, la catálisis, la electrólisis y la física de las soluciones. Las bases de dicha ciencia han sido sentadas por: Thomas Graham, padre de la química de los coloides y será quien ponga de manifiesto la capacidad de las membranas como medio de separación. Y François Marie Raoult, que es el fundador de la Teoría de las Soluciones.

Los experimentos realizados por Graham a cerca de la difusión de los líquidos (1828-1833) coinciden con la primera membrana artificial fabricada por Traube (1826-1894). Dicha membrana se creó precipitando ferrocianuro y cobre sobre una lámina cerámica.

Posteriormente basándose en los trabajos realizados anteriormente por Graham, Adolf Eugen Fick (1829-1901) formuló la Ley de Fick, con la que se muestra una relación lineal entre el flujo de difusión y la diferencia de concentraciones que produce dicho flujo. Siendo a su vez también el creador de la primera membrana orgánica (1855).

A pesar del trabajo exhaustivo y tedioso realizado por Graham y Fick había grandes confusiones en la comunidad científica del momento, hasta la llegada de J.C.

Maxwell (1831- 1879) quien proporcionó luz a la misma con la introducción del concepto de velocidad relativa.

El descubrimiento de la ósmosis es anterior al de la difusión siendo el primero descubierto por J. A. Nollet gracias a las membranas semipermeables anteriormente nombradas y el segundo fue realizado por Henri Dutrochet (1776- 1847).

Las observaciones realizadas por Dutrochet le sirvieron para construir el primer dispositivo experimental para observar la presión osmótica existente en una membrana semipermeable.

Gracias a las aportaciones de todos estos estudiosos del momento junto con Pfeffer (quien concluyó que la variación de la presión osmótica estaba directamente relacionada con la temperatura), Van't Hoff, Josiah Willard Gibbs (1839-1903) y Raoult (1830- 1901) quienes contribuyeron a dar unidad a la teoría de las soluciones incorporando el comportamiento osmótico como una de las propiedades de las soluciones, sentándose así las bases de los fenómenos de permeación.

El avance más significativo se produjo años después en la UCLA (Universidad de California Los Ángeles) cuando Sidney Loeb y Srivasa Sourirajan realizaron estudios que llegaron a nuevas aproximaciones de ósmosis y ósmosis inversa. Dando como resultado de su trabajo el desarrollo de la primera membrana de acetato de celulosa asimétrica en 1960. Gracias a este descubrimiento se consiguió que la OI tuviera una viabilidad comercial debido al aumento de las densidades de flujo de permeado entre otras de las muchas mejoras obtenidas.

Todos estos sucesos anteriormente destacados y recogidos en la Figura 2.3, han servido para que se realizaran grandes y rápidos progresos en el desarrollo de una simple herramienta de laboratorio hasta convertirse en un gran proceso industrial.

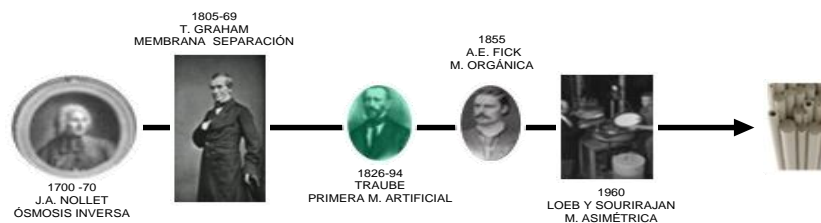


Figura 2.3. Acontecimientos históricos más importantes de las membranas

2.2.2.- ¿Qué es una membrana?: conceptos—La filtración por membranas

El elemento más importante de dicho proceso industrial es la membrana en sí. En sentido general se podría definir como una región que actúa como barrera permitiendo el paso exclusivo y/o de forma controlada de una o más especies a través de ella.

Antes de proceder a la explicación de las distintas clasificaciones existentes de la misma hay que entender el funcionamiento y una serie de conceptos clave.

Tras el paso de una alimentación proporcionada a la membrana se generan dos corrientes, una conocida como permeado que consiste en el paso de los componentes y otra denominada retenido o concentrado Figura 2.4. El transporte a través de la misma puede ser provocado por fuerzas impulsoras de índole muy diversa. Todas ellas tienen una característica en común y es que restringen el paso de varias especies químicas a su través.

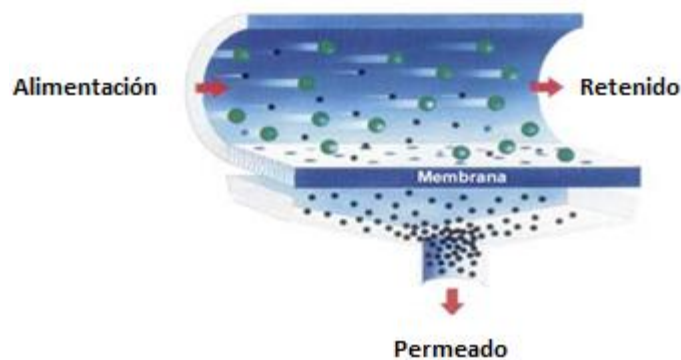


Figura 2.4. Esquema de la separación con membranas

Los principales parámetros que describen el proceso con membranas son:

- Selectividad: para poder definir el mismo hay que hacer referencia a dos conceptos que son: retención o rechazo (R o σ) o el factor de separación (α).

Retención o rechazo (R o σ): es una medida de la capacidad de una membrana para impedir el paso a través de ella, de un componente determinado. Se emplea en la casi totalidad de los procesos en los que la alimentación es una disolución diluida y los solutos son parcial o

totalmente diluidos por la membrana, pasando las moléculas de disolvente. Siendo usado en este caso el coeficiente de retención o de rechazo (R), definido como el grado de separación de un componente en una disolución bajo unas determinadas condiciones de operación.

$$R \text{ o } \sigma = 1 - \frac{C_P}{C_R}$$

Siendo C_P y C_R la concentración de dicho componente en el permeado y en el retenido.

El factor de separación (α): se utiliza principalmente en gases, definiéndose la relación entre los componentes del permeado y la alimentación. Siendo el resultado de las diferentes velocidades de transporte en el caso de los procesos con membranas

$$\alpha_{AB} = \frac{\left(\frac{C_A}{C_B} \right)_P}{\left(\frac{C_A}{C_B} \right)_F}$$

Es decir el término selectividad hace referencia a que la membrana permita la separación de los componentes deseados.

- Densidad de flujo de permeado (J). Definido como el volumen de permeado o de algún componente por unidad de área de membrana y unidad de tiempo. Estando influenciado el tipo de membrana que se esté empleando, aplicación y condiciones de operación en función del tiempo.

- Existen otras variables de gran utilidad que simplemente se enumeran a continuación y son: umbral de corte (cut off), rendimiento volumétrico, factor de concentración (FC), permeabilidad, factor de concentración de volumen (VCR), factor de concentración de peso (WCR), porcentaje de reducción de volumen y rendimiento (Y).

Todos ellos junto con el grosor, diámetro de poro, porosidad, la resistencia química, térmica y mecánica etc. (Ostergaard, 1989) son parámetros de vital

importancia a la hora de elegir un tipo de membrana u otro para el proceso que se vaya a realizar.

2.2.3.- Tipos de membranas

Existen diversas clasificaciones de las membranas, teniendo en cuenta distintos criterios como son la fuerza impulsora responsable de la separación (presión, presión parcial, concentración y potencial eléctrico) como se muestra en la Figura 2.6 , siendo éste el factor diferenciador de los procesos de membranas más comunes (Cheryan, 1998). También se pueden clasificar en función del tamaño de poro (microporosas, mesoporosas), su naturaleza química (orgánica, inorgánica) Figura 2.5... Algunos de ellos se irán abordando a lo largo de este apartado del trabajo.

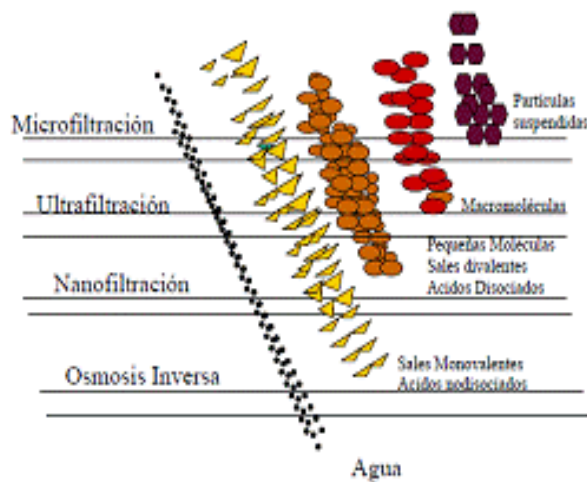


Figura 2.5. Procesos con membranas cuyo potencial impulsor es una diferencia de presión

Encontramos un gran bagaje bibliográfico a cerca de las distintas técnicas de membranas, fabricación, comportamiento y aplicaciones de las mismas (Ho & Sirkar, 1992; Scott, 1996; Freemantle, 2003; Chen et al. 2004)

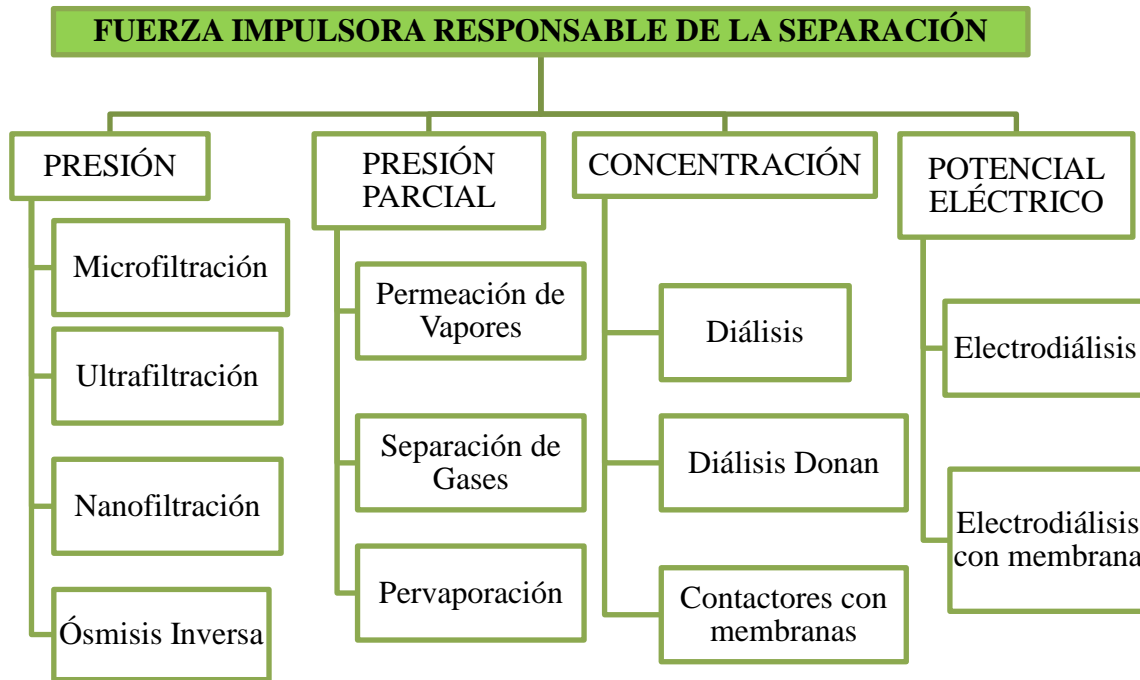


Figura 2.6. Esquema de los procesos comerciales con membranas en función de la fuerza impulsora responsable de la separación

En cuanto a la estructura podemos tener membranas simétricas y asimétricas. Estando la asimetría relacionada con la estructura interna de la membrana aspecto de gran importancia ya que éste a su vez, está relacionado con los mecanismos de separación. Considerándose las membranas simétricas las que presentan tamaños de poro uniformes repartidos a lo largo de la superficie de la misma y las membranas asimétricas las que presentan una estructura doble, ya que están compuestas por una capa fina (conocida como piel) y otra porosa mucho más gruesa. Este tipo de membranas se presentan con un tamaño de poro mayor (Cheryan, 1998).

Clasificación según la naturaleza química:

- Membranas orgánicas: en un principio estas membranas de aplicación industrial se fabricaban con polímeros basados en la celulosa, acetato de celulosa dando lugar a lo que se conoce como membranas de 1ª generación, gracias a los avances tecnológicos han surgido nuevas membranas orgánicas basadas en otros polímeros como la poliamida, poliacrilonitrilo, polisulfona... (membranas de 2ª generación)

- Membranas inorgánicas también conocidas como membranas minerales o cerámicas dando lugar a la 3ª generación de membranas. Destacando las de alúmina y óxido de zirconio (empleada en este trabajo) entre otras.

Éstas últimas presentan más ventajas ya que son más resistentes física y químicamente siendo inertes y sin apenas producirse variaciones en sus propiedades con el tiempo. Gracias a sus características serán más fácilmente limpiables ya que resisten amplios intervalos de pH, temperatura y presión. Convirtiéndose en membranas más competitivas debido al ahorro económico, que aporta al tener una vida útil más larga. En contraprestación a ser más versátiles presentan como gran inconveniente su coste inicial ya que estamos ante membranas más caras.

Con ayuda de la clasificación de la naturaleza química a continuación se procede a señalar las membranas sintéticas más comercializadas. Nos encontramos por un lado los polímeros (orgánicas) que dan lugar a las fabricadas a partir de acetato de celulosa, poliamida y polisulfona y por otro a las que proceden de materiales inorgánicos, como son los metales y cerámicas.

2.2.4.- Modo de circulación del flujo en un proceso con membranas

Es importante reseñar la dirección de flujo con respecto a la membrana diferenciándose las siguientes:

- Flujo cruzado: la alimentación circula paralelamente a la membrana mientras que el permeado fluye de manera perpendicular a la alimentación. Dicho movimiento del flujo da lugar a la filtración tangencial en la cual el soluto que tiende a acumularse en la superficie de la membrana es arrastrado debido a las elevadas velocidades dando lugar a un proceso más eficiente. (Figura 2.7, b).
- Flujo perpendicular: la alimentación fluye de forma perpendicular a la superficie de la membrana. Dicho movimiento del flujo es el que se produce en la filtración convencional. Mediante esta técnica de filtrado se

van depositando los solutos en la membrana, generándose un ensuciamiento de la misma (Figura 2.7,a) .

- Flujo inverso: la dirección del flujo a través de la membrana es invertida por la aplicación de la presión en dirección opuesta a la entrada de la alimentación en el módulo, lo que provoca normalmente la salida del permeado. Siendo este flujo empleado en las etapas de lavado.
- Multietapas con recirculación: este tipo de flujos se aplica cuando estamos ante un proceso que consta de dos o más etapas.

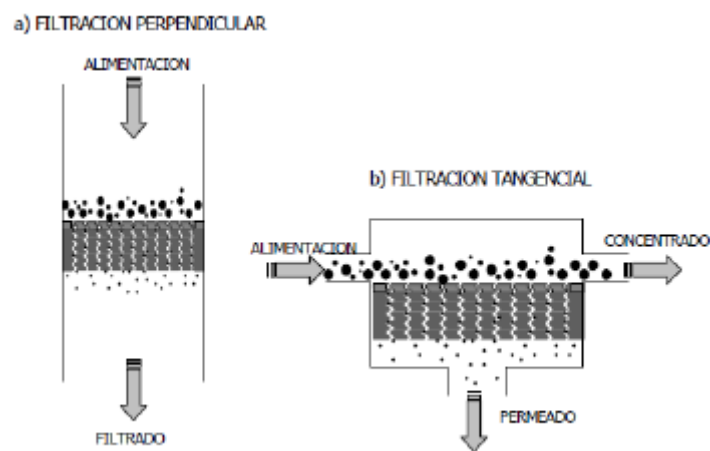


Figura 2.7. Filtración perpendicular (a) y filtración tangencial (b) (Saavedra & Romero, 1999)

2.2.5.- Módulos de membrana

El módulo es el término empleado para definir la unidad práctica más pequeña que contiene una o más membranas y las estructuras soporte. Podemos distinguir los siguientes tipos de módulos: módulos de placas y marco, módulos espirales, módulos tubulares y los módulos capilares y de fibras huecas.

Módulos de placas y marco: son la configuración más simple y más antigua consisten en hojas planas de membrana instaladas en una especie de filtro o prensa como se muestra en la Figura 2.8.

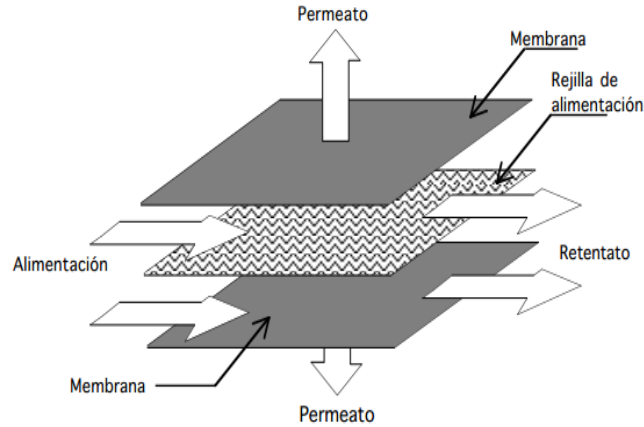


Figura 2.8. Esquema de un módulo plano (Guizard, 1999)

Módulos espirales: es una variante del módulo plano. Es un sistema de módulo plano enrollado sobre sí mismo en torno a un tubo perforado central que recoge el permeado (Figura 2.9).

