



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**SEPARACIÓN DE BIOMASA Y PRODUCTOS
(ÁCIDO LÁCTICO Y ÁCIDO LACTOBIÓNICO) POR
MICROFILTRACIÓN**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

FANGZHU SHEN

JULIO, 2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer la ayuda y colaboración prestada por mi director de proyecto, Manuel Rendueles de la Vega. Gracias por sus consejos, paciencia y confianza depositada en mí También quiero agradecer el compañerismo prestado por quienes considero mis compañeros de laboratorio del Departamento de Ingeniería Química, especialmente a Amanda, Cristina y Rosana, por su gran paciencia ante mis preguntas y por compartir de modo desinteresado sus conocimientos conmigo.

Agradezco a mis familiares por hacerme compañía, con sus alientos de ánimo, confianza y amor.

Un especial agradecimiento a Javier, alguien que está detrás de todo este trabajo. Eres tú, has sido y serás el pilar de mi vida, me has ayudado a continuar luchando para alcanzar mi objetivo en el estudio y en la vida. Me acompañas a pasar los mejores y peores momentos, por apoyarme, por nunca dejarme caer, por estar siempre ahí Hemos aprendido a vivir compartiendo triunfos y fracasos, alegrías y tristezas.

A los amigos por protegerme y darme valor, por su sinceridad y amistad incondicional. Por la paciencia infinita con las barreras del idioma, que poco a poco voy venciendo. Desde el principio hasta el día hoy siguen dándome ánimo para terminar este proceso de aprendizaje, por su apoyo, sugerencias y observaciones, que me ayudan a superarme y alcanzar mis metas.

Este trabajo no habría sido posible sin la influencia directa o indirecta de muchas personas a las que estoy profundamente agradecido, gracias por estar presentes en las distintas etapas de su elaboración. Sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	VII
1.-INTRODUCCIÓN.....	1
2.- CONSIDERACIONES TEÓRICAS	8
2.1.-ÁCIDO LÁCTICO	8
2.2. -ÁCIDO LACTOBIÓNICO.....	10
2.3.- MEMBRANAS	12
2.3.1.- Introducci ón	12
2.3.2.- Par ámetros de funcionamientos de membranas	13
2.3.3.- Diferencia del tama ño de part ícula separada	13
2.3.4.- Diferencia de materiales de construcci ón.....	15
2.3.5.- Diferencias de estructura	16
2.3.6.- Modo de circulaci ón del flujo en un proceso con membranas	16
2.3.7.- Tipos de m ódulos.....	17
2.3.8.- Ensuciamiento.....	21
2.3.9.-Limpieza	21
2.4.- CROMATOGRAF ÍA L ÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC).....	21
2.4.1.- Desarrollo	22
2.4.2.-Fundamento.....	22

2.4.3.-Clasificación.....	24
2.4.4.- Campos de Aplicación.....	25
2.4.5.-Ventajas	25
3.-MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
3.1.- OBTENCIÓN DE ÁCIDO LACTOBIÓNICO Y ÁCIDO LÁCTICO..	27
3.1.1.-Fermentación de lactosuero para la producción de ácido lactobiónico	27
3.1.2.-Fermentación de lactosuero para la producción de ácido láctico	28
3.2.- DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO	28
3.3.- DESCRIPCIÓN DE LA MEMBRANA EMPLEADA	30
3.4.- OPERACIÓN DEL EQUIPO	31
3.4.1.- Pruebas con agua	32
3.4.2.- Pruebas con ácido lactobiónico y ácido láctico	32
3.5.- ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ÁCIDO LACTOBIÓNICO Y ÁCIDO LÁCTICO.....	33
3.5.1.- El equipo de Cromatografía de Alta Eficacia (HPLC)	33
3.5.2.- La preparación de muestra para el análisis cuantitativo de ácido lactobiónico y ácido láctico.....	34
3.6.- DETERMINACIÓN DE PH, DENSIDAD ÓPTICA Y BIOMASA DE ÁCIDO LACTOBIÓNICO Y ÁCIDO LÁCTICO	35
3.6.1.- Determinación del pH.....	35
3.6.2.- Determinación de la densidad óptica (OD)	36
4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37

4.1.-MEMBRANAS	38
4.1.1.- Con agua.....	38
4.1.2.- Con ácido lactobiónico(I).....	38
4.1.3.- Con ácido lactobiónico(II)	40
4.1.4.- Con ácido láctico (I)	42
4.1.5.- Con ácido láctico (II)	43
4.2.- ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ÁCIDO LACTOBIÓNICO Y ÁCIDO LÁCTICO	45
4.2.1.- Ácido lactobiónico (I)	45
4.2.2.- Ácido lactobiónico (II)	47
4.2.3.- Ácido láctico (I).....	48
4.2.4.- Ácido láctico (II)	50
4.3.- DETERMINACIÓN DEL pH Y DENSIDAD ÓPTICA	51
4.3.1.-Ácido lactobiónico (II)	51
4.2.2.- Ácido láctico (II)	53
5.-CONCLUSIONES	55
6.- BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

Se producen por encima de 15 millones de toneladas de queso, de más de 2.000 tipos diferentes, en todo el mundo anualmente. El principal aspecto negativo medioambiental generado por la elaboración de queso es la producción de lactosuero. Con la eliminación del lactosuero se crean focos de contaminación, debido a la proliferación de grandes grupos de bacterias patógenas en el ambiente y a fétidos olores por el lactosuero. Dicho lactosuero, debido a su composición es una excelente matriz para la bioconversión microbiana y la producción del ácido lactobiónico y ácido láctico.

El presente trabajo ha desarrollado el diseño de un proceso en la separación de biomasa y productos (ácido lactobiónico, ácido láctico) contenido en el caldo de fermentación del lactosuero dulce; para lo cual se usaron técnicas de microfiltración por membrana. La fermentación de lactosuero para la producción de ácido lactobiónico se ha llevado a cabo en discontinuo a temperatura constante de 30 °C con el microorganismo de una cepa de *Pseudomonas taetrolens* (LMG 2336), y en la producción de ácido láctico se usó la cepa 393 de *Lactococcus lactis* ATCC. Se ha estudiado con la membrana más apropiada y el caudal más óptimo (membrana cerámica y caudal de 800L/h) con agua, ácido lactobiónico y ácido láctico. Se ha determinado que la presión transmembranal existente fue descendiendo, la temperatura aumentando, y el tiempo para filtrar la misma cantidad de muestra en incremento con el paso del tiempo en los procesos del fermentado de ácido lactobiónico y ácido láctico. Dicha membrana es introducida en una carcasa metálica de 60 mm de longitud en un equipo a escala planta piloto.

Con el análisis cuantitativo (Cromatografía de Alta Eficacia-HPLC) del ácido lactobiónico y del ácido láctico tras su filtrado, se obtuvo la recuperación del sistema por membrana de ácido lactobiónico y de ácido láctico del 13,2% y 13,7% respectivamente. Se ha determinado el volumen muerto del equipo (2,1L) y el hallazgo de un error en la medida de los volúmenes (8%). Mediante la medida del pH y la densidad óptica de las muestras tras el filtrado, se busca determinar la capacidad y la viabilidad de la separación de biomasa del proceso en membrana. Se ha determinado que la membrana funcionó bien para la separación de biomasa, la cual se quedó en el retenido.

ABSTRACT

Each year over 15 millions tons of 2.000 different types of cheeses are produced all over the world. The main environmental issue generated by the development is the production of cheese whey. With the removal of whey pollution sources are created, due to the proliferation of large numbers of pathogenic bacterias in the environment and by malodors whey. But this whey, because of its compositional content, is an excellent matrix for the microbial bioconversion and production of lactobionic acid and lactic acid.

In the present work has been to design a process of separation of biomass and products (lactobionic acid, lactic acid) content in the fermentation of sweet whey. The fermentation of whey for the production of lactobionic acid has been carried out batchwise at a constant temperature of 30 °C with the microorganism strain *Pseudomonas taetrolens* (LMG 2336), the production of lactic acid was used strain 393 of *Lactococcus lactis* ATCC. It has been studied the most appropriate membrane and the optimal flow (ceramic membrane and flow 800L / h) with water, lactobionic acid and lactic acid. It has been determined that the existing transmembrane pressure was falling, the temperature was rising, and the time to filter the same amount of sample was increased with the passage of time in the process of fermentation of lactobionic acid and lactic acid.

With the quantitative analysis (high performance chromatography-HPLC) of lactic acid and lactobionic acid after being filtered to yield the membrane system recovery of lactic acid and lactobionic acid were 13.2% and 13.7% respectively. We have determined the dead volume of the equipment is 2.1 L and the error in the measurement of volumes is 8%. By measuring the pH and optical density of the samples after filtering to determine the ability and the viability of the biomass separation membrane process. It has been determined that the membrane functioned well for the separation of biomass, which was left in the retentate.

LISTA DE FIGURAS

Figura.1.1. Proceso de elaboración del queso	4
Figura.1.2. Corte y desuerado. Moldeo y prensado de la fabricación de queso (CAR/PL, 2002)	5
Figura. 2.1. Diagrama de los usos y aplicaciones del ácido láctico	9
Figura. 2.2. Esquema teórico de la fermentación de la lactosa para la obtención del ácido láctico	9
Figura. 2.3. Ácido lactobiónico	10
Figura. 2.4. Esquema teórico de la fermentación de la lactosa para la obtención del ácido lactobiónico	10
Figura. 2.5. Descripción general de aplicaciones del ácido lactobiónico. (Alonso, S., Rendueles, M., & Dáz, 2013)	11
Figura. 2.6. Principio de la filtración tangencial en tubo	12
Figura. 2.7. Filtración perpendicular (a) y filtración tangencial (b) (Saavedra & Romero, 1999)	17
Figura. 2.8. Membranas tubulares	18
Figura. 2.9. Membranas capilares	19
Figura. 2.10. Membranas de fibras huecas	19
Figura. 2.11. Membranas espirales	20
Figura. 2.12. Membranas almohadiformes	20
Figura. 2.13. Esquema de un cromatógrafo de líquidos	23
Figura. 2.14. Esquema de la clasificación de HPLC	24
Figura. 3.1. Equipo de membranas	28
Figura. 3.2. Esquema del equipo de membranas	30