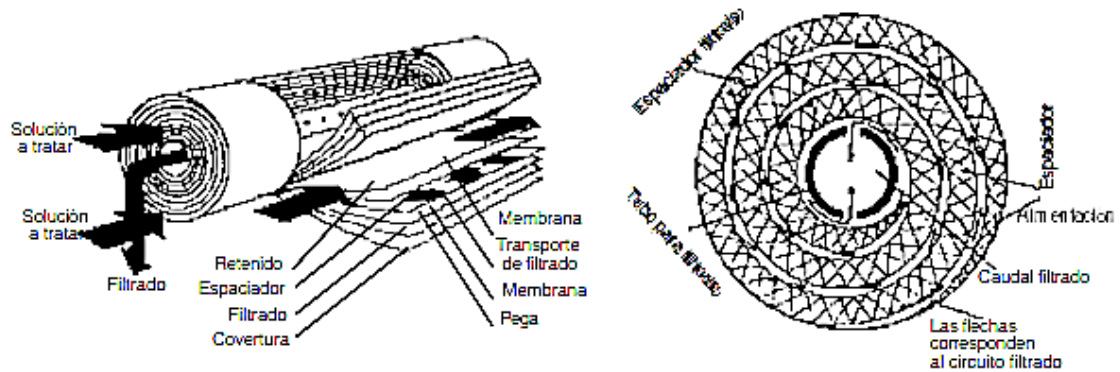


Figura 2.9. Esquema de un módulo espiral (Guizard, 1999)

Módulos tubulares: se basa en una membrana que presenta una forma de tubo en donde la capa activa de la misma se encuentra en el interior. Estos módulos pueden ser de dos tipos: los tubos soportados (el tubo de membrana se encuentra soportado por tubos perforados o porosos de acero inoxidable o plástico) y los tubos no soportados (en este caso la membrana se encuentra soportada por el tubo que actúa como sustrato o soporte). Un esquema del mismo se muestra en la Figura 2.10.

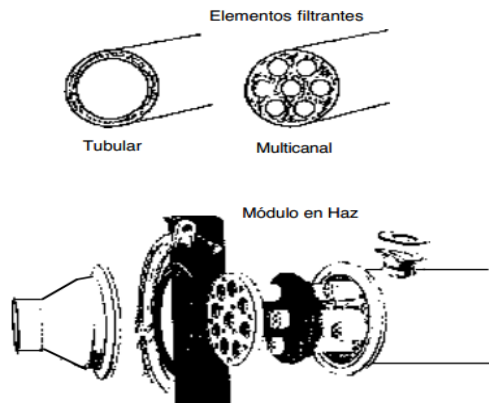


Figura 2.10. Representación esquemática de los elementos filtrantes tubulares y multicanales así como su ensamblaje en un módulo (Guizard, 1999)

Módulos capilares y de fibras huecas: en este caso las membranas se encuentran dispuestas en forma de tubos de pequeño diámetro. Diferenciándose de las anteriores en que éstas membranas están formadas por una capa activa que hace también de soporte (Figura 2.11).

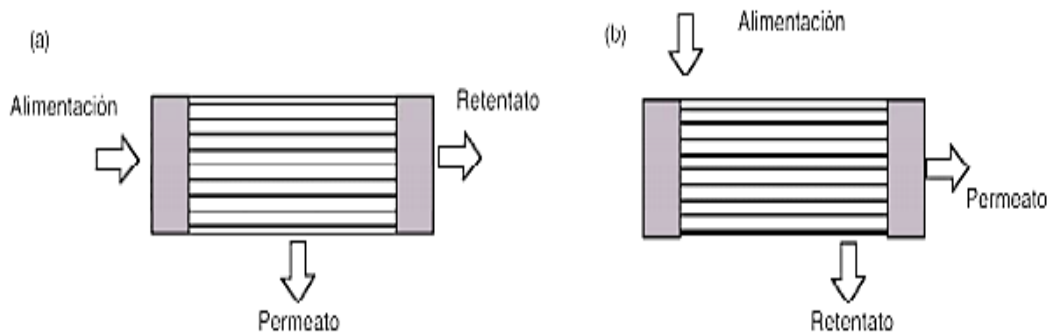


Figura 2.11. Modos de funcionamiento de los módulos de fibras huecas o capilares en filtración tangencial (Guizard, 1999)

2.2.6.- Ventajas e inconvenientes de los procesos de separación con membranas

Las principales ventajas del proceso son las que se enumeran a continuación:

- El proceso de separación puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o a temperaturas próximas a ella. Siendo de vital importancia en nuestro caso, ya que el lactosuero empleado es muy termolábil. Sin olvidarnos que empleando estas temperaturas obtenemos la ventaja adicional de un menor consumo de energía.
- Los procesos con membranas se pueden combinar con facilidad con otros procesos de separación.
- La separación se lleva a cabo sin que se produzca un cambio de fase si lo comparamos por ejemplo con la evaporación, y sin el uso de aditivos ni de agentes másicos de separación, por no requerirlo el proceso.
- Estamos ante procesos continuos y más sencillos por no requerir de equipos complicados de generación o transmisión de calor con respecto a la filtración tradicional.
- Gracias al efecto del flujo tangencial de los procesos de membranas, no presentan la acumulación tan acusada de especies sobre la superficie del mismo suceso que aparecía en la filtración tradicional.

Siendo los inconvenientes más significativos los que se enumeran a continuación:

- No se produce el secado completo del soluto por lo tanto siempre quedará algo de agua.
- Estamos ante procesos que están limitados por las características del concentrado.
- El ensuciamiento de la membrana y las características específicas de los procesos de limpieza.

2.2.7.- Ensuciamiento de la membrana

El inconveniente que se debe tratar en profundidad es el relacionado con el ensuciamiento de la membrana ya que podría reducir la eficacia del proceso causando

pérdidas económicas. Las principales razones por las que se produce el mismo son: concentración de polarización (Field, 2010), adsorción sobre la superficie de la membrana, formación de una capa de gel sobre la superficie de la misma y bloqueo de los poros (Güel et al, 1999; Martínez et al., 2000).

Los efectos anteriormente mencionados generan una resistencia adicional al paso de solutos y disolventes a través de la membrana. Estando condicionado el mayor o menor efecto de los mismos por: el tipo de membrana, tipo de alimentación, condiciones de operación.

2.2.8.-Limpieza de la membrana

El objetivo del mismo es la recuperación de flujos iniciales de permeado. Se puede entender desde tres puntos de vista diferentes como son:

- ❖ Limpieza física: consiste en el uso del permeado o aire a presión durante un corto período de tiempo en sentido contrario al flujo normal.
- ❖ Limpieza química: empleo de agentes de limpieza químicos como son los ácidos, bases, detergentes etc. Siempre teniendo en cuenta las condiciones de operación indicadas por el fabricante de la membrana.
- ❖ Limpieza biológica: se basa en el empleo de enzimas como agentes de limpieza.

2.2.9.- Aplicaciones de las membranas en la industria

Durante los últimos años, la tecnología de membranas está siendo considerada una herramienta importante ya no solo en los procesos de elaboración del alimento sino también el procesado de subproductos como es el caso del suero lácteo. Algunos ejemplos de utilización de las mismas son los procesos de clarificación de los zumos, bebidas azucaradas, tratamiento de aguas...

La investigación en este campo está creciendo continuamente ya que los costes de los procesos de elaboración también están creciendo por tanto se necesita de la existencia de procesos que reduzcan los costes de elaboración pero sin olvidarnos de

que los productos deben de presentar la máxima calidad posible y siempre respetando el medio ambiente.

2.3.- ELECTRODIÁLISIS

2.3.1.- Introducción: breve historia

Estamos ante una metodología antigua ya que la existencia de intercambiadores iónicos de algunas arcillas y minerales se conoce desde hace años. Los primeros estudios realizados a cerca de dicho fenómeno fueron aportados por Thompson y Way (1850). Gracias a los estudios de Way se concluyó que la propiedad de intercambio era debida a la presencia de pequeñas cantidades de zeolita.

Aunque habría que esperar hasta la aparición de Lemberg, quien facilitó más datos sobre la capacidad intercambiadora de las zeolitas ampliando los conocimientos en estos procesos de intercambio.

Las primeras zeolitas sintéticas serían obtenidas en 1905 por el alemán Gangs. Dichas zeolitas surgidas de la reacción de la mezcla de silicato de sodio o aluminato de sodio, o mezcla de ambas, con sulfato de aluminio. Se tardaría unos años en poder usar la primera columna de zeolita mineral de modo práctico.

El hecho más significativo en la tecnología de intercambio iónico viene dado por los trabajos de Basil Adams y Eric Colmes en el Departamento de Investigación Científica e Industrial (Reino Unido), en 1935, con la síntesis de resinas orgánicas. Fueron quienes desarrollaron polímeros orgánicos que imitaban a las zeolitas. Posteriormente, Holmes creó una resina catiónica fuerte a partir del ácido fenolsulfónico.

Un gran paso en las resinas de intercambio iónico fue conseguido gracias al trabajo de Gaetano D'Alelio quien con sus investigaciones desarrolló las resinas catiónicas de ácido fuerte. Posteriormente Mc Burney desarrolló las resinas aniónicas de base fuerte.

Sería en 1948 cuando Skogseid produce la primera resina específica para un metal, el potasio.

A partir de entonces se ha continuado la investigación y el desarrollo en nuevas estructuras poliméricas, dando lugar a una serie de modernas resinas de intercambio iónico, cuyo empleo en el campo de las aplicaciones industriales ha sido enorme, ya que con el uso de la filtración natural no se eliminan las sales existentes en la disolución sino que únicamente se elimina la materia orgánica y los microorganismos existentes en la misma.

En la Figura 2.12. aparecen destacados los acontecimientos históricos más importantes.

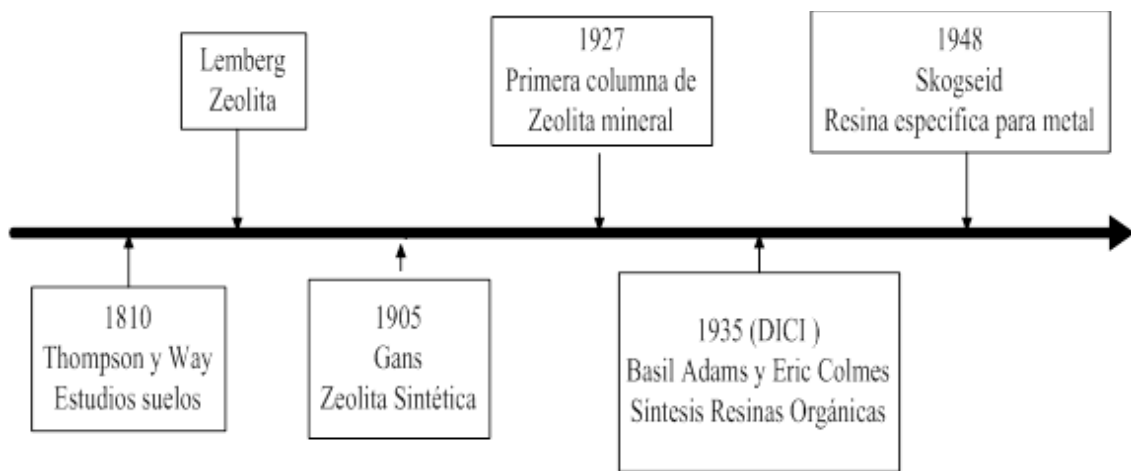


Figura 2.12. Acontecimientos históricos más importantes

2.3.2.- Conceptos

El intercambio iónico se define como una operación de separación que está basada en la transferencia de materia fluido-sólido (Nervárez 2009; Pérez et al. 2006). En dicho proceso se genera una reacción química en la que los iones móviles hidratados de un sólido son intercambiados por iones de igual carga de un fluido (Choi, 2005).

Estamos ante un proceso que emplea como fuerza impulsora la diferencia de un potencial eléctrico, y que consiste en pasar un fluido sobre un intercambiador aniónico y/o catiónico, reemplazando los cationes y/o aniones por el ión hidrógeno (H+) y/o el ión hidroxilo (OH-) respectivamente (Manahan, 2007)

Viéndose la eficacia del proceso definida por la afinidad de la resina por un ión en particular, el pH del fluido, concentración de iones, temperatura y la difusión. Estando este último factor relacionado con la dimensión del ión, la carga electrostática, temperatura, estructura y tamaño de poro de la resina (Grágeda y Grágeda, 2006). De ahí la gran importancia de conocer las características del fluido que se vaya a emplear para una correcta elección de la resina más apropiada.

Las resinas de intercambio iónico son pequeñas sustancias granuladas esféricas insolubles en agua, que están compuestas por una alta concentración de grupos polares, ácidos o básicos que han sido incorporados a una matriz polimérica reticulada por la acción de un agente entrecruzante (Grágeda y Grágeda, 2006). Reaccionando como ácidos, bases o sales, pero tienen la peculiaridad de tener sólo cationes o aniones con la habilidad de tomar parte de la reacción química por su capacidad de migración (Nervárez, 2009).

Como la concentración de los grupos polares en la resina es un número finito, éstas presentarán una capacidad determinada en el intercambio. La principal ventaja de las resinas de intercambio iónico es que tiene la habilidad de recuperación de la capacidad original mediante el tratamiento con la solución apropiada que desplace los iones retenidos por la resina y los reemplace por los deseados, regeneración de la resina (Nervárez, 2009).

A la corriente de alimentación proporcionada se le denomina corriente a diluir o diluido mientras que la corriente que se obtiene tras su paso se conoce como corriente diluida. Siendo la corriente receptora de los iones separados del diluido la conocida como corriente a concentrar o concentrado, esto será en función de si se encuentra a la entrada o a la salida.

Se conoce como disolución de lavado a la que se hace circular antes de comenzar el proceso para eliminar cualquier suciedad o materia extraña existente sobre la superficie.

2.3.3.- Tipos de resinas y propiedades

Las resinas se pueden clasificar en función de:

- Su estructura de red en: microporosas o tipo gel, macroporosas o macroreticulares y isoporosas.
- Según su grupo funcional: resinas catiónicas de ácido fuerte, catiónicas de ácido débil, resinas aniónicas de base fuerte, resinas aniónicas de base débil y resinas quelantes.

Las propiedades más significativas de las resinas son: tamaño de las partículas, solubilidad, forma, densidad, caída de presión, resistencia (Figura 2.13).

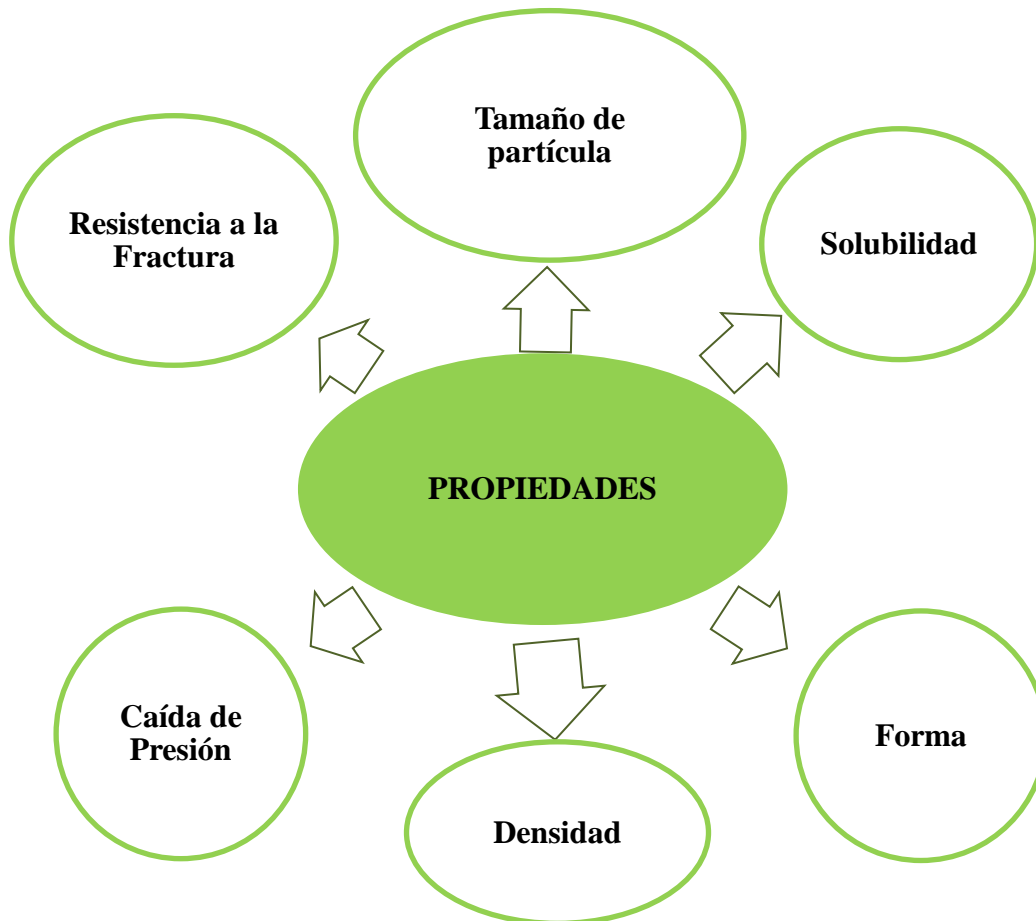


Figura 2.13. Propiedades más importantes de las resinas

2.3.4.- Intercambio iónico en columna

Las etapas llevadas a cabo en el proceso de intercambio iónico en columna aparecen descritas en el apartado 3.- Material y Métodos, 3.5.2.- Experimentación en columna, y en la siguiente Figura 2.15 adjunta.