Figura. 3.3. Equipo de Cromatografía de Alta Eficacia.....	33
Figura. 3.4. La recta de patrón de ácido lactobiónico	34
Figura. 3.5. La recta de patrón de ácido láctico	34
Figura. 3.6. Cromatograma de la elución del ácido lactobiónico.....	35
Figura. 3.7 Cromatograma de la elución del ácido láctico	35
Figura. 4.1. La presión de salida y de entrada de la filtración ácido lactobiónico (I)	40
Figura. 4.2. La presión de salida y de entrada de la filtración ácido lactobiónico (II)	41
Figura. 4.3. Presión de salida y de entrada de la filtración del ácido láctico (I)	43
Figura. 4.4. La presión de salida y de entrada de la filtración ácido láctico (II).....	44
Figura. 4.5 Esquema del sistema por membrana.....	45
Figura. 4.6 pH de la muestra de ácido lactobiónico (II)	52
Figura. 4.7. Densidad óptica de la muestra de ácido lactobiónico (II)	52
Figura. 4.8. pH de la muestra de ácido láctico (II).....	53
Figura. 4.9. Densidad óptica de la muestra de ácido láctico (II).....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla. 1.1. Distribución de la producción de leche y queso en los países del arco mediterráneo (CAR/PL, 2002)	3
Tabla. 1.2. Composición del lactosuero dulce y ácido (Panesar et al, 2007)	6
Tabla. 2.1. Propiedades del ácido láctico (Serna y Rodríguez, 2005).	8
Tabla. 2.2. Tipos de procesos de separación por membrana (Pandolfi, 2008).....	14
Tabla. 3.1. Características de la membrana empleada	31
Tabla. 3.2. El procedimiento clásico de la limpieza	31
Tabla. 4.1. Presión de salida, temperatura, presión de entrada y el tiempo de filtración del ácido lactobiónico (I).	39
Tabla. 4.2. Presión de salida, temperatura, presión de entrada y el tiempo de filtración del ácido lactobiónico (II).....	41
Tabla. 4.3. Presión de salida, temperatura, presión de entrada y el tiempo de filtración del ácido láctico (I).....	42
Tabla. 4.4. Presión de salida, temperatura, presión de entrada y el tiempo de filtración del ácido láctico (II)	44
Tabla. 4.5. Las concentraciones experimentales de las muestras del ácido lactobiónico(I)	45
Tabla. 4.6. Las concentraciones, los volúmenes y los pesos de las muestras del ácido lactobiónico (I)	46
Tabla. 4.7. Resultados del proceso de filtración de las muestras del ácido lactobiónico (I)	47
Tabla. 4.8. Las concentraciones, los volúmenes y los pesos de las muestras del ácido lactobiónico (II).....	47
Tabla. 4.9. Resultados del proceso de filtración de las muestras del ácido lactobiónico (II).....	48

Tabla. 4.10. Las concentraciones, los volúmenes y los pesos de las muestras del ácido láctico (I).....	49
Tabla. 4.11. Resumen de los pesos de las muestras del ácido láctico (I)	49
Tabla. 4.12. Concentraciones, volúmenes y pesos de las muestras del ácido láctico (II)	50
Tabla. 4.13. Resultados del proceso de filtración de las muestras del ácido láctico (II)	51
Tabla. 4.14. El pH, la densidad óptica y la presencia de biomasa de las muestras del ácido lactobiónico (II).....	51
Tabla. 4.15. El pH, la densidad óptica y la presencia de biomasa de las muestras del ácido láctico (II)	53

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados Celsius
C(c)	Concentración de soluto
C(f)	Alimentación de soluto concentrado
C(p)	Concentración de soluto permeado
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
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	Mil ímetros
mM	Milimolar
ng/ μ L	nanogramo/ microlitro
nm	Nan ómetros
ppm	partes por mill ón
Q	Caudal
Q(f)	Flujo de alimentaci ón
Q(p)	Flujo de permeado.
Q(c)	Flujo de concentrado
q	carga
R	Retenci ón o rechazo
Regene.	Regeneraci ón
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 concentraci ón de volumen
V _{FILTRADO}	Volumen filtrado

V_{PERMEADO}	Volumen permeado
WCR	Factor de concentración de peso
Y	Rendimiento

1. INTRODUCCIÓN

1.-INTRODUCCIÓN

En todo el mundo se producen más de 2.000 tipos de quesos diferentes. Hay una gran cantidad de producción de leche y queso, por ejemplo en los países del arco mediterráneo que se muestran en la Figura 1.1. El queso es un producto que se elabora con leche entera, nata, leche desnatada, mazada o con mezclas de estos productos. Normalmente, el queso se produce por coagulación de las proteínas de la leche, a partir de fermentos lácteos y/o cuajo.

Tabla.1.1. Distribución de la producción de leche y queso en los países del arco mediterráneo (CAR/PL, 2002)

PAÍS	LECHE DE CONSUMO T/año	%	QUESO T/año	%
ALBANIA	10.242	0	8.403	0
ARGELIA	72.730	0,2	37.024	0,9
BOSNIA-HERZEG	24.802	0,1	4.311	0,1
CHIPRE	61.664	0,2	7.956	0,2
CROACIA	27.116	0,8	15.282	0,4
EGIPTO	30.000	0,1	410	7,6
ESPAÑA	3.645.400	11,3	293.8	7,3
FRANCIA	22.000.000	68,1	1.700	42
GRECIA	713.536	2,2	293.503	7,2
ISRAEL	872.927	2,7	100.000	2,5
ITALIA	3.100.000	9,6	958.062	23,6
LÍBANO	4.042	0.0	21.091	0,5
LIBIA	57.000	0,2	100	0
MALTA	30.200	0,1	2.300	0,1
MARRUECOS	860.000	2,7	10.686	0,3
SIRIA	14.111	0.0	82.170	2
TÚNEZ	262.480	0,8	6.420	0,2
TURQUÍA	251.632	0,8	201.260	5
TOTAL	32.281.882	100.0	4.052.386	100

Según el trabajo del Centro de Actividad Regional para la producción limpia [1], los países del arco mediterráneo que producen más queso son Francia, Italia y España, correspondientes al 42%, 23.6% y 7,2% respectivamente. Hay tanta producción de queso debido a la industrialización en el sector lácteo, por ello se generan miles de Tms de queso (4.052.386 Tms) como podemos ver en la Figura 1.1. Pero tanta elaboración conlleva consecuencias negativas, como son la generación de residuos sólidos, líquidos y gaseosos. El principal aspecto medioambiental generado por la elaboración de queso es la producción de lactosuero. Con la eliminación del lactosuero se crean focos de contaminación, debido a la proliferación de grandes grupos de bacterias patógenas en el ambiente y a feídos olores por el lactosuero. [2] En la Figura 1.2 se explican las principales etapas en el proceso de elaboración del queso.

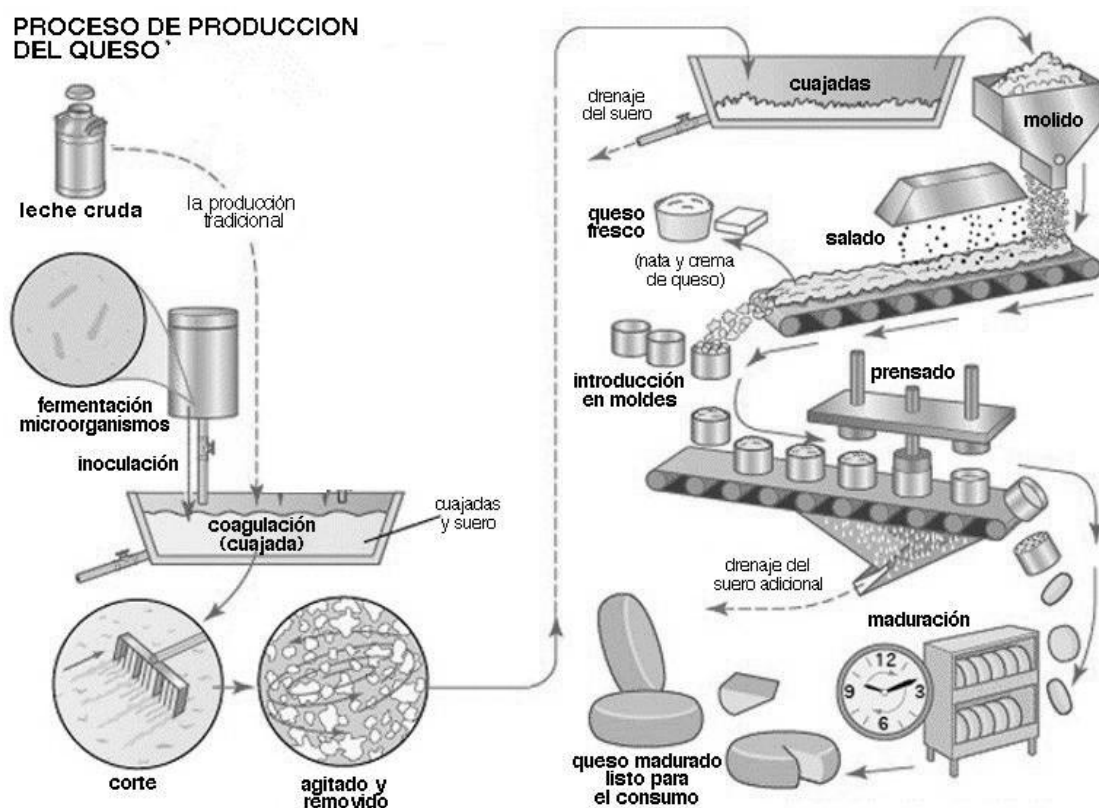


Figura. 1.1. Proceso de elaboración del queso

El lactosuero es un subproducto que se genera en grandes cantidades, por término medio es nueve veces superior a la cantidad de queso fabricado. Hay dos fases principales para conseguir el lactosuero. (Figura 1.3) En la etapa de la agitación se agitan los trozos de cuajada obtenidos tras el cortado, para la obtención del lactosuero. De este modo evitamos la tendencia de la cuajada a sedimentarse. Durante el prensado de la masa del queso también se produce la salida de lactosuero.

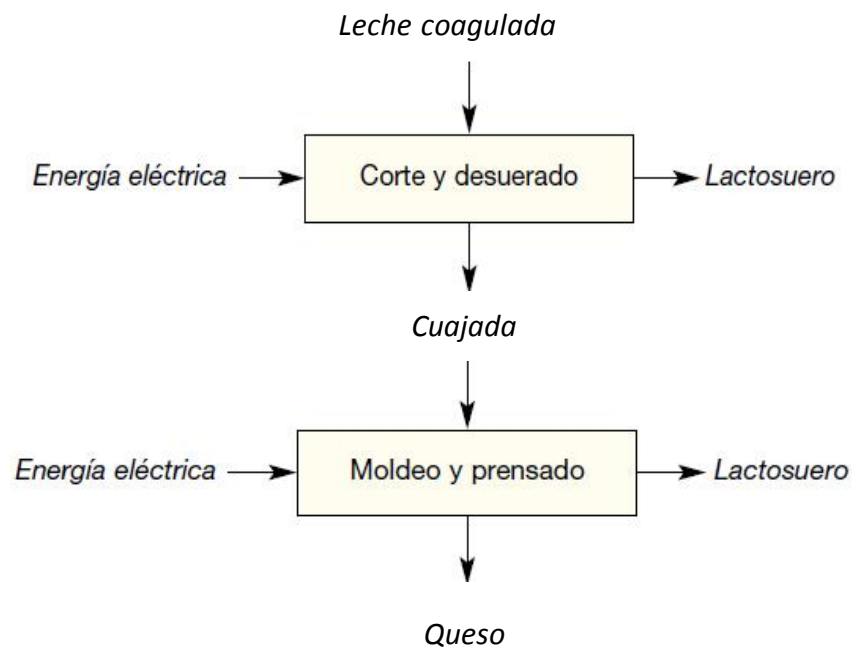


Figura. 1.2. Corte y desuerado. Moldeo y prensado de la fabricación de queso (CAR/PL, 2002)

Existen tres clases de suero: el dulce, el ácido y el amargo los cuales dependen de los métodos empleados para la coagulación de la leche.

Lactosuero dulce: Procedente de fabricaciones de coagulación enzimática por uso de enzima coagulante. La precipitación de las proteínas se produce por hidrólisis específica de la caseína. Por lo tanto el pH es próximo al de la leche inicial y no hay variación de la composición mineral. El suero dulce es el más empleado por la industria y tiene una composición química más estable, lo que permite estimar los valores medios de composición.