Figura 2.14. Etapas en el proceso de intercambio iónico

La operación de intercambio iónico se ha realizado en columna para evitar las pérdidas de la resina y empleando un lecho fijo a través del cual fluye una disolución. Aunque también se podría hacer mediante tanque agitado. En el presente trabajo se trata la primera de las opciones por presentar un mayor número de ventajas.

Durante el inicio del proceso la mayor parte de la transferencia de materia tiene lugar a la entrada de la columna en la que se encuentra la resina, con el transcurso del mismo dicha zona se irá desplazando en el lecho, con el resultado de la saturación de la misma hacia zonas alejadas de la entrada hasta alcanzar el extremo inferior Figura 2.14. Como consecuencia a la resistencia de transferencia de iones que se genera se crea un gradiente de concentraciones, es el lugar donde se genera un mayor intercambio de los iones y se conoce con el nombre de zona de transferencia.

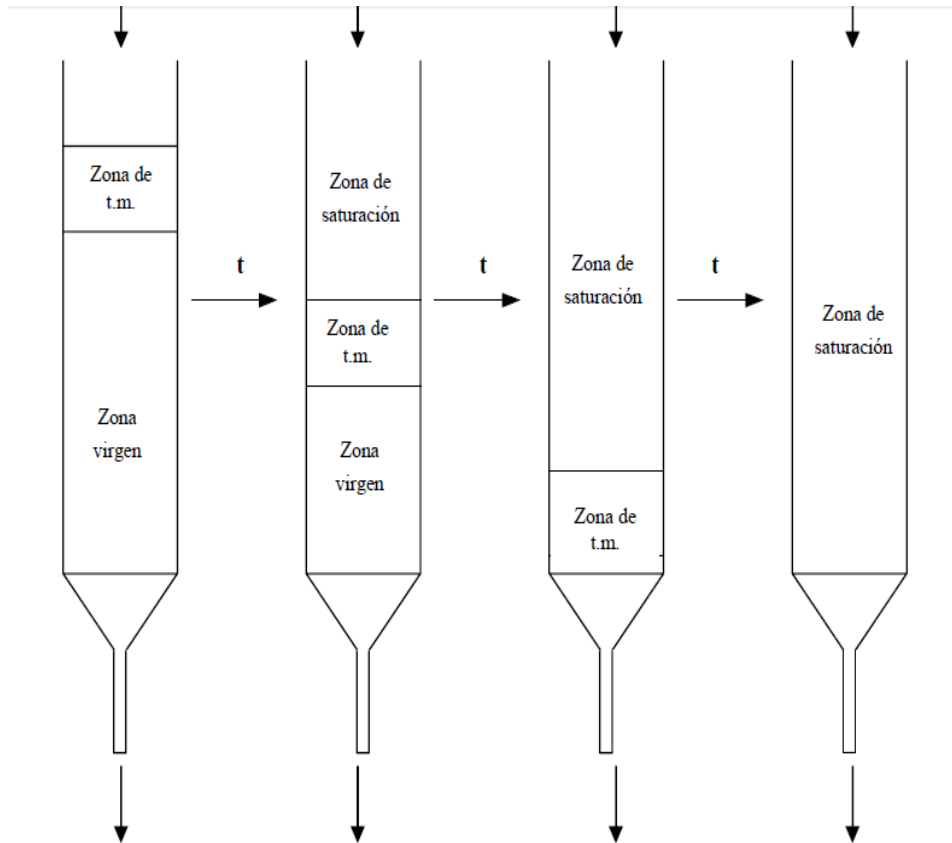


Figura 2.15. Evolución de la concentración en un lecho de intercambio iónico
(Gilarranz, 2006)

El tiempo transcurrido desde el comienzo de la operación en el lecho hasta que se alcanza la máxima concentración permisible en el efluente, se denomina tiempo de ruptura (t_R). Siendo en este momento cuando la corriente ha de ser derivada a un segundo lecho, que inicia el proceso de regeneración del primero. La curva que representa la evolución de la concentración del efluente que abandona el lecho recibe el nombre de curva de ruptura y aparece representada en la siguiente Figura 2.16.

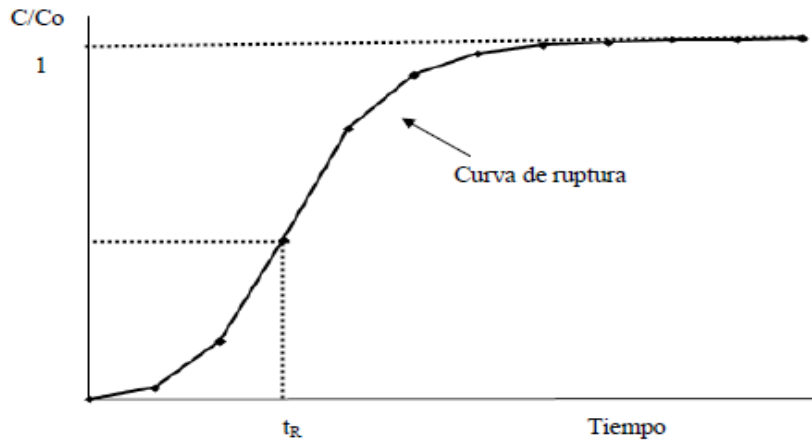


Figura 2.16. Diagrama concentración efluente-tiempo iónico (Gilarranz, 2006).

Se entiende por capacidad de la resina al valor de la concentración de iones que pueden ser retenidos por una unidad de peso de resina. Se considera un parámetro fundamental para la selección del intercambiador.

2.3.5.- Aplicaciones en la industria

Una de las aplicaciones más extendida es el uso de las mismas en el tratamiento de agua:

- ablandamiento de agua
- desmineralización parcial (ablandamiento y eliminación de carbonatos)
- desmineralización completa (sin o con eliminación de silicatos)

Otro claro ejemplo significativo de su uso es el que se desarrolla en el presente trabajo, purificando el ácido lactobiónico procedente del lactosuero.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.-DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

El equipo experimental de membranas empleado en el presente trabajo se utiliza a escala planta piloto como se muestra en la Figura 3.1 siendo desarrollado por ADEPRO INGENIERÍA S.L., gracias al mismo, se pudo llevar a cabo el estudio del comportamiento de las membranas, para posteriormente poder caracterizarlas correctamente.

La instalación se ha ubicado en una meseta de acero inoxidable modelo AISI 304, dotada de ruedas auto frenables para una mejor comodidad y limpieza en el uso. Consta de las siguientes partes: carcasa construida de acero inoxidable de longitud 600 mm, en cuyo interior se introducen las membranas (de Poli-éter-sulfona inicialmente seguida de la Membrana CéRAM) para ajustar la carcasa al resto del equipo se han usado unas juntas de goma sitas en la parte superior e inferior de la misma cuya sujeción se realiza con dos bridas de acero inoxidable ajustables. Las características principales de las membranas empleadas son las que aparecen en la siguiente Tabla 3.1:

Tabla 3.1. Características de las membranas empleadas

TIPO DE MEMBRANA	Membrana de poli-éter-sulfona, PES (Bergohf, Alemania)	Membrana CéRAM (Tami Industries, Nyons, France)
DIÁMETRO INTERNO	10,3 mm	10 mm
DIÁMETRO DE PORO	150 kDa	150 kDa
LONGITUD	600 mm	600 mm

En los ensayos de filtración se han empleado membranas tubulares. En el caso de la membrana de poli-éter-sulfona, se ha modificado su longitud para poder introducirla

en la carcasa. La membrana C eric usada consta de un soporte de óxido de titanio y una capa activa de ZrO_2/TiO_2 .

La alimentación de 5 L proporcionada se ha almacenado en un depósito de 20 L de capacidad, construido a partir de metacrilato transparente con tapa embridada y forma circular. Asimismo también consta de un difusor de aire con rotámetro, resistencia de calentamiento, sonda de temperatura, controlador digital, picaje para venteo del aire, vaciado y toma de muestras lateral.

La aspiración de la muestra se ha llevado a cabo por la parte inferior del tanque a través de una bomba de vacío (Mod :2CDXA 70/ 20). Gracias a la presencia del rotámetro (Mod: 6001/INOX-Tecfluid) el caudal podrá visualizarse y ajustarse debidamente. También se han registrado otros parámetros como son la presión a la entrada y a la salida de la carcasa con la ayuda de dos sensores digitales que se han visualizado en el armario eléctrico junto con la temperatura. Dichos controladores son de la marca Omron cuyo modelo es el E5CN, situados en armario de control, junto al interruptor general de funcionamiento, interruptor de activación de la resistencia y la seta de parada de emergencia para un uso más seguro del mismo.

La obtención del permeado se ha realizado mediante una válvula manual, mientras que el retenido ha de ser recirculado al depósito o bien evacuado también mediante válvulas manuales.

Para obtener un correcto entendimiento del funcionamiento del mismo a continuación se muestra una Figura 3.1 del equipo seguido de un esquema del mismo Figura 3.2.



Figura 3.1. Equipo de membranas

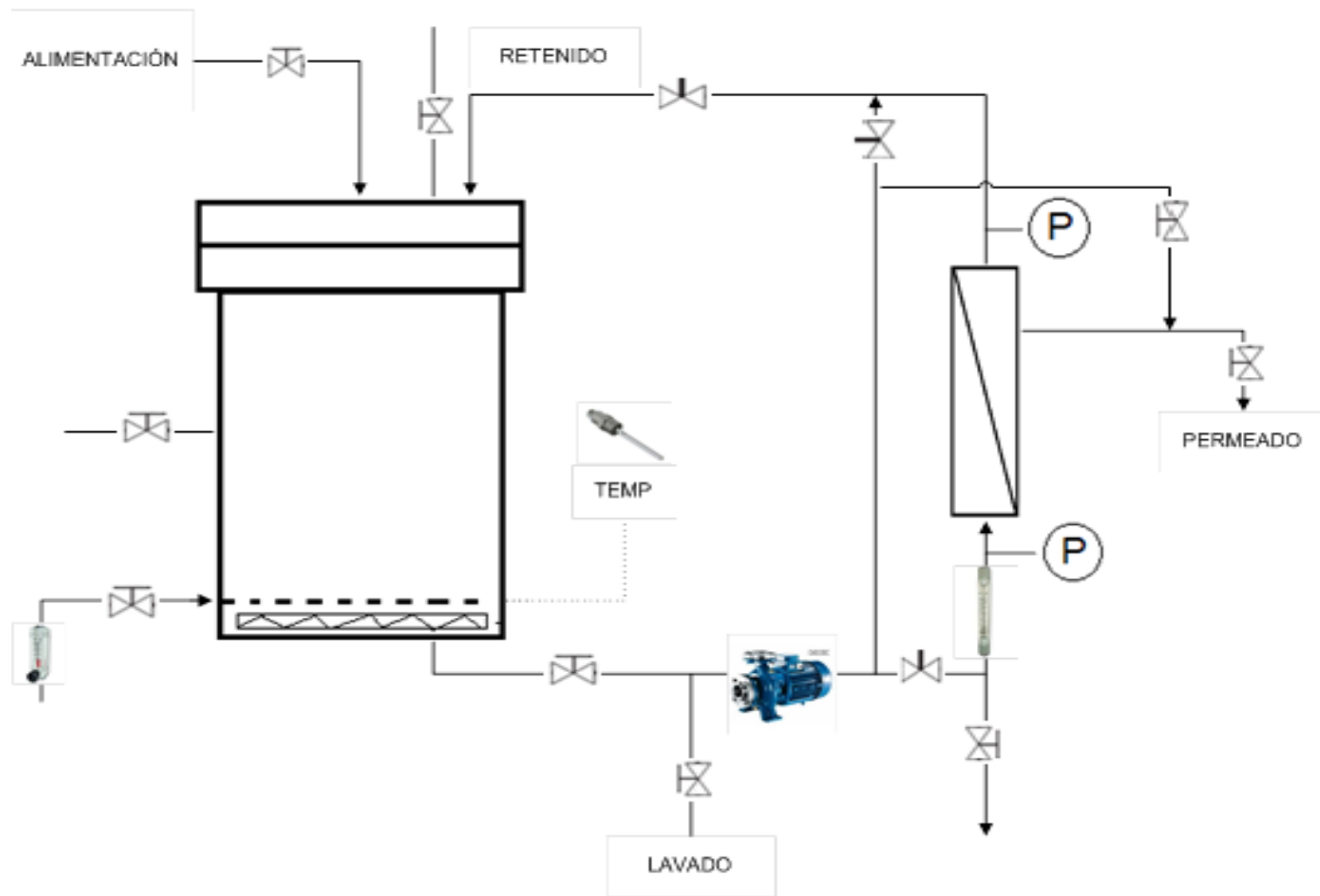


Figura 3.2. Esquema del equipo de membranas

3.2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS

3.2.1.- Con agua

Para la caracterización de las mismas empezamos llenando el tanque anteriormente descrito con 5L de agua, para observar el comportamiento frente a diferentes caudales (500 L/h, 600 L/h, 700 L/h, 800 L/h). Inicialmente se ha introducido en la carcasa de acero inoxidable la membrana de poli-éter-sulfona y a continuación se ha procedido al cambio para estudiar la membrana cerámica.

3.2.2.- Con suero

A continuación se introduce una disolución de 3 L de lactosuero dulce (ILAS S.A) y 2 L de agua para obtener un volumen final de 5 L nuevamente, y así mantener las mismas condiciones de trabajo. De la misma forma que se hizo en la caracterización con agua se sitúa en primer lugar la membrana plástica en la carcasa de acero inoxidable. Tras su colocación y ajuste comprobando que no existan pérdidas del líquido por ninguna de las uniones se procede al filtrado de los distintos líquidos. Debido a que el diámetro interno de la membrana plástica es mayor que el de la cerámica, muestra una mayor velocidad de filtración del permeado de ahí que se haya recogido el permeado en una probeta de 1000 mL. Con la ayuda de un cronómetro se han ido tomando notas de los tiempos una vez se han filtrado 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL y 1000 mL; dicho proceso se realiza por duplicado y con los siguientes caudales: 500L/h, 600 L/h, 700 L/h, y 800 L/h. Todos los caudales han sido ajustados con la ayuda del rotámetro situado en el lado derecho del tanque de alimentación.

Una vez finalizada la primera parte del proceso se ha procedido a realizar los mismos pasos con la membrana cerámica, en este caso la velocidad de filtrado será menor ya que el diámetro interno de la misma también es menor, por tanto circulará menos fluido. Necesitando más tiempo para filtrar la misma cantidad de muestra. Debido a esto, el proceso de ensuciamiento se agrava en comparación con la membrana de poli-éter-sulfona.

En este caso se ha usado una probeta de 250 mL, y los tiempos se fueron tomando a 30 mL, 50 mL, 70 mL hasta obtener los 250 mL citados anteriormente. Al igual que con la membrana de poli-éter-sulfona se ha realizado el proceso por duplicado y se han ido probando diferentes caudales (500 L/h, 600 L/h, 700 L/h, 800 L/h) para poder observar cuál era el comportamiento tomado por la membrana.

Tras finalizar los experimentos se ha procedido a realizar un protocolo de limpieza de las membranas realizando lo siguiente: inicialmente se ha vaciado del tanque gracias a una válvula que se encuentra en la parte inferior del mismo, para a continuación llenarlo de agua y así poder realizar la limpieza de la membrana plástica. El equipo estuvo funcionando una media hora aproximadamente en la que se dejó pasar por la membrana agua que se fue cambiando periódicamente hasta apreciar que el agua que recirculaba al tanque era incolora. Para asegurarse de que el proceso de limpieza había sido realizado con éxito, nuevamente se llena el tanque con agua hasta obtener 5 L (volumen óptimo de funcionamiento) y midiéndose los distintos tiempos para el llenado de una probeta de 1L, al comprobar que coincidían con los de la configuración de la membrana, proceso realizado al principio, concluyendo que el proceso de limpieza se había realizado con éxito. En el caso de la membrana cerámica se emplea un proceso más laborioso pues se utilizaron dos disoluciones, una alcalina (hidróxido sódico 15-20 g/L T^a 85°C- 30 min) y otra ácida (ácido nítrico al 58% 5mL/L T^a 50°C- 15 min), con un aclarado intermedio entre ambas y uno final para neutralizar la membrana. Para que se pudiese realizar la limpieza de la misma correctamente, se ha dejado unos minutos en el tanque de alimentación para que la resistencia eléctrica la calentase debidamente. Al igual que se hizo con la membrana de poli-éter-sulfona se han medido los tiempos de permeado con agua para cerciorarse de que fuesen aproximadamente los mismos que los empleados en las operaciones anteriores.

3.3.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA LACTOSA

Una vez concluido el proceso de filtrado a través de dos membranas distintas (cerámica y plástica) se prosiguió con la caracterización de las mismas mediante la determinación del contenido proteico y cuantificación de la lactosa presente en las muestras.