Lactosuero ácido: Obtenida de una coagulación ácida o láctica de la caseína, presenta un pH próximo a 4,5. Se produce al alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína con anulación de las cargas eléctricas que las mantienen separadas por las fuerzas de repulsión que generan, impidiendo la floculación.

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

Debido al valor nutricional del lactosuero se han generado un gran número de aplicaciones comerciales como el etanol, refrescos, biomasa, bebidas fermentadas, concentrados aislados e hidrolizados de proteína, ácidos orgánicos, pelúculas comestibles, medios de soporte para encapsular sustancias, separación de lactosa para fines de edulcorantes en los alimentos, enzimas y otras aplicaciones. Los resultados obtenidos en el estudio de las fermentaciones, que en muchos casos no han pasado de su fase teórica, han obtenido unas pocas aplicaciones industriales. Actualmente, el empleo directo del lactosuero se limita a su utilización como complemento nutricional en piensos para animales, fertilizante o en último término se gestiona como efluente residual.

El lactosuero posee un gran potencial contaminante por su alta demanda química de oxígeno (DQO > 60000 ppm) y bioquímica de oxígeno (DBO > 35000 ppm), genera importantes implicaciones medioambientales y es considerado el residuo más contaminante dentro de la industria alimentaria. A pesar de ser un desecho muy peligroso también se considera una muy buena matriz (Tabla 1.4) para la conversión oxidativa microbiana, convirtiéndose en una gran alternativa para la producción. Desde el punto de vista biotecnológico es interesante para la elaboración de nuevos productos como el ácido lactobiónico y ácido láctico.

Obejetivos

El objetivo principal del presente trabajo será el diseño de un proceso en la separación de biomasa y productos (ácido lactobiónico, ácido láctico) contenidos en el caldo de fermentación del lactosuero dulce. Para ello se utilizarán técnicas de microfiltración por membrana. Para lograr este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos particulares:

- Llevar a cabo la filtración con la membrana más apropiada y el caudal más óptimo con agua, ácido lactobiónico y ácido láctico. Mediante el análisis de la presión transmembranal existente durante la filtración mediante membranas y el tiempo que necesita para filtrar una cantidad fija de muestra para determinar la valoración del comportamiento del equipo.
- Evaluar y simular la recuperación y la eficiencia de microfiltración del sistema por membrana con el análisis cuantitativo de ácido lactobiónico y ácido láctico tras su filtrado.
- Medir el pH y densidad óptica de las muestras tras el filtrado para determinar la capacidad y viabilidad de la separación de biomasa del proceso en membrana.
- Determinar el volumen total del equipo.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.- CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1.-ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico es el hidroxil ácido más sencillo que existe. Su molécula contiene un átomo de carbono asimétrico. Se conoce de acuerdo a la nomenclatura oficial como ácido 2-hidroxi-propanoico de fórmula $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), Tabla 2.1. Está presente en alimentos como el yogurt, suero de leche, panes, queso y muchos otros alimentos fermentados.

El ácido láctico es ampliamente utilizado debido a las nuevas aplicaciones que éste tiene al ser usado como materia prima en las industrias alimentaria, médica, farmacéutica y cosmética, como materia prima para síntesis orgánica.[3]

Tabla. 2.1. Propiedades del ácido láctico (Serna y Rodríguez, 2005).

Fórmula	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$
Peso molecular	90.08
Punto de fusión L(+) y D(-)	52.8 – 54 °C
DL (Según composición)	16.8 – 33 °C
Punto de ebullición	125 – 140 °C
PKa	3.87 a 25°C

En la Figura 2.1 se ven las cinco grandes áreas en las que es usado actualmente el ácido láctico: alimenticia, cosmética, farmacéutica, en aplicaciones químicas y como materia prima.

Las bacterias ácido lácticas son Gram positivas, anaerobios facultativos, catalasa negativos, no formadores de esporas y por lo general inmóviles, con un metabolismo estrictamente fermentativo en el que se produce ácido láctico como producto principal de la fermentación de azúcares. La conversión glicolítica de azúcares a ácido láctico es la ruta metabólica más importante en estas bacterias [7] La bacteria que se usa en el presente trabajo es la cepa 1032 de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*.

2.2.- ÁCIDO LACTOBIONIÓICO

El ácido lactobiónico (4-O-β-galactopiranosyl-D-gluconic acid) es el resultado de la unión de un carbohidrato (galactosa) y un ácido aldónico (ácido glucónico).

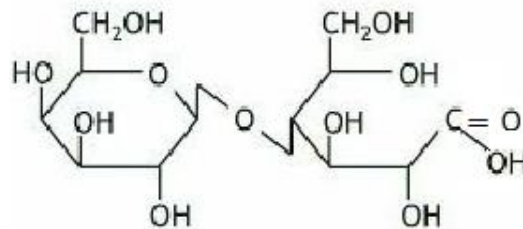


Figura. 2.3. Ácido lactobiónico

Es un producto de alto valor añadido obtenido de la oxidación de lactosa. La lactosa ha demostrado ser una adecuada fuente, barata y atractiva, para la obtención de ácido lactobiónico a través de un proceso biotecnológico llevado a cabo por *Pseudomonas taetrolens*. [8]

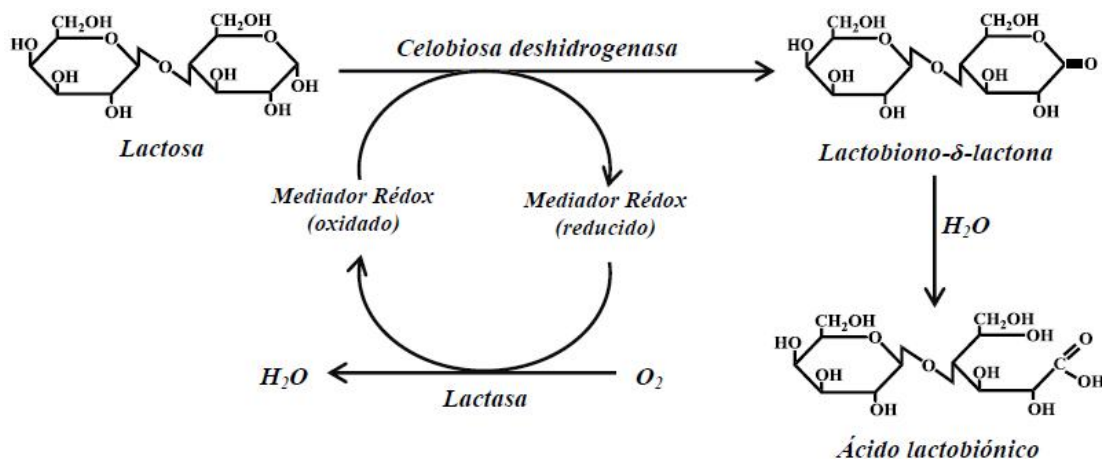


Figura. 2.4. Esquema teórico de la fermentación de la lactosa para la obtención del ácido lactobiónico

El ácido lactobiónico tiene excelentes propiedades en la industria alimenticia, grandes aplicaciones en la farmacéutica, como para la creación de antibióticos y sustancias que favorecen una mejor conservación en el almacenamiento de órganos para su trasplante. Como usos comerciales, podemos destacar su empleo en productos de anti-envejecimiento. También se usa como un conservante, antioxidante y agente estabilizador gelificante y ha sido aprobado como un aditivo alimentario por la FDA de los EE.UU. Esta sustancia también se considera para conferir potenciales efectos prebióticos en alimentos funcionales. [10]

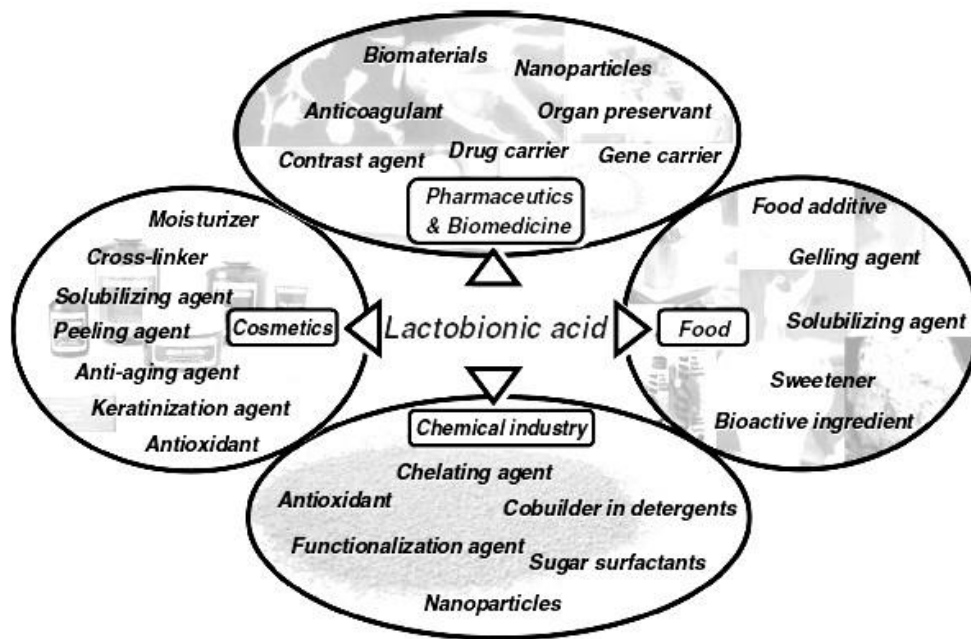


Figura. 2.5. Descripción general de aplicaciones del ácido lactobiónico. (Alonso, S., Rendueles, M., & Dúz, 2013)

Hay tres formas para la obtención de ácido lactobiónico: catálisis química, oxidación enzimática y bioconservación microbiana. Comparado con las otras dos formas, la de bioconservación microbiana no tiene formación de intermediarios o subproductos, se usa con una temperatura media, el consumo de otros analitos que interfieren en procesamiento y/o posterior recuperación del ácido sin pretratamiento previo del sustrato, no requiere largas ni costosas etapas previas a la transformación. Pero el tiempo de reacción es largo y es posible tener la existencia de fase lag o de climatización.

La bioconservación oxidativa de la lactosa llevada a cabo por *Pseudomonas taetrolens* a partir del lactosuero se presenta como una vía económicamente rentable al proceso de recuperación del ácido lactobiónico. A pesar de la existencia de otros

componentes presentes en el suero como biomasa, proteínas, sales y otras impurezas que también afectan.

2.3.- MEMBRANAS

2.3.1.- Introducción

En los últimos decenios la aplicación de membranas ha demostrado ser parte fundamental en la tecnología de la separación, debido a que éstas permiten el filtrado de ciertos componentes con una mayor celeridad. Lo más destacado en su uso es que no utiliza la adición de productos químicos, tiene un escaso gasto energético y sus condiciones de procesamiento son sencillas. La presión requerida para forzar el paso a través de alguna membrana suele ser proporcional al tamaño de los poros. Cuanto menores son los poros más presión será necesaria. Entre ambos lados de la membrana se establece un diferencial de presión denominado “presión transmembranaria”. [11]

El “permeado” son los componentes, que por su menor tamaño molecular, traspasan la membrana por el uso de la presión. Al contrario, los que no lo consiguen son el “concentrado”. [12]