3.3.1.- Contenido proteico

Para la determinación de la cantidad de contenido proteico se siguió el método de Lowry modificado por Markwell, 1978. El cual consiste en lo siguiente:

Se preparan previamente las siguientes soluciones:

- Solución A: 2% Na_2CO_3 , 0,4% NaOH , 0,16% Sodium Tartrate, 1% SDS.
- Solución B: 4% $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$
- Solución C: 100 mL solución A + 1 mL solución B
- Reactivo de Folin: diluido 1:1 con agua destilada

Para la confección de la recta de calibrado se emplea BSA (Albumin from bovine Serum), enriquecida en un 96% , que ha sido proporcionado por la casa comercial Sigma-Aldrich. Las concentraciones para la realización de la recta patrón serán 200, 150, 100, 50 ppm.

Tras la adición de la solución correspondiente se debe de agitar para que se produzca la homogenización de las mismas. La longitud de onda que se ha empleado para la lectura es de 660 nm usándose una cubeta de cuarzo y el espectrofotómetro Helios γ (Thermoscientific). El método seguido se representa de forma esquemática en la siguiente Figura 3.3.

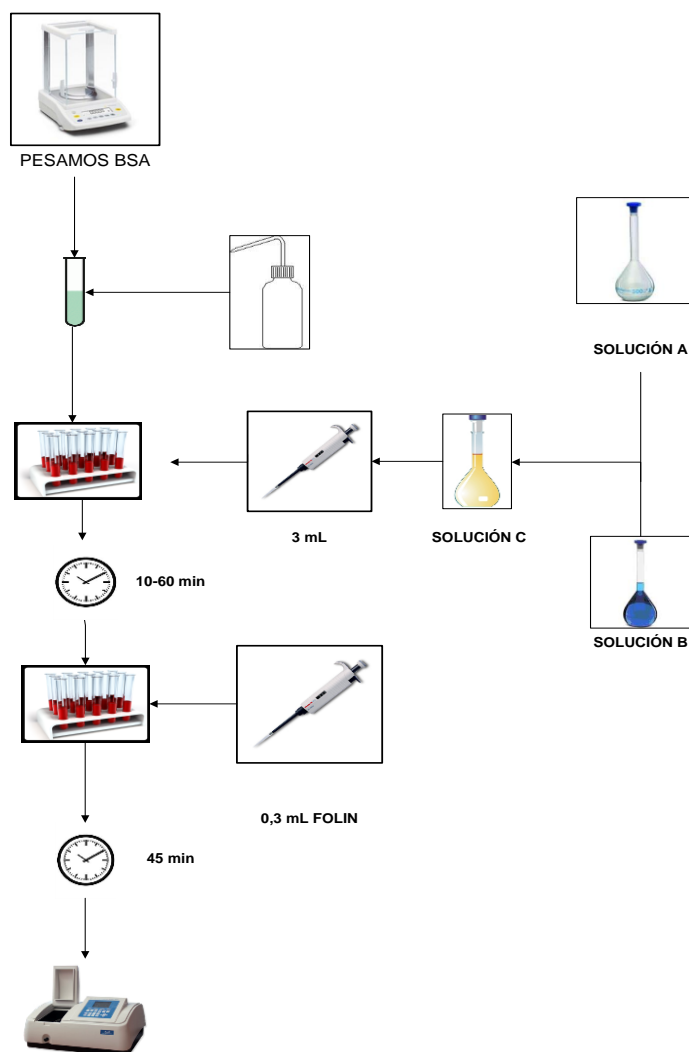


Figura 3.3. Esquema del proceso para la obtención de proteína

3.3.2.- Análisis cuantitativo de lactosa

El contenido de lactosa presente en la muestra fue analizado mediante Cromatografía de Alta Eficacia (HPLC) siguiendo el método descrito por Pedruzzi et al., 2007 con pequeñas modificaciones. Se han utilizado las siguientes condiciones analíticas 450 mM de H_2SO_4 como fase móvil (pH=3,1), una temperatura de la columna fijada en 75°C y un flujo de 0,3 mL/min. En la determinación y cuantificación analítica se ha empleado una columna ICsep ICE-ION-300 (Transgenomic Inc., San Jose, California, Estados Unidos), utilizando el índice de refracción como detector en un Cromatógrafo Agilent (modelo serie 1200, California, Estados Unidos). Las muestras fueron cuantificadas empleando standards externos de grado HPLC obtenidos de las

siguientes casas comerciales: lactosa (Chem Service) y ácido lactobiónico (Sigma-Aldrich). La adquisición y análisis de datos fue realizada con el software Agilent ChemStation. Siendo el equipo empleado el que se muestra en la Figura 3.4



Figura 3.4. Equipo de Cromatografía de Alta Eficacia

3.4.- ESTUDIO DE LA MEMBRANA CERÁMICA FRENTE AL FERMENTADO

Para poder evaluar el comportamiento de la misma frente a la presencia de biomasa se ha empleado el equipo descrito en el apartado 3.1. Usándose como fuente de alimentación el caldo de cultivo obtenido en la fermentación de lactosuero para la producción de ácido láctico en un biorreactor discontinuo (37°C, 264 h). El microorganismo que dirige la fermentación es una cepa de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (ATCC 393). El volumen obtenido del mismo tras la fermentación ha sido de 1820 mL que se ha llevado a 5 L con ayuda de agua para poder regular correctamente el rotámetro del equipo en 700 L/h, ya que si no entra aire e impide su ajuste. Acto seguido se han medido los tiempos del permeado recogido en una probeta de 250 mL con ayuda de un cronómetro (dicho proceso se ha hecho por duplicado).

3.5.- RESINA DE INTERCAMBIO IÓNICO⁽¹⁾

3.5.1.- Purificación del ácido lactobiónico con resinas de intercambio iónico

Para la recuperación del LBA, se han estudiado dos resinas de tipo intercambio aniónico, Lewatit MP500 y Lewatit S4428. En primer término, se ha trabajado con ácido lactobiónico con de más de un 97% de pureza (Sigma-Aldrich) y, una vez conocida las curvas de equilibrio y cinética, se ha empleado el suero lácteo fermentado. Las características principales de las resinas de intercambio iónico se describen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Características de las resinas MP500 y Lewatit S4428

	MP500	S44228
Forma iónica	Cl ⁻	Free base/Cl ⁻
Grupo funcional	Amina cuaternaria, tipo I	Amina terciaria/cuaternaria
Matriz	Poliestireno	Poliestireno
Estructura	Macroporosa	Macroporosa
Apariencia	Beige, opaco	Beige, opaco

El medio de cultivo natural que se ha empleado para la purificación a través de las resinas de intercambio iónico procede de la fermentación en lotes dirigida por una cepa de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (ATCC 393), durante 96h a 30°C.

¹ Los datos descritos en el punto 3.5 Resina de intercambio iónico han sido extraídos del trabajo de investigación de Janire Orcajo Lago que lleva por título "Procesos de purificación y separación del ácido lactobiónico por fermentación de suero lácteo para uso comercial".

La metodología experimental del intercambio iónico de las resinas, ha sido desarrollada en tres fases: acondicionamiento, carga, y elución.

3.5.2.- Experimentación en columna

➤ Descripción general del procedimiento

Los experimentos en columna se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20° C) en una columna Vantage-L32x250 (32 mm de diámetro y 250 mm de longitud), Millipore. La columna fue cargada con 3 g de la resina Lewatit S4428 (Figura 3.5). Las disoluciones se bombearon con un flujo de 5 mL/min a través de la resina.

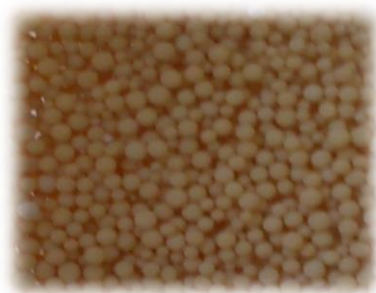


Figura 3.5. Resina Lewatit S4428

➤ Etapas a seguir

- a. Para el acondicionamiento de la misma, se bombeó NaOH 1M a 5 mL/min durante 20 minutos aproximadamente. Después se lavó con agua destilada a la misma velocidad durante unos 10 minutos. En esta etapa es necesario ajustar el flujo de la bomba para que esté preparada en la siguiente etapa.
- b. En los primeros ensayos de carga se utilizó una disolución de LBA comercial (97% proporcionado por la casa comercial Sigma-Aldrich) y, después, suero lácteo fermentado diluido 1:6. La carga se ha realizado a contracorriente y se han ido tomando muestras a diferentes tiempos, desde 0 a 70 minutos en el caso de LBA comercial y de 0 a 90 minutos para el suero lácteo fermentado (inicialmente cada minuto los primeros 5 min para a continuación cada 5 hasta los 20 y finalmente cada 10 hasta completar el experimento).

- c. Tras la carga se ha realizado un lavado con agua destilada durante 30 min a co-corriente con un flujo de 5 mL/min para así retirar los posibles restos que pudiesen existir en la resina de la muestra empleada.
- d. Para la elución de la resina, se pasó una solución de NaOH 0,5 M durante 30 minutos para el LBA comercial y 40 minutos para el suero lácteo fermentado.

En la Figura 3.6. se muestra la columna Vantage-L32x250 empaquetada con 3 g de resina Lewatit S4428, en la que se llevaron a cabo los experimentos.



Figura 3.6. Columna Vantage-L32x250

3.5.3.- Análisis cuantitativo del ácido lactobiónico

Para la determinación cuantitativa del ácido lactobiónico se ha usado el mismo procedimiento que para la cuantificación de lactosa descrita en el apartado 3.3.2 Análisis cuantitativo de lactosa. Obteniéndose los cromatogramas tipo que aparecen a continuación en la Figura 3.7 Capacidad de carga y 3.8 Elución

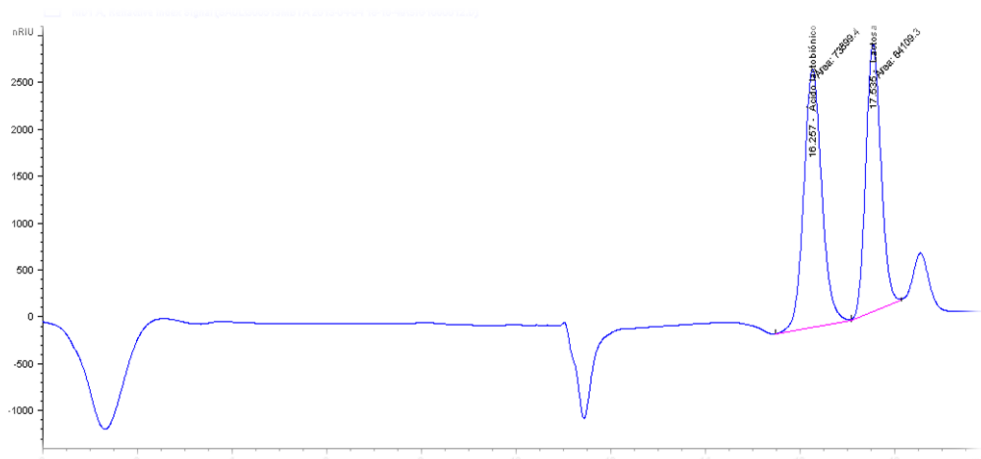


Figura 3.7. Cromatograma de la capacidad de carga obtenido del fermentado a tiempo 4 min

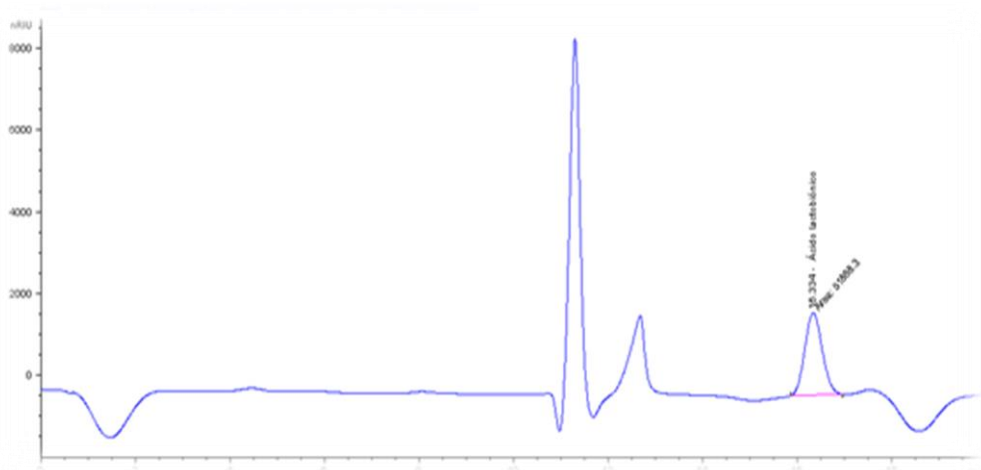


Figura 3.8. Cromatograma de la elución del lactobiónico obtenido del fermentado a tiempo 1 min

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- MEMBRANAS

En el proceso de separación con membranas el elemento primordial es la propia membrana como ya hemos mencionado a lo largo del trabajo. Por tanto, se han de conocer las propiedades, funciones y las fuerzas impulsoras que intervienen en el transporte a través de las cuales discurre la materia. Gracias a la diferenciación de las mismas se podrán modificar las variables que intervienen en el proceso para así poder obtener un máximo rendimiento.

En el presente trabajo se han utilizado dos membranas (cerámica y plástica) diferentes para poder estudiar el comportamiento de las mismas y así poder seleccionar cuál de ellas es la más apropiada emplear en el proceso de separación.

4.1.1.- Caracterización de las membranas

4.1.1.1.- Con agua

Para cada experimento se pretende determinar la variación del caudal del permeado con respecto al tiempo. Como se puede apreciar en las gráficas adjuntas (Figuras 4.1. y 4.2.), a mayor caudal menor tiempo de filtrado del permeado, en el caso de la membrana plástica.

Mientras que cuando estamos ante la membrana cerámica no se aprecia una diferencia tan significativa al modificar los caudales. Ya que todos ellos (500, 600, 700 L/h) presentan valores similares. Esto es debido al menor diámetro interno de la misma.

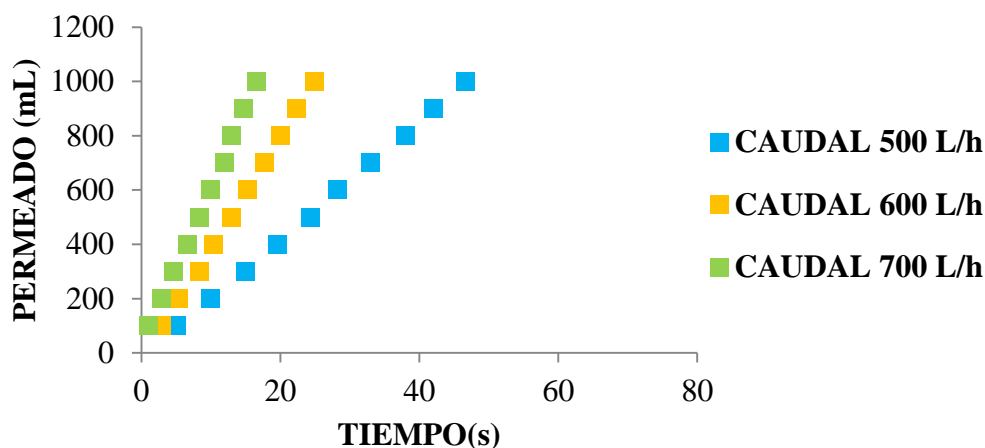


Figura 4.1. Caracterización con agua de la membrana plástica

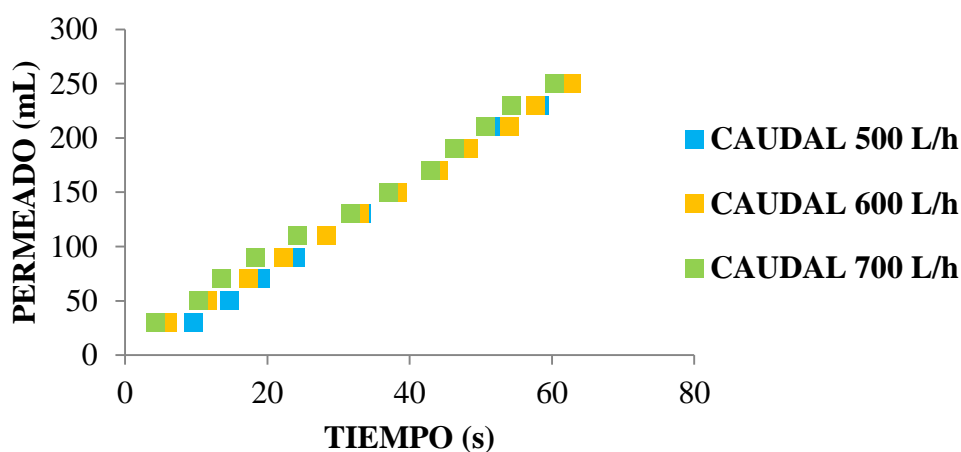


Figura 4.2. Caracterización con agua de la membrana cerámica

Asimismo cabe destacar que al estar ante membranas diferentes se han empleado volúmenes de permeado distintos siendo para la membrana plástica el volumen del mismo 1000 mL mientras que para el caso de la cerámica es de 250 mL. Esto es debido a que como estamos ante diámetros internos diferentes, la cantidad de fluido que circula a través de ella será distinto, siendo mayor en el caso de la membrana plástica ya que el diámetro interno es mayor (las características de las mismas se han descrito en la Tabla 3.1. Características de las membranas empleadas).

4.1.12.- Con suero lácteo

Para poder llevar a cabo la caracterización de las membranas se tomaron 3 litros de suero de leche (proporcionado por ILAS S.A.) que fueron mezclados con 2 litros de agua para poder trabajar con un volumen de alimentación final de 5 litros ya que sino el funcionamiento del rotámetro sería erróneo, debido a que su manipulación no podría ser llevada a cabo por coger aire. En este caso los caudales estudiados han sido 500, 600, 700, 800 L/h.

Los resultados mostraron comportamientos similares para los caudales de 500-600 L/h y 700-800 L/h en el caso de la membrana cerámica, datos que aparecen reflejados en la Figura 4.4. Mientras que la membrana plástica no presenta diferencias tan acusadas en los caudales empleados (Figura 4.3).

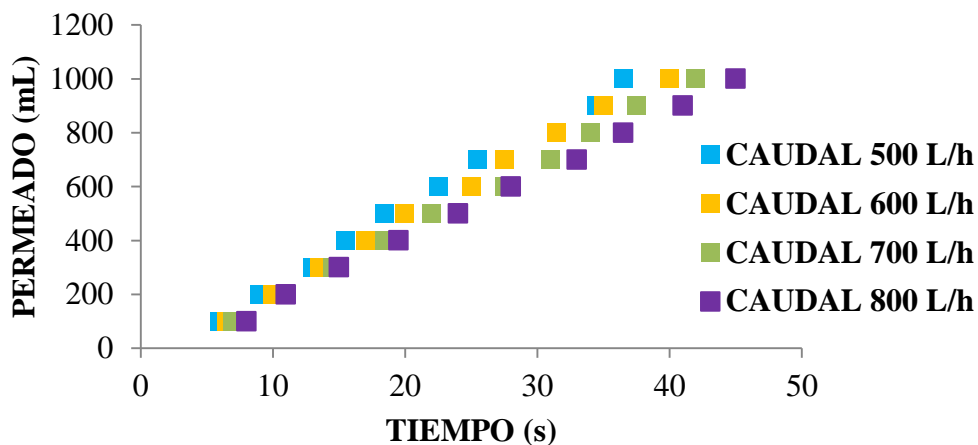


Figura 4.3. Comportamiento de la membrana plástica

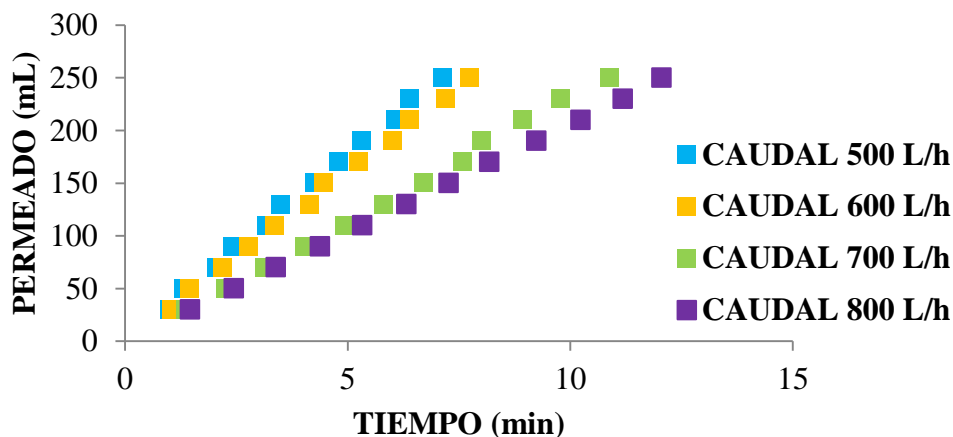


Figura 4.4. Comportamiento de la membrana cerámica

El tiempo medio de permeado para un volumen de 250 mL es de 12,13 segundos en el caso de membrana plástica frente a los 9,46 segundos en la membrana cerámica. Siendo el líquido obtenido menos selectivo ya que al tener un diámetro interno mayor hay un mayor volumen de paso. Asimismo hay que destacar que la composición de las mismas también influye significativamente, proporcionando un permeado más selectivo la membrana cerámica. De ahí la importancia de la elección del material escogido para la elaboración de la misma (Cheryan, 1998).

Si nos fijamos en la Figura 4.4, podemos apreciar cómo con un caudal de 800 L/h inicialmente necesitaremos menos tiempo para obtener el mismo volumen de filtrado, sin embargo tras la estabilización del flujo los valores de la velocidad de filtrado que se obtienen son del mismo orden que para caudales menores 500 L/h y 600 L/h (500 L/h-252,59; 600 L/h-250,08; 700 L/h-250,47; 800 L/h 248,50). Esto puede ser debido a que se esté produciendo una mayor retención en la membrana cuando trabaja con caudales más altos, lo que reduce el diámetro de poro causando una menor permeabilidad de la misma (Beolchini et al., 2004).

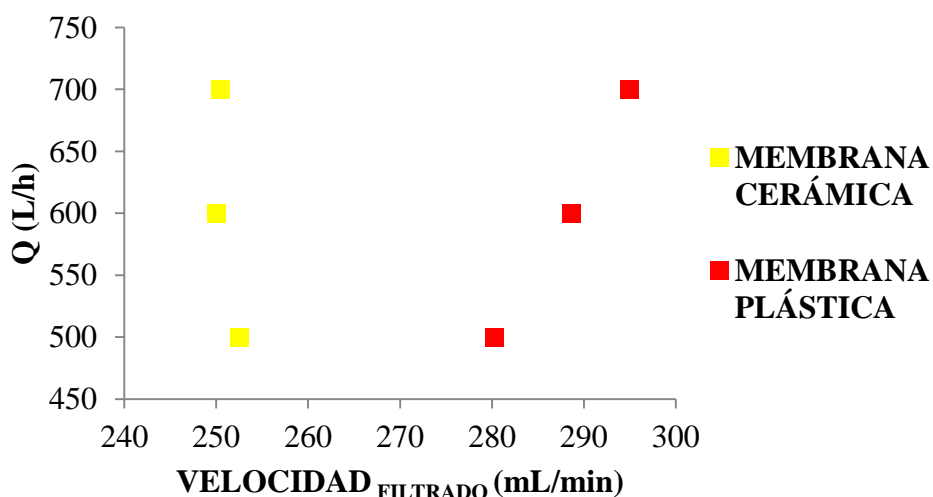


Figura 4.5 Comparación del comportamiento de las membranas frente a distintos caudales

En la Figura 4.5 podemos apreciar como el comportamiento de las membranas empleadas es totalmente antagónico ya que a menor caudal tenemos una mayor

velocidad de filtrado, en el caso de la membrana cerámica. Mientras que en la plástica a mayor caudal habrá una mayor velocidad de filtrado.

Tras la realización de los distintos filtrados se ha realizado un protocolo de limpieza descrito en el apartado 3.3. Material y Métodos.

4.1.2.- Determinación del contenido proteico y análisis cuantitativo de la lactosa

Para poder determinar el contenido proteico de las muestras se empleó el Método de Lowry modificado por Markwell, 1978 (descrito en el apartado 3.3.1).

Se realiza el análisis del contenido proteico por espectrofotometría por lo que las muestras tuvieron que ser diluidas 1:10 en el caso de las obtenidas tras el filtrado mediante membrana cerámica y 1:20 para la membrana plástica. Los datos obtenidos en el estudio son los que aparecen en la siguiente Tabla 4.1

La pérdida de proteína que se observa en el empleo de las diferentes membranas es mayor en el caso de la membrana plástica que en el de la cerámica.

La membrana plástica nos proporciona muestras con una mayor turbidez, esto es debido a la mayor cantidad de contenido proteico existente. Por tanto podríamos decir que el contenido proteico y la turbidez son dos parámetros proporcionales. De tal manera que la muestra cuanto más turbia esté mayor proteína tendrá.

También habría que tener en cuenta la presencia de minerales existente en el suero, ya que estos pueden precipitar creando puentes entre proteínas y membrana, dando lugar a una mayor retención de las proteínas. Por tanto la caracterización previa del lactosuero empleado se evidencia como un punto importante en el proceso.

Existen estudios (Muñi et al., 2005) donde se muestra la relación constante existente entre la presión empleada y el porcentaje de proteína obtenido, mientras que en el caso de otros componentes como son los minerales y la sacarosa aumentan su contenido con el incremento de la presión.

En lo que respecta al contenido de lactosa presente en las muestras tras su determinación mediante la inyección de las muestras en HPLC (descrito en el apartado

3.3.2. Análisis cuantitativo de lactosa). Los datos obtenidos son los que aparecen recogidos en la Tabla 4.2.

Tabla 4.1. Concentración de proteínas en el permeado según el flujo en las dos membranas empleadas

Q (L/h)	MP	MC	C _{TANQUE} (g/mL)
	C (g/mL)	C (g/mL)	
0	0,00	0,00	6,98
500	3,62	1,97	
600	3,38	1,84	
700	3,39	1,61	
800	3,45	1,34	

Tabla 4.2. Comparación de la cantidad de lactosa existente en los permeados obtenidos con las dos membranas

Q (L/h)	MP	MC	C _{TANQUE} (ng/ μ L)
	C (ng/ μ L)	C(ng/ μ L)	
0	0,00	0,00	1232,37
500	1376,38	942,50	
600	1281,81	927,00	
700	1350,90	956,00	
800	1288,10	846,50	

Tras el análisis de los mismos podemos destacar que la membrana cerámica empleada, no pierde apenas lactosa mientras que la membrana plástica permite el paso de la misma a través de ella.

Gracias a las determinaciones realizadas concluimos que el comportamiento de la membrana cerámica es más favorable ya que la pérdida de contenido proteico de la mezcla de suero analizada es menor. Asimismo también debemos destacar que con el uso de la membrana cerámica se ha tenido una pérdida de un 2% del contenido de lactosa.

Con esto podemos reseñar que la membrana cerámica presenta un comportamiento más favorable para la separación de la lactosa y la proteína. Consecuentemente a continuación procederemos al estudio de la misma frente a la presencia de biomasa obtenida tras la fermentación dirigida por *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (ATCC 393).

4.1.3.-Estudio de la membrana cerámica frente al fermentado

Para poder realizar dicho estudio se han empleado 1820 mL obtenidos de la fermentación (siendo las características principales de la misma las descritas en el apartado 3.4) que se han llevado a un volumen final de 5 litros para el correcto funcionamiento del equipo. El objetivo de este estudio es observar el comportamiento que muestra la membrana frente a la presencia de biomasa. Como se puede observar en la Tabla 4.3 adjunta el tiempo empleado para el filtrado del suero (3 litros suero + 2 agua) es menor en comparación con el necesario para el filtrado del medio obtenido de la fermentación (1820 mL medio fermentado + 3180 mL agua) presentando un valor medio de 6,12 y 6,49 respectivamente. Como consecuencia de la presencia de biomasa en esta segunda disolución. A pesar de ello no hay grandes diferencias si se comparan las dos gráficas (Figura 4.6), ya que los tiempos son muy similares, cabe desatacar que en el caso que estamos estudiando en la filtración se ha generado grandes cantidades de espuma. Dicha espuma es causada por la desnaturalización de las proteínas. Por el incremento de la temperatura de la alimentación, fruto de la recirculación del fluido, desnaturalizándolas y causando algunas dificultades operacionales por tanto sería un factor importante a tener en cuenta el control de la temperatura de trabajo.

Tabla 4.3. Comparación de las velocidades obtenidas a partir de dos muestras (fermentación y lactosuero)

V_{PERMEADO} (mL)	FERMENTACIÓN		SUERO	
	T (min)	V_{Filtrado}(mL/min)	T (min)	V_{Filtrado}(mL/min)
30	1,27	27,47	1,37	31,41
50	2,27	48,84	2,26	51,89
70	3,29	70,98	3,13	72,02
90	4,27	92,14	4,04	92,96
110	5,21	112,22	4,93	113,33
130	6,04	130,11	5,81	133,58
150	6,93	149,45	6,71	154,40
170	7,81	168,30	7,59	174,54
190	8,76	188,75	8,02	184,43
210	9,72	209,50	8,93	205,37
230	10,64	229,46	9,80	225,39
250	11,68	251,72	10,89	250,47

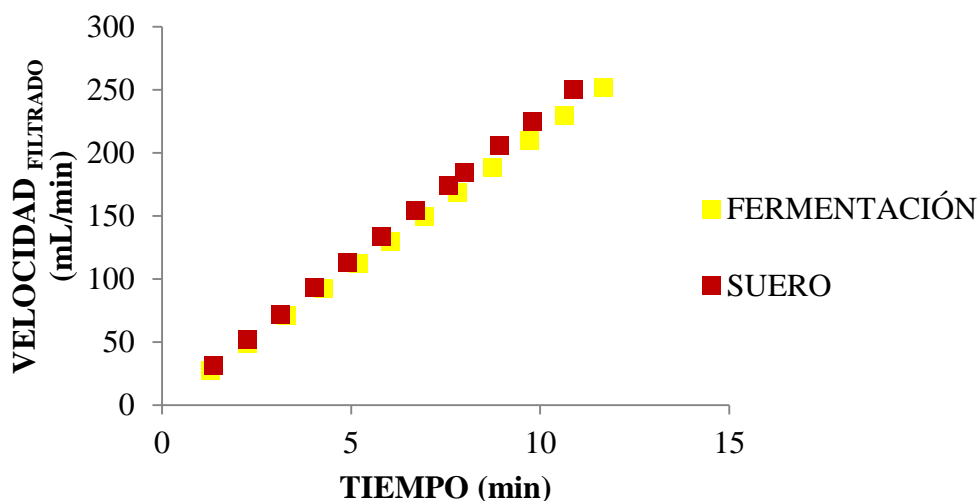


Figura 4.6 Comparación de la velocidad de filtrado frente al tiempo del fermentado y el suero

La temperatura se convierte en un factor importante a tener en cuenta como hemos mencionado anteriormente. Por afectar además a la viscosidad de los fluidos, generando un mayor ensuciamiento de la membrana. A su vez destacar el efecto de la misma en el Ca presente en la muestra, ya que si se mantiene el proceso a temperaturas mayores a 30°C, se verá afectado en su solubilidad generando un mayor ensuciamiento generado por las incrustaciones del fosfato de calcio.

Los datos de filtrado mejorarían notablemente si se tratara previamente la alimentación por ejemplo con un simple centrifugado ya que así se eliminarían por ejemplo los restos de grasa existentes en la muestra, o con métodos más novedosos como la electrocoagulación (Prieto et al., 2012) entre otros. Con ello se reduciría el ensuciamiento que se genera en la membrana.

La tendencia de la presión transmembranal existente en la membrana durante el filtrado del fermentado es descendente como se muestra en la Figura 4.7

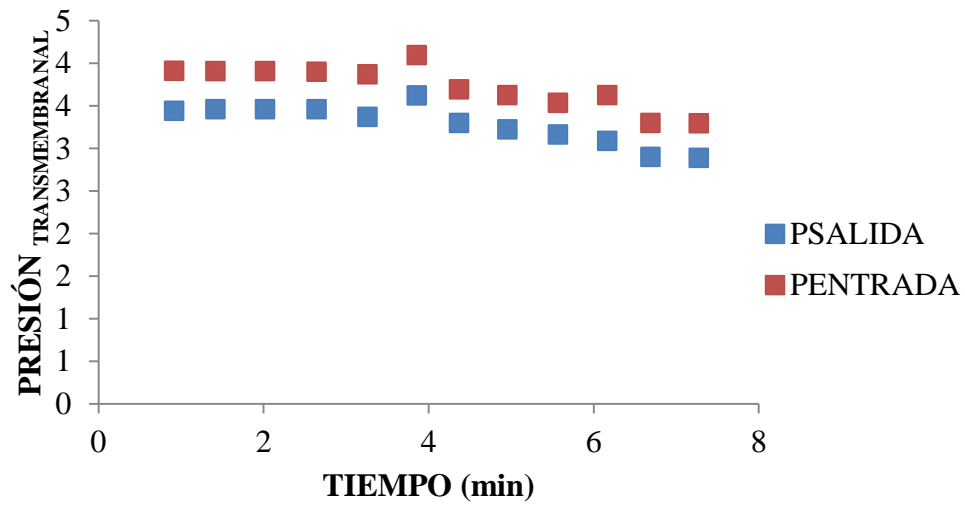


Figura 4.7. Comparación de las presiones transmembranales (entrada y salida) existentes en la membrana cerámica

4.2.- RESINA DE INTERCAMBIO IÓNICO

4.1.2.- Purificación del ácido lactobiónico por intercambio iónico⁽²⁾

4.1.1.1.-Equilibrio de intercambio iónico

❖ Determinación de la relación L/S óptima

Las Tablas 4.4 y 4.5 muestran la concentración final de LBA para distintas relaciones L/S con la resina MP500 y S4428, respectivamente. Todos los experimentos se han llevado a cabo con una concentración inicial de 100 ppm LBA comercial.

Tabla 4.4. Concentración de LBA en la resina MP500 y en la disolución a diferentes relaciones L/S

MP500		
L/S	[LBA]disolución (g LBA/L disolución)	[LBA]resina(g LBA/L resina)
250	0,03	26,45
400	0,010	52,39
600	0,020	52,48

² Los puntos: 4.1.2 y 4.2.2 han sido extraídos del trabajo de investigación de Janire Orcajo Lago que lleva por título “Procesos de purificación y separación del ácido lactobiónico por fermentación de suero lácteo para uso comercial”.