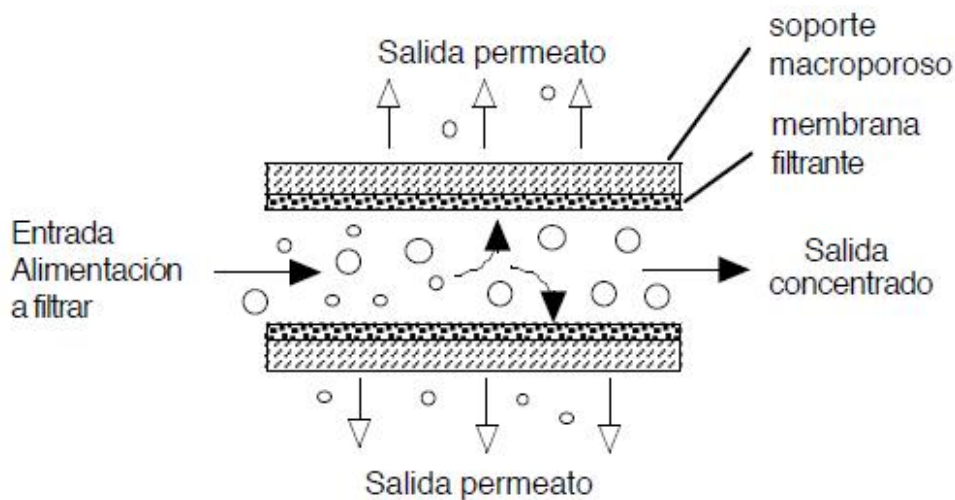


Figura.2.6. Principio de la filtración tangencial en tubo

Actualmente, debido a su principio de separación y eficiencia demostrada con otras operaciones unitarias, los procesos de membrana están presentes en muchos sectores de la investigación científica y desarrollo, la industria, medicina y en la gestión de los recursos naturales

2.3.2 -Parámetros de funcionamientos de membranas

Los parámetros de permeabilidad y selectividad, entre otros, dependen de las características intrínsecas de la membrana y de la operación que se esté realizando. Están relacionados con la morfología de la membrana y las interacciones entre ésta y las especies que se desean separar.

- Permeabilidad

La permeabilidad indica la cantidad de disolvente que atraviesa la membrana y mide la densidad de flujo de permeado. El rendimiento de la membrana en cuanto a la cantidad de permeado retenido no sólo depende de la presión transmembranaria, también lo hace por la velocidad del flujo de alimentación, la temperatura, la concentración del fluido y las características físicoquímicas de la membrana. [12]

- Selectividad

La capacidad de elección de una membrana con respecto a los distintos sustratos es cuantificada mediante el porcentaje de rechazo de dicho sustrato, R, o eficacia de la separación, que relaciona las concentraciones del sustrato en la alimentación y en el permeado (es el complementario a cien del porcentaje de paso de sales).

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_o}\right) * 100$$

donde:

C_p = concentración en el permeado
C_o = concentración en la alimentación

- Otros parámetros

El porcentaje de rechazo, el flujo de permeado y el intervalo o el umbral de corte no definen por sí solos el comportamiento de un sistema en funcionamiento. Contribuyen también las características de la membrana (material, porosidad, tamaño de poros y carga de superficie), la naturaleza y la composición de las especies presentes, las condiciones de operación (presión aplicada, concentración, temperatura, pH y fuerza iónica) o la hidrodinámica del sistema.

2.3.3- Diferencia del tamaño de partícula separada

En función del tamaño de las partículas/moléculas que deben eliminarse se puede diferenciar cuatro procesos:

- Microfiltración (MF)
- Ultrafiltración (UF)

- Nanofiltración (NF)
- Ósmosis inversa (OI)

La tabla 2.2 indica los diferentes tipos de proceso de separación por medio de membranas, donde el principio impulsor o fuerza motriz de separación es la presión diferencial, el diámetro de poro que define el tipo de componentes a separar que, además, se ejemplifican. [13]

Tabla. 2.2. Tipos de procesos de separación por membrana (Pandolfi, 2008).

	Microfiltración	Ultrafiltración	Nanofiltración	Ósmosis inversa
Concentrado	Grasas y proteínas grandes	Proteína y grasas	Todos los solutos excepto iones monovalentes	Todos los solutos
Permeado	Agua Minerales Lactosa Proteínas pequeñas	Agua Minerales lactosa	Agua Iones monovalentes	Agua
Diámetro de poro	10-0,1µm	0,1µm-5nm	Apro.1nm	<1nm
Rango de presión de operación	10 a 50 psi	30 a 150 psi	150 a 600 psi	200 a 1000 psi

La ultrafiltración (UF) y microfiltración (MF) son técnicas usadas frecuentemente en las industrias alimentarias y farmacéuticas, muy útiles para retener partículas, la concentración y la purificación de macromoléculas. En cambio con la nanofiltración (NF) se usan membranas para separar los distintos fluidos o iones, por ejemplo para concentrar azúcares, bacterias, sales divalentes, partículas, colorantes, proteínas y otros constituyentes con un peso molecular superior a 1000 Da. Con la ósmosis inversa (OI) se consigue eliminar partículas como virus, sólidos disueltos, bacterias, sales y otros gérmenes contenidos en el agua que tienen un peso de 150-250 Da. El uso más extendido es en la desalinización del agua de mar para su uso potable.

○ **Microfiltración (MF)**

Con la MF y gracias al tamaño de poro de la membrana, se obtiene la separación de los sólidos disueltos, la eliminación de la turbidez y de los microorganismos, la recuperación de macromoléculas y la retención de partículas coloidales en suspensión.