Tabla 4.5. Concentración de LBA en la resina S4428 y en la disolución a diferentes relaciones L/S

S4428		
L/S	[LBA]disolución (g LBA/L disolución)	[LBA]resina(g LBA/L resina)
250	0,015	22,42
400	0,021	33,30
600	0,037	40,33
800	0,062	35,82

La relación L/S óptima para la recuperación de LBA comercial con resinas de intercambio iónico es de 400 para Lewatit MP500 y 600 para Lewatit S4428, como puede observarse en las Figuras 4.8 y 4.9, respectivamente.

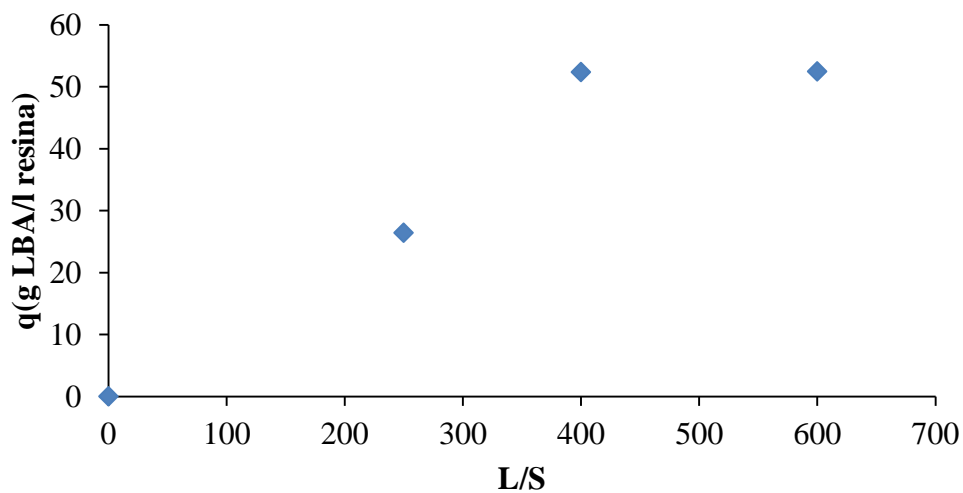


Figura 4.8. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit MP500 a distintas relaciones L/S

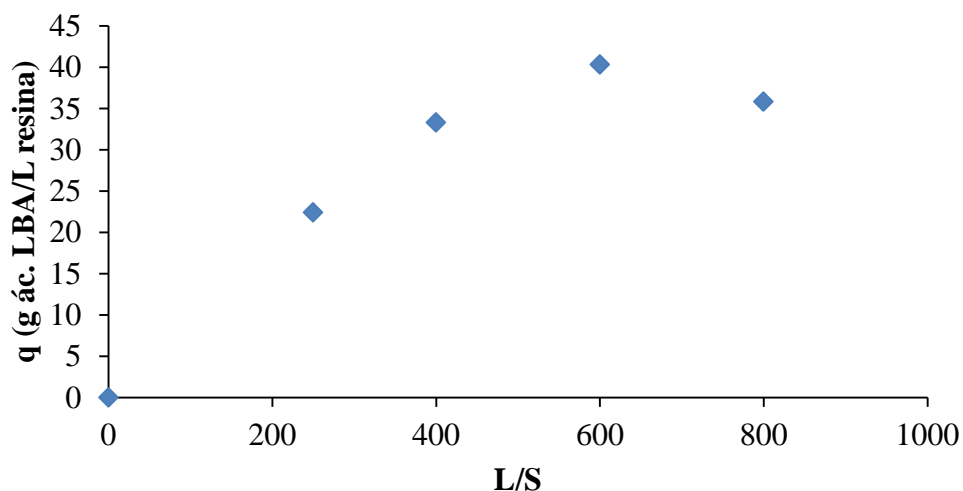


Figura 4.9. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit S4428 a distintas relaciones L/S

❖ Determinación de la capacidad máxima de la resina

Por lo general, no se emplean concentraciones superiores a 5 g/L en procesos de intercambio iónico con resinas. Sin embargo, se ha deseado estudiar concentraciones superiores dado que el suero lácteo fermentado puede llegar a contener hasta 48 g/L de LBA. Así, se han realizado ensayos con concentraciones iniciales de LBA de 100 a 100 000 ppm a las relaciones L/S óptimas para cada resina.

Las Tablas 4.6 y 4.7 muestran la capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit MP500 a distintas concentraciones y L/S 400 y la capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit S4428 a distintas concentraciones y L/S 600, respectivamente.

Tabla 4.6. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit MP500 a distintas concentraciones y L/S 400

MP500			
[LBA] inicial (g/L)	t equilibrio (min)	[LBA] equilibrio (g/L)	q (g LBA/L resina)
1	120	0,043	26,71
25	120	24,38	37,74

Tabla 4.7. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit S4428 a distintas concentraciones y L/S 600

S4428			
[LBA] inicial (g/L)	t equilibrio (min)	[LBA] equilibrio (g/L)	q (g LBA/L resina)
1	120	0,671	196,15
10	120	7,800	243,41
25	120	24,566	277,06

Los experimentos de equilibrio han demostrado que la tecnología de resinas de intercambio iónico con Lewatit MP500 y S4428 no son óptimas para concentraciones superiores a 25 000 ppm de LBA.

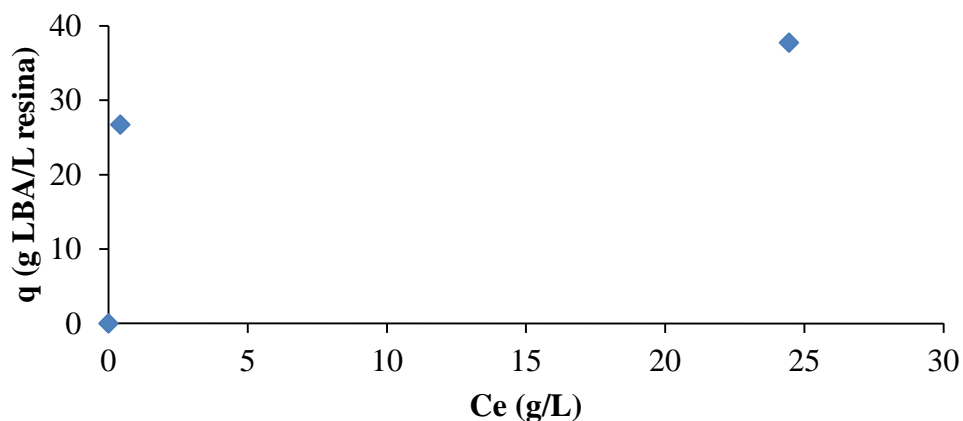


Figura 4.10. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit MP500 a distintas concentraciones y L/S 400

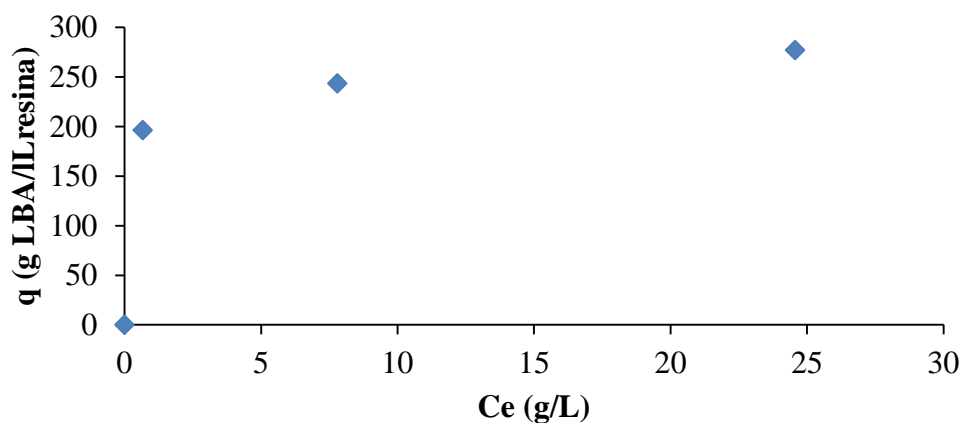


Figura 4.11. Capacidad de retención de LBA de la resina Lewatit S4428 a distintas concentraciones y L/S 600

Como se observa en las Figuras 4.10 y 4.11, concentraciones de hasta 25 000 ppm de LBA pueden estudiarse para las resinas Lewatit MP500 y S4428. La resina Lewatit S4428 parece presentar mayor capacidad de retención que la MP500, por ello se empleará para los próximos experimentos.

❖ Isotermas de equilibrio: Langmuir y Factor constante de separación

Los resultados experimentales obtenidos en el equilibrio de intercambio iónico se han ajustados a dos isotermas: la isoterma de Langmuir y la isoterma del Factor constante de separación. El resultado se ha expuesto en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Constantes de las isotermas de Langmuir y del Factor Constante de Separación

	Keq Lang	QT Lang (g/l resin)	Keq CSF	QT CSF (g/l resina)	CT CSF
MP500	5,4	38,0	62,9	37,4	11,4
S4428	4,3	265,3	201,6	264,1	46,6

Las Figuras 4.12 y 4.13 muestran una adecuada correlación entre los datos experimentales y su ajuste a las isotermas objeto.

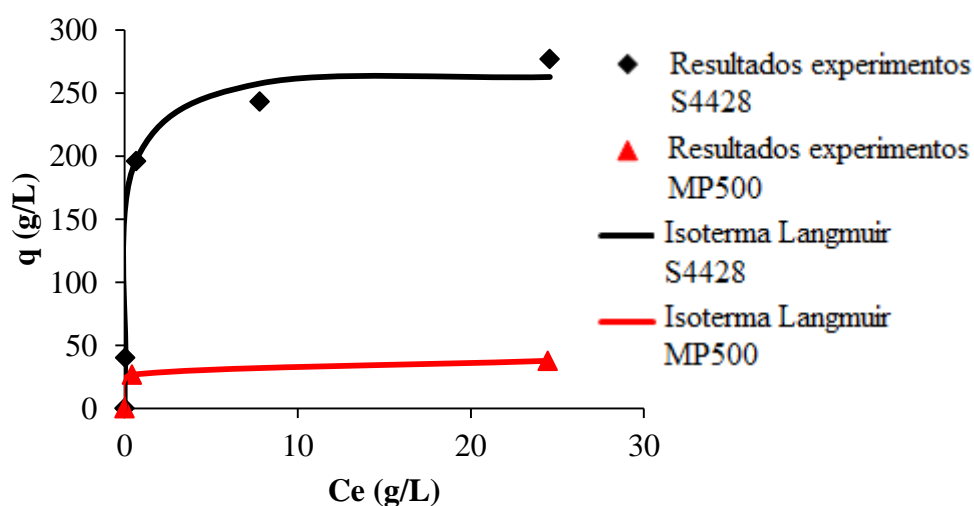


Figura 4.12. Isoterma de Langmuir para Lewatit MP500 y S4428

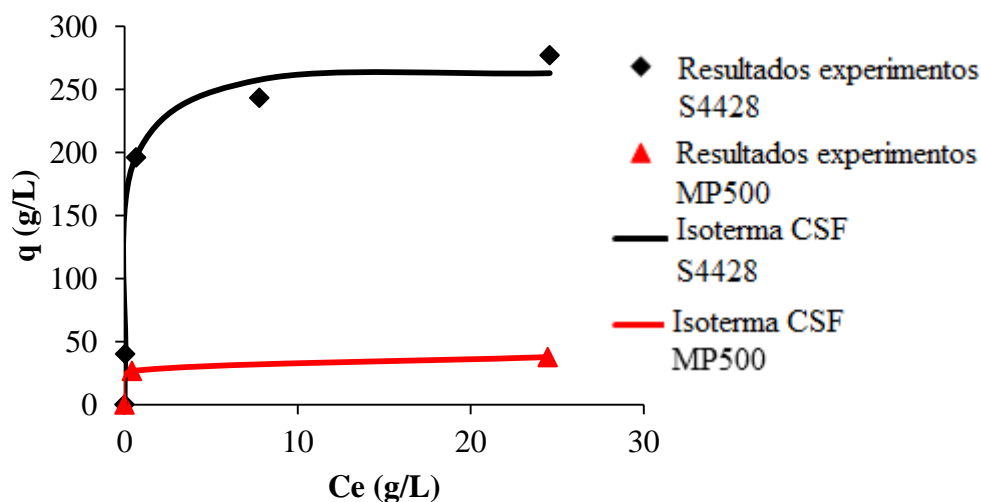


Figura 4.13. Isoterma del Factor Constante de Separación para Lewatit MP500 y S4428

4.2.2.- Cinética de intercambio iónico

La mayor parte de los procesos de intercambio iónico con resinas se han llevado a cabo en columna pero para ello han de realizarse unos estudios cinéticos previos en tanque agitado para la determinación de una serie de parámetros necesarios en el tratamiento en columna, así como para conocer la etapa controlante del proceso de intercambio.

Se ha estudiado la cinética de 1 000 ppm de LBA durante 2 h a una relación L/S 400 para la resina Lewatit MP500 y a L/S 600 para S4428. El resultado experimental ajustado al modelo de difusión a través del poro de la partícula y al modelo transferencia de masa a través de la película se muestra en las Figuras 4.14 y 4.15, respectivamente.

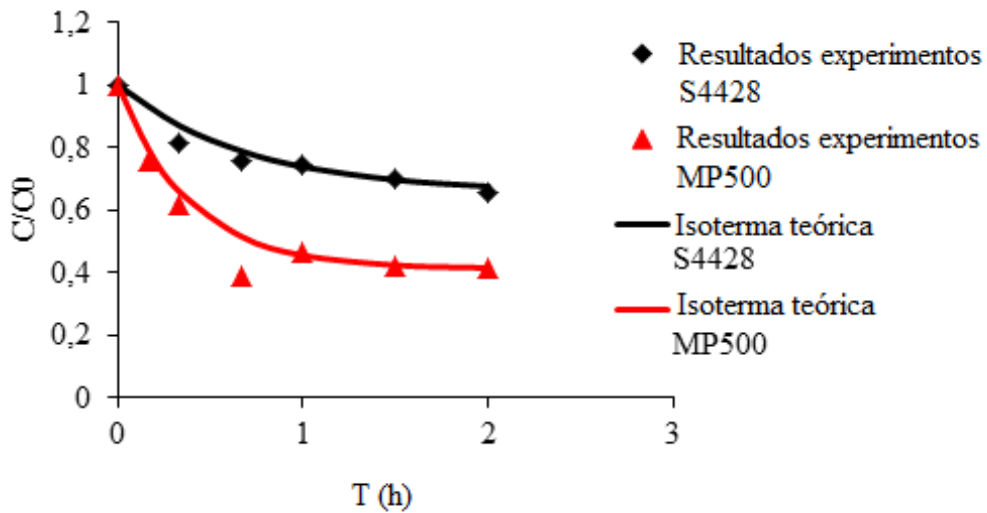


Figura 4.14. Ajuste de los datos experimentales al modelo de difusión a través del poro de la partícula

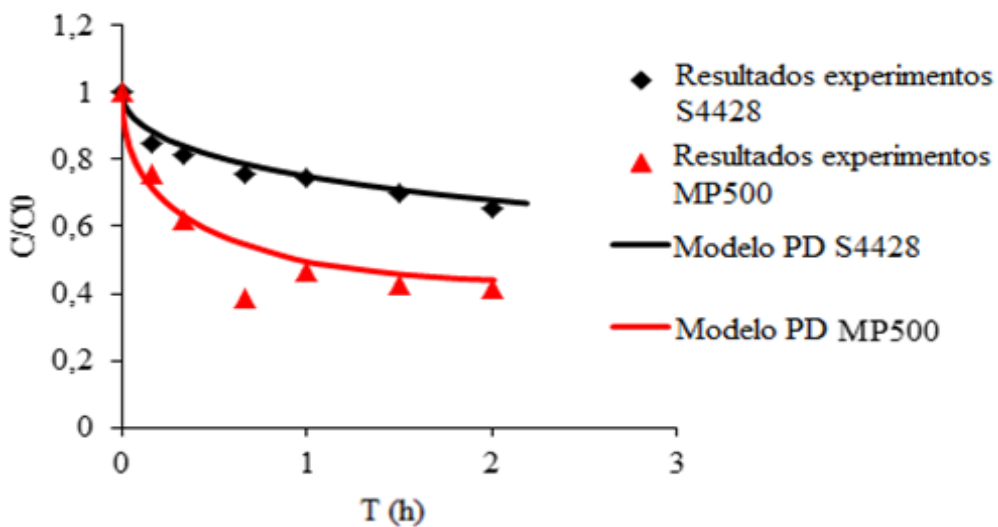


Figura 4.15. Ajuste de los datos experimentales al modelo de transferencia de masa a través de la película

Los estudios cinéticos permiten conocer el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Para el LBA, a las condiciones estudiadas, 120 minutos se consideran suficientes para llegar al equilibrio del intercambio, tal y como muestran las Figuras 4.14 y 4.15.

Los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 4.9:

Tabla 4.9. Parámetros cinéticos

	Kf (cm/s)	Dp (cm²/s)
MP500	2,56 10 ⁻³	1,0 10 ⁻³
S4428	2,02 10 ⁻³	2,0 10 ⁻⁴

4.2.2.- Operación en columna

Las operaciones en columna llevadas a cabo se han realizado con la resina Lewatit S4428 por considerar, tras unos estudios realizados anteriormente que es la resina que presenta una mayor capacidad de carga.

La mayoría de los procesos industriales de purificación con resinas de intercambio iónico se hacen en columna ya que el procedimiento en tanque agitado puede provocar pérdida en la capacidad de la resina debido a la rotura de las partículas de la misma consecuencia de la agitación.

4.2.3.1.- Carga

Gracias a estudios realizados previamente por Janire Orcajo se determinó que la resina Lewatit S4428 era la más apropiada para continuar la experimentación del presente trabajo. Por tanto se empaquetará la columna con 3 g de resina Lewatit S4428 para su posterior acondicionamiento durante 30 minutos (20 minutos de NaOH seguido de un aclarado con agua durante 10 minutos). Seguido del proceso de carga, que se realizará a contracorriente para que exista una mejor interacción entre el líquido y la resina como se muestran en las Figuras 4.16, 4.18, 4.19 y con un flujo de 5 mL/min.

En el caso de la Figura 4.17 la carga se hizo a co-corriente, presentando una menor interacción.

En la carga, inicialmente se emplea un medio comercial. Preparado a partir de 1 g/L LBA (riqueza 97%, suministrado por la casa comercial Sigma-Aldrich). Siendo el comportamiento de la resina ante este medio el que se muestra en la Figura 4.16.

Una vez terminada la carga y la elución con el medio sintético, se hará lo mismo con los medios naturales. El suero fermentado empleado primeramente ha sido filtrado mediante el equipo de membranas para retirar las impurezas que pudiese presentar tras la fermentación (biomasa, sales, etc.) A continuación se diluyen las muestras 1:6 dado que la concentración de LBA en el mismo es demasiado elevada para poder proceder con el experimento. (Figura 4.17; 4.18; 4.19.)

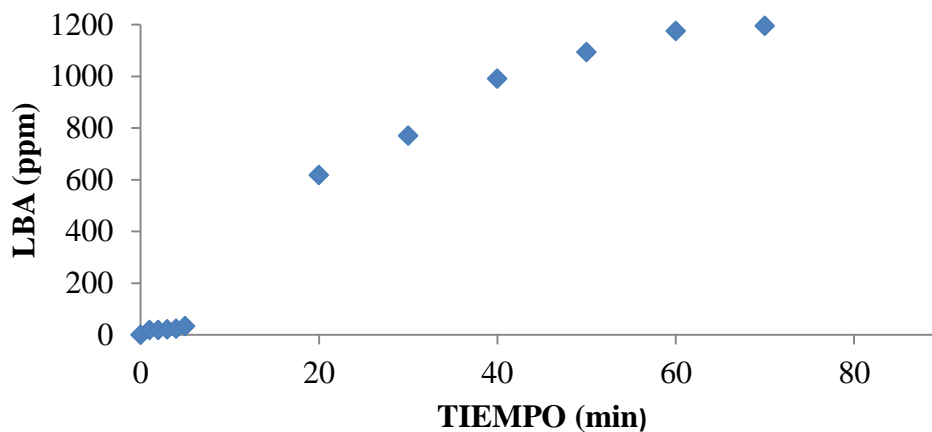


Figura 4.16. Carga de la resina Lewatit S4428 con LBA comercial

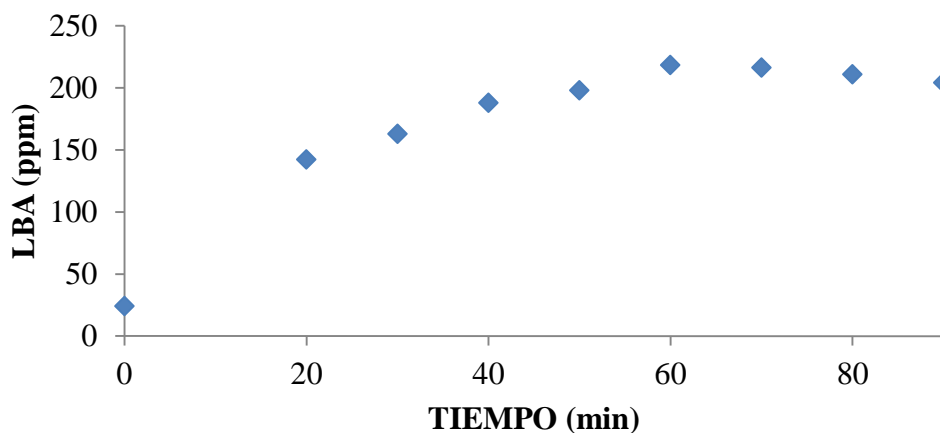


Figura 4.17. Carga de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 1

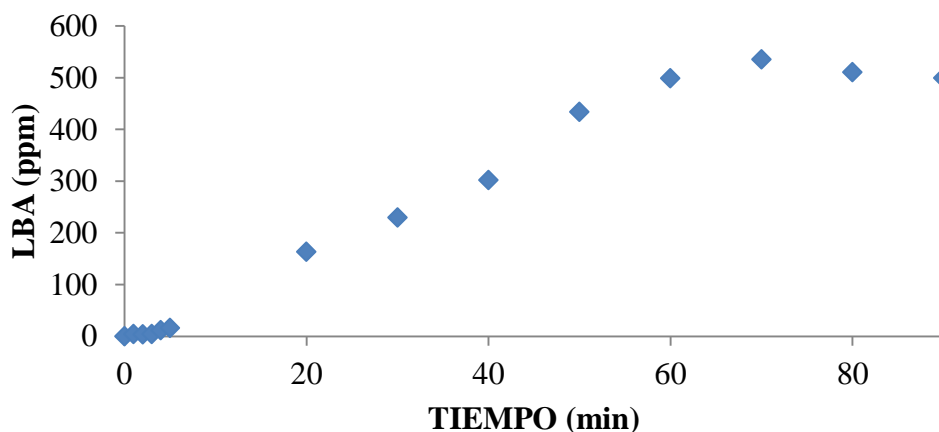


Figura 4.18. Carga de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 2

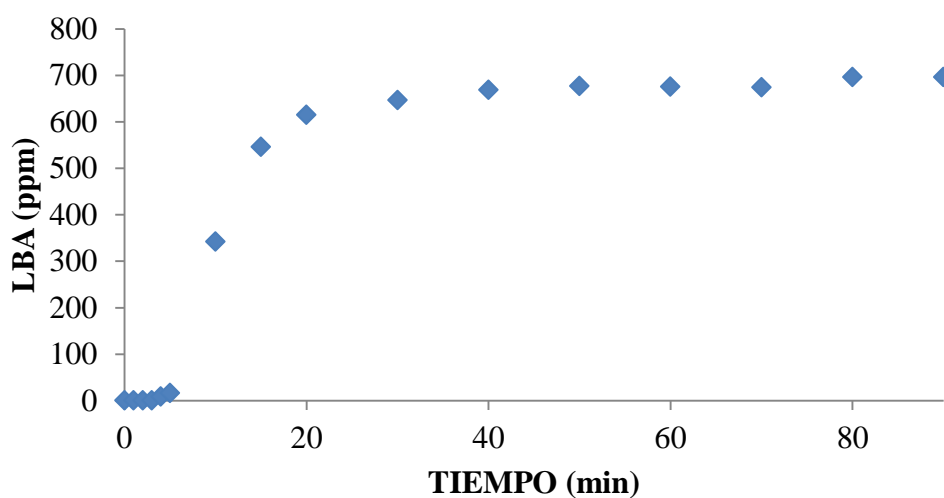


Figura 4.19. Carga de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 3

4.2.3.2.-Elución

Para la realización de la elución se hizo a co-corriente en todos los casos empleando sosa 0,5 M, con un flujo de 5 mL/ min. Previamente se hizo circular agua también a co-corriente con un flujo de 5 mL/ min para eliminar los posibles restos que pudiesen quedar de la carga, dicho proceso se realizó durante 30 minutos manteniendo el flujo constante.

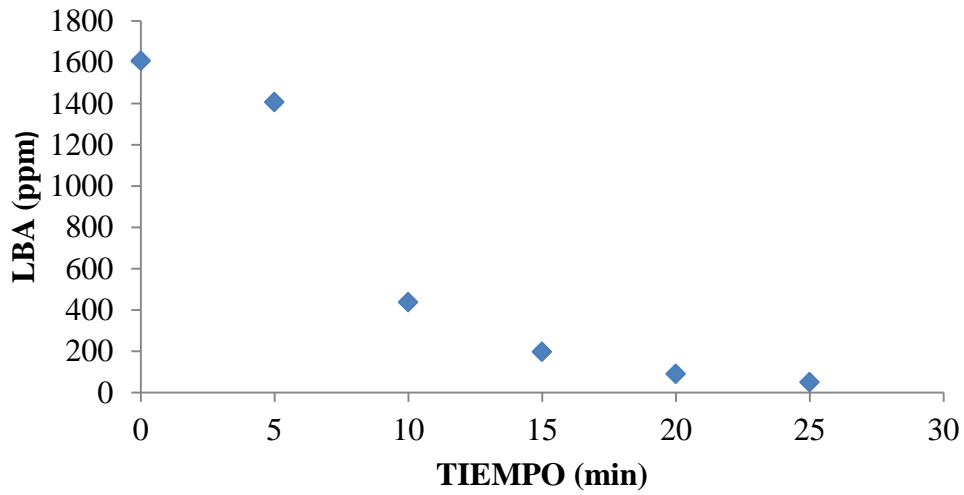


Figura 4.20. Elución de la resina Lewatit S4428 con LBA comercial

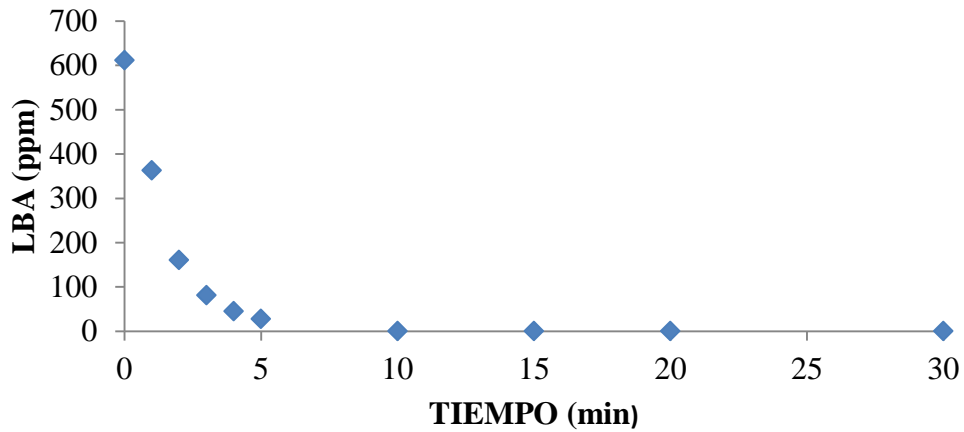


Figura 4.21. Elución de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 1

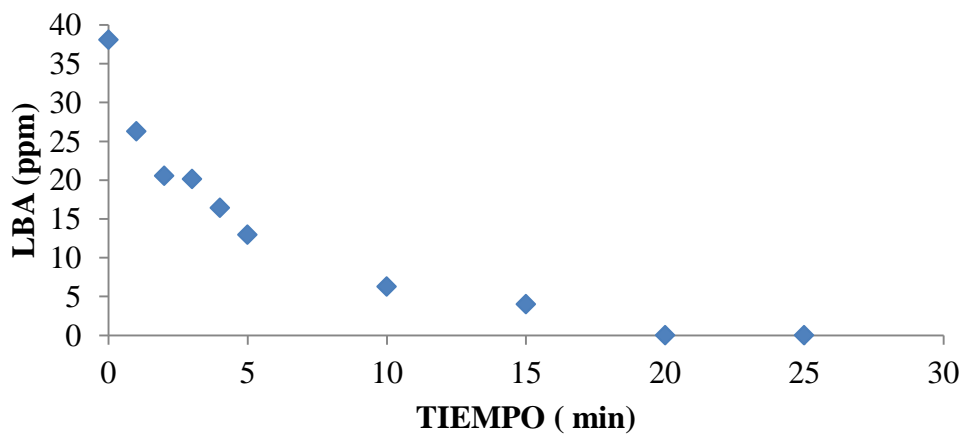


Figura 4.22. Elución de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 2

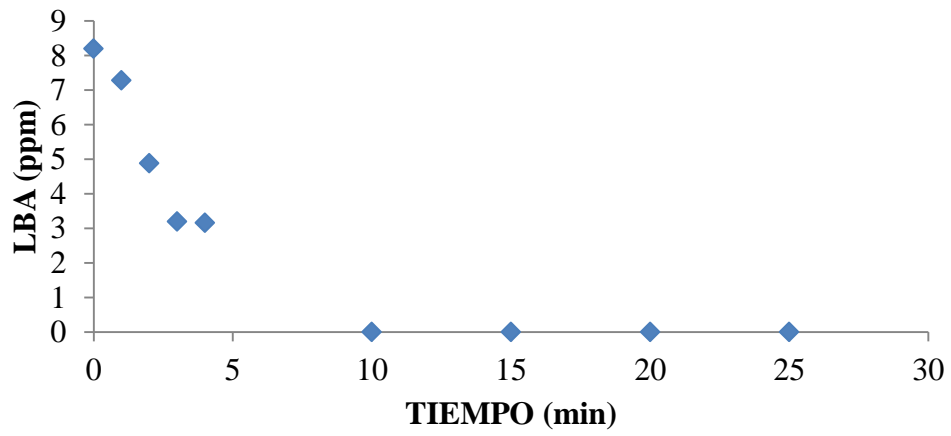


Figura 4.23. Elución de la resina Lewatit S4428 con LBA fermentación 3

4.2.4.-Acoplamiento de procesos

4.2.4.1.- Membrana cerámica:

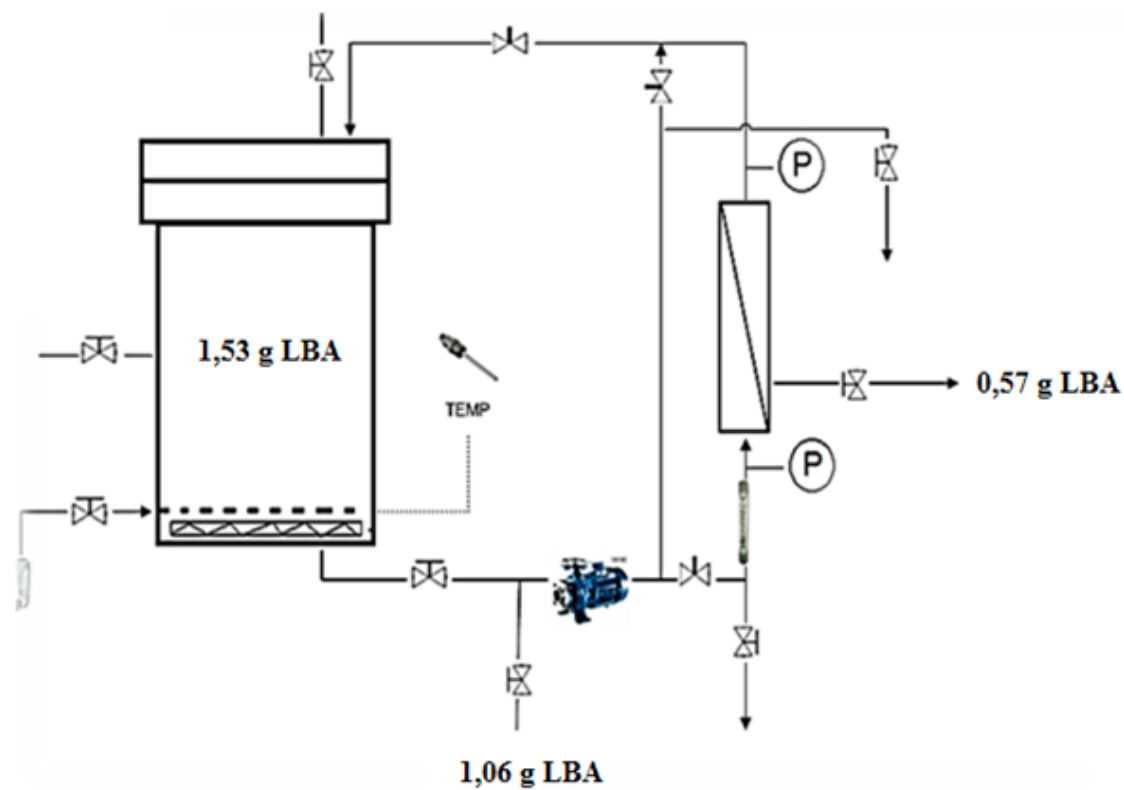


Figura 4.24. Diagrama del proceso de separación de LBA fermentación 3

4.2.4.2.- Resinas de intercambio iónico

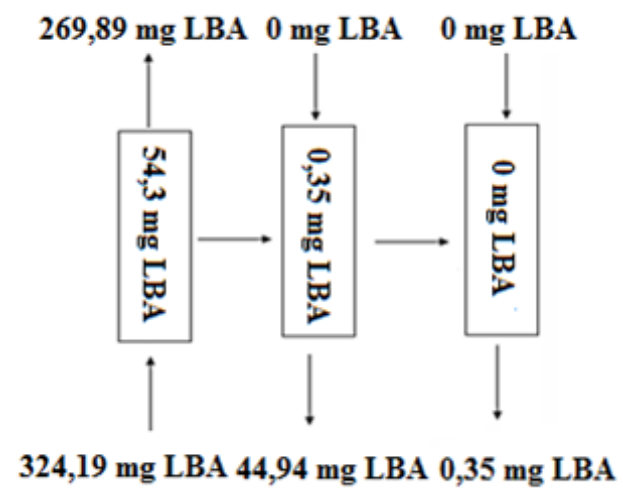


Figura 4.25. Diagrama del proceso de purificación de LBA fermentación 3

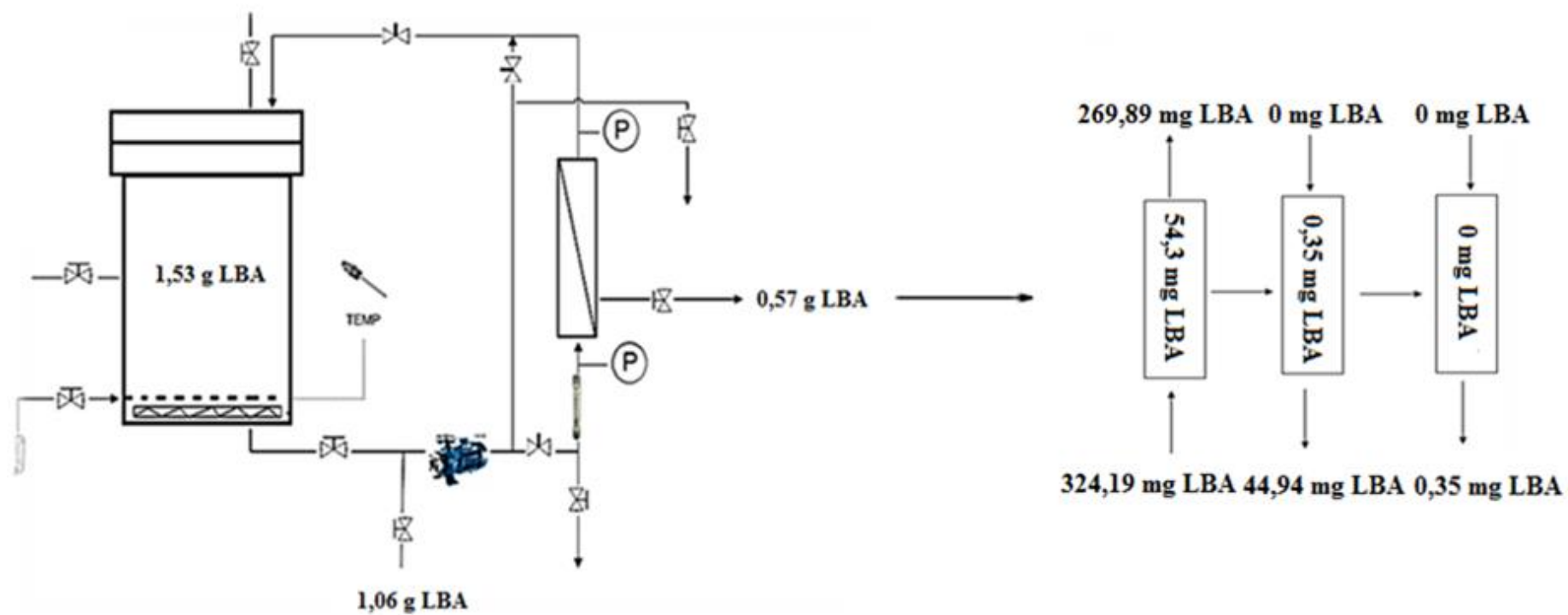


Figura 4.26. Diagrama del proceso de separación y purificación de LBA fermentación 3

Para poder realizar el estudio del rendimiento del proceso de separación y purificación del ácido lactobiónico (Figura 4.26), se han empleado los datos obtenidos de la filtración y purificación de la fermentación 3 (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Concentración de LBA fermentación 3 existente en el proceso de separación con membranas

	C₁ (ppm)	C₂ (ppm)	C_{media}(ppm)
CONCENTRACIÓN DE LBA TANQUE INICIO PROCESO	607,24	613,73	610,49
CONCENTRACIÓN DE LBA DEL PERMEADO	576,20	579,28	577,74
CONCENTRACIÓN DE LBA TANQUE FINAL PROCESO	808,80	816,08	812,44

Tras el proceso de separación con la membrana cerámica se obtiene un 38 % de ácido lactobiónico en el permeado (Figura 4.24.). Mientras que en el proceso de purificación se consigue recuperar casi la totalidad del LBA existente ya que el rendimiento del proceso obtenido es del 83,33% (Figura 4.25).

Hay que prestar una especial atención a la etapa de lavado en el proceso de purificación ya que sale casi la totalidad del LBA existente en la resina.

5. CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

Gracias a los estudios realizados podemos concluir que:

Membranas:

- De las dos membranas empleadas a lo largo del presente trabajo la cerámica es la que presenta un comportamiento más favorable. Esto queda reflejado en la menor pérdida de contenido proteico y de lactosa de la mezcla de suero analizado.
- El permeado obtenido tras la filtración con la membrana cerámica es más selectivo que con la membrana plástica, esto se podía apreciar a simple vista ya que las muestras obtenidas a partir de la membrana cerámica presentan una menor turbidez.
- El caudal de 800 L/h es el que proporciona mejores resultados por ser el que menos pérdidas de lactosa y contenido proteico muestra.
- La presión transmembranal existente en la membrana cerámica fue descendiendo con el paso del tiempo en los procesos de los distintos fermentados estudiados.
- La temperatura es un factor a considerar ya que se produce un incremento de la misma en el proceso como consecuencia de la recirculación del fluido, causando la desnaturalización de las proteínas y la formación de espuma. Siendo su efecto significativo también en la viscosidad del fluido y en el Ca principalmente.
- Un pretratamiento de la alimentación mediante una centrifugación, microfiltración etc. daría mejores resultados por eliminarse los restos de grasa y biomas, principales causantes del ensuciamiento de la membrana y de su menor rendimiento.

Resinas:

- La resina que mejores resultados proporciona es la Lewatit S4428 por presentar una mayor capacidad de retención que la resina Lewatit MP500.

- Con los datos obtenidos tras los estudios cinéticos se puede concluir que 120 minutos se consideran suficientes para llegar al equilibrio del intercambio.
- Gracias a los distintos ciclos realizados con la resina Lewatit S4428 podemos decir que la etapa previa de acondicionamiento es de vital importancia para que se produzca una correcta carga de la misma.
- Durante la fermentación del suero se generan compuestos secundarios, que pueden ser los causantes del salto de tiempo más acusado que se produce en las fermentaciones 2 y 3 en el proceso de carga de la resina.
- La capacidad de adsorción en columna del LBA procedente de la fermentación 3 es muy superior a la capacidad de adsorción de LBA de las otras muestras trabajando en las mismas condiciones de operación.
- La interacción establecida entre la resina y el fluido es mayor si se realiza la carga a contracorriente (LBA comercial, LBA procedente de la fermentación 2 y 3) que si se hace a co-corriente (LBA procedente de la fermentación 1).

6. BIBLIOGRAFÍA

6.- BIBLIOGRAFÍA

Alonso, S. (2009). Trabajo de investigación: " Obtención de derivados ácidos por fermentación de suero lácteo". Universidad de Oviedo.

Alonso, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2011). Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-Shift conditions. *Bioresource Technology*, 102: 9730-9736.

Alonso, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2012). Physiological heterogeneity of *Pseudomonas taetrolens* during lactobionic acid production. *Biotechnological Products and Process Engineering*, 96:1465-1477.

Alonso, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2013). Feeding strategies for enhanced lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresouce Technology*, 134:134-42.

Ávila, R., Cárdenas, A., & Medina, A. (2000). Tratamiento del lactosuero utilizando técnica de electrodiálisis. *Interciencia*, 80-84.

Baker, R. (1995). *Membrane Technology*, in *Encyclopedia of Chemical Technology*. New York: John Wiley & Sons.

Benito, J., Conesa, A., & Rodríguez, M. (2004). Membranas cerámicas. Tipos, métodos de obtención y caracterización. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 829-842.

Bhave, G. (1991). *Inorganic Membranes: Synthesis, Characteristics and Applications*. New York: Van Nostrand Reinhold.

Brun, J. (1989). *Procèdes de Séparation par Membranes*. París: Masson.

Camacho Chiriboga, M. (2009). *Proyecto: "Obtención de un concentrado proteico del suero de la leche de vaca utilizando tecnología de membranas"*. Quito.

Casp, A., & Abril, J. (1999). *Procesos de Conservación de Alimentos*. Madrid: A. Madrid Vicente.

Centro de Actividad Regional para Producción Limpia, CAR/PA (2002). *Prevención en la contaminación de la Industria Láctea*. 164.

Chen, W., Parma, A., Patkar, A., & Sen, S. (2004). Selecting membrane filtration systems. *Chemical Engineering Progress*, 12:22-25.

Cheryan , M. (1998). *"Ultrafiltration and Microfiltration Handbook"*. Switzerland: Technomic publication.

Choi, H., Kai, Z., Dionysiou, D., Oerther, D., & Sorial, G. (2005). Effect of permeate flux and tangential flow on membrane fouling for wastewater treatment. *Separation and Purification Technology*, 45: 68-78.

Coca, J., & Luque, S. (1999). *Membrane Applications in the Food & Dairy Industry*. Universidad de Oviedo: Servicio de Publicaciones.

Coronel, M. (2012). *Microfiltración Tangencial*.

Courtney, W. (1986). *Membrane Separations in Biotechnology*. New York: Marcel Dekker.

Drioli, E., & Giorno, L. (2010). *Comprehensive Membrane Science and Engineering*. Oxford, UK: Elsevier Science Ltd.

Fernández García, L. (2012). Tesis Doctoral: "Producción de leche de larga duración (ESL) mediante membranas cerámicas de microfiltración".

Field, R. (2010). *Membranes for Water Treatment* (Vol. IV). Weinheim: Edited by Klaus-Viktor Peinemann and Suzana Pereira Nunes WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Freemantle, M. (2003). Membrane separations. *Chemical & Engineering Progress*, 81:24:33-35.

Gilarranz, R. (2006). Intercambio Iónico. Universidad Autónoma de Madrid. 1-10.

González Cáceres, M. (2012). Aspectos medio ambientales asociados a los procesos de la Industria Láctea. *Mundo Pecuario*, 16-32.

González, M., Alvarez, S., Riera, F., & Álvarez , R. (2007). Lactic acid recovery from whey ultrafiltrate fermentation broths and artificial solutions by nanofiltration. *Desalination*, 228: 84-96.

González, M., Alvarez, S., Riera, F., & Álvarez, R. (2006). Purification of lactic acid from fermentation broths by ion exchange resins. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45: 3243-3247.

Grágeda, Z., & Grágeda, Z. (2006). Desarrollos actuales en tratamientos de riles por métodos electroquímicos. 3-49.

Güell, C., Czekaj, P., & Davis, R. (1999). Microfiltration of protein mixtures and the effects of yeast on membrane fouling. *Journal of Membrane Science*, págs. 155:113-122.

Guizard, C. (1999). Cuaderno FIRP S452-B : " Clasificación de las membranas y los procesos que las utilizan". Venezuela.

Gutiérrez, L., Bazinet, L., Hamoudi, S., & Belkacemi, K. (2013). Production of lactobionic acid by means of a process comprising the catalytic oxidation of lactose and bipolar membrane electrodialysis. *Separation Purification Technology*, 23-32.

Gutiérrez, L., Hamoudi, S., & Belkacemi, K. (2012). Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. *International Dairy Journal*, 103-111.

Hines, A., & Maddox, R. (1985). *Mass Transfer. Fundamentals and Applications*. New Jersey: Prentice-Hall.

Ho, W., & Sirkar, K. (1992). *Membrane Handbook*. New York: Van Nostrand Reinhold.

Hughes, R., & Scott, K. (1996). *Industrial Membrane Separation Technology*. London: Blackie .

Ibáñez Lorente, R. (2007). *Tesis Doctoral: "Estudio de la ultrafiltración de proteínas modelo con membranas cerámicas"*. Granada.

Lenntech. (2011). *Product Information Resina Lewatit 4428*.

Li, Y., Shahbazi, A., & Kadzere, C. (2005). Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, 75, 574-580.

Mahajan, S., Goddik, L., & Quian, M. (2004). Aroma compounds in sweet whey powder. *Journal of Dairy Science*, 4057-4063.

Manahan, S. (2007). Introducción a la química ambiental. 231-234.

Marchese, J., Almandoz, C., Amaral, M., Palacio, L., Calvo, J., Pradanos, P., y otros. (2000). Fabricación y caracterización de membranas tubuñares para microfiltración. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 215-219.

Markwell, M., Haas, S., Bieber, L., & Tolbert, N. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*, 87: 206-210.

Martínez, F., Martín, A., Prádanos, P., Calvo, J., Palacio, L., & Hernández, A. (2000). Protein adsorption and deposition onto microfiltration membranes: The role of solute- solid interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, págs. 221:254-261.

McCabe, W., Smith, J., & Harriot, P. (1994). *Operaciones unitarias de Ingeniería Química*. Madrid: McGraw-Hill.

Meares, O. (1966). *Membrane Separation Processes*. New York: John Wiley & Sons.

Mohr, C. (1989). *Membrane Applications and Research in Food Processing*. New Jersey: Noyes DATA Corporation.

Mulder, M. (1989). *Basic Principles of Membrane Technology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Muñiz, A., Páez, G., Faría, J., Ferrer, J., & Ramones, E. (2005). Evaluation of efficiency of a tangential ultrafiltration/nanofiltration on series system to fractionation and concentration of whey. *Revista Científica, FCV-LUZ, XV*, 361-367.

Nervárez Rivandeneira, M. (2009). "Optimización del proceso de regeneración de resinas de intercambio iónico para ser utilizadas en el desmineralizador de agua de refinería estatal esmeraldas". Escuela superior politécnica de Chimborazo. 26,27,30,44-68.

Noble, R., & Stern, S. (1995). *Membrane Separation Technology. Principles and Applications*. Amsterdam: Elsevier.

Ostergaard, D. (1989.). Adding value to whey by Pro- Frac. *European Dairy Magazine*, 8:20-22.

Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105 : 1-14 .

Pedruzzi, I., Malvessi, E., Mata, V., Silva, E., Silveira, M., & Rodrigues, A. (2007). Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1145: 128-132.

Pedruzzi, I., Silva, E., & Rodrigues, A. (2008). Selection of resins equilibrium and sorption kinetics of lactobionic acid, fructose, lactose and sorbitol. . *Separation and Purification Technology*, 63: 600-611.

Peretti, F., Silveira, M., & Zeni, M. (2009). Use of electro dialysis technique for separation of lactobionic acid produced by *Zymomonas mibilis*. *Desalination*, 626-630.

Pérez, Q., Sierra, A., & Fajardo, G. (2006). *Ciencias Experimentales y Tecnología. Preparación de materiales adsorbentes de Hg(II) con fines analíticos y aplicaciones medioambientales*. Madrid: Ed. DIKINSON, S.L.

Perry, R., & Green, D. (1999). *Perry's Chemical Engineerings' Handbook* (7 th ed.). New York: McGraw-Hill.

Perry, R., & Green, D. (2001). *Manual del ingeniero químico*. Madrid: McGraw-Hill.

Porter, M. (1990). *Handbook of Industrial Membrane Technology*. New Jersey: Noyes Publications.

Posada, K., Terán, D., & Ramírez Navas, J. (2011). Empleo de lactosuero y sus componentes en la elaboración de postres y productos de confitería. *La alimentación latinoamericana*, 66-73.

Prieto García, F., Callejas Hernández, J., Reyes Cruz, V. E., & Marmolejo Santillán, Y. (2012). Electrocoagulación: una alternativa para depuración de lactosuero residual. *Revista AIDIS: de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica*, 3: 51-77.

Restrepo Gallego, M. (2006). Producción más limpia en la Industria Alimentaria. *Producción + Limpia*, 87-101.

Rotstein, E., Singh, R., & Valentas, K. (1997). *Handbook of Food Engineering Practice*. New York: CRC Press.

Saavedra, A., & Romero, J. (1999). Aspectos generales sobre procesos y tecnologías de membranas (Documento 1). Grupo de procesos de membranas.

Scott, K. (1996). *Industrial membrane separation technology*. New York: Ed. by K. Scott and R. Hughes, Blackie Academic and Professional.

Skrzypek, M., & Burger, M. (2010). Isoflux ceramic membranes- practical experiences in dairy industry. *Desalination*, 1095-1100.

Turner, M. (1991). *Effective Industrial Membrane Processes: Benefits and Opportunities*. New York: Elsevier.

Páginas Web

http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=zqjM8J_og5YC&oi=fnd&pg=PA4&dq=desnaturalizacion+proteica+por+temperatura+lactosuero&ots=bcFQKEjnbN&sig=V6mADaQHQhJk31FpyjQVldIra6M#v=onepage&q=desnaturalizacion%20proteica%20por%20temperatura%20lactosuero&f=false. (2013).

<http://www.bibliotecadigital.uson.mx/pagindice.aspx?tesis=22193>. (2013).

<http://www.emagister.com/curso-agua-desalacion-1-4/filtracion-membranas>. (2013).

<http://www.laboutiquedelhogar.es/osmosis-inversa-domestica-proline-sin-bomba.html>. (2013).

<http://www.monografias.com/trabajos51/intercambio-ionico/intercambio-ionico2.shtml>. (2013).

http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642008000200006&script=sci_arttext. (2013).

<http://www.slideshare.net/villaher/ensayo-tecnologia-de-membranas-de-separacion>. (2013).