Algunas aplicaciones destacadas son en la separación de catalizadores, de enzimas y de levaduras. La clarificación y extracción de líquidos, así como su uso en el tratamiento de aguas residuales. [15]

○ **Ultrafiltración (UF)**

Es un tipo de filtración por membranas en la cual la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos suspendidos y los solutos de alto peso molecular son retenidos, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular atraviesan la membrana. Algunos de sus usos más comunes son en la diálisis y otros tratamientos de la leche, los procesos médicos de concentración de derivados biotecnológicos como la concentración de proteínas, la recuperación de antibióticos en la industria farmacéutica o incluso en el tratamiento de agua potable. Las ventajas en el uso de membranas de UF son su alta estabilidad térmica, resistividad química y un uso bastante restringido en el uso de productos químicos de limpiezas fuertes. [15]

2.3.4. -Diferencia de materiales de construcción

Los requisitos básicos del material de la membrana que ha de cumplir son:

- Alto flujo del producto
- Buena resistencia mecánica para soportar la estructura física
- Buena selectividad a las sustancias deseadas
- Buena capacidad de retención de acuerdo con la aplicación específica
- Estabilidad química y térmica, así como a agentes de limpieza y desinfección
- Resistencia contra la acción microbiana
- Suave, superficie resistente a las incrustaciones

Según la aplicación requerida los materiales de las membranas pueden ser orgánicos (si se obtienen a partir de polímeros orgánicos) o inorgánicos (si lo están por materiales inorgánicos que se obtienen a partir de material cerámico, vidrio, carbón o metales).

Las membranas orgánicas son las más antiguas. Las primeras se prepararon a partir de celulosas.

Las membranas inorgánicas, con una vida útil mayor, son más resistentes mecánicamente, térmicamente y químicamente, y además son más fáciles de limpiar ya que resisten amplios intervalos de pH, temperatura y presión. Las membranas cerámicas son la categoría de membrana inorgánica más usada, debe estar adaptada al distinto proceso de desaparición.

Los polímeros más utilizados en la fabricación de membranas son polisulfona (PS), acetato de celulosa (AC), poliamidas aromáticas (PA), poliacrilonitrilo (PAN), fluoruro

de polivinilideno (PVDF), polietersulfona (PES), polipropileno (PP), polietilenclorado (PEC)

2.3.5. - Diferencias de estructura

Con el paso del tiempo se han mejorado las estructuras de las membranas, optimizando los rendimientos de las técnicas de filtración.

- Membrana simétrica

En el inicio las membranas tenían el mismo tamaño de poro en todo el espesor de la membrana, lo cual ocasionaba problemas de grandes pérdidas de cargas (aumento del consumo energético) y de colmatado de las membranas.

- Membranas asimétricas o composit.

Para evitar los problemas de pérdidas de carga se desarrollaron membranas con poros del tamaño del corte molecular únicamente en la parte superior de la membrana que está en contacto con el líquido a tratar. Según la composición de la membrana (orgánica o mineral), se trata de membranas asimétricas o composit. La estructura asimétrica de las membranas orgánicas se obtiene actuando sobre factores de concentración, de temperaturas y de precipitación del polímero. [22]

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

Los flujos de líquido que atraviesa las membranas se pueden clasificar en:

- 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 cruzado

La alimentación circula paralela 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 velocidad, dando lugar a un proceso más eficiente. (Figura 2.7.b).

- Flujo inverso

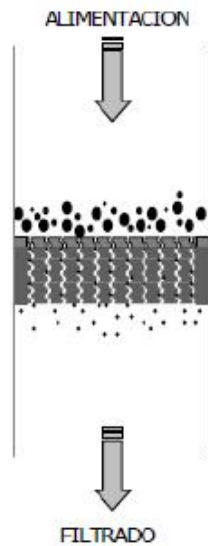
La dirección del flujo a través de la membrana es invertida por la aplicación de la presión en dirección opuesta a la entrada de la alimentación en el módulo, lo que

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.

a) FILTRACION PERPENDICULAR



b) FILTRACION TANGENCIAL

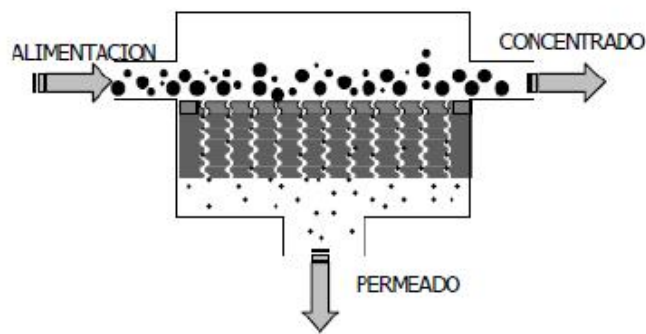


Figura. 2.7. Filtración perpendicular (a) y filtración tangencial (b) (Saavedra & Romero, 1999)

La filtración tangencial es el flujo cruzado en el caso de la filtración de las membranas. La filtración tangencial es una técnica diferente de las técnicas anteriores porque el flujo del material a filtrar circula tangencialmente a la superficie membranaria, lo cual es una primera solución al problema del colmataje. Existe un flujo que circula paralelamente a la superficie, y es precisamente donde la velocidad de flujo tiene una gran relevancia con la capacidad de filtración. Para reducir el impacto del colmataje es importante un correcto manejo de la presión transmembrana

2.3.7.-Tipos de módulos.

Hay dos tipos principales de módulos, los llamados sistema tubular de membrana y sistema placa y marco de membrana. Los primeros se dividen en membranas tubulares, capilares, de fibras huecas y membranas espirales. Las membranas de placa y marco son membranas almohadiformes. [12]

○ **Sistema tubular de membrana**

• Membranas tubulares

Las membranas tubulares no son membranas autosuficientes, se localizan dentro de un tubo y el flujo es generalmente del revés, debido a la debilidad de la unión de la membrana a la capa. Las membranas tubulares tienen un diámetro de 5 a 15 mm. El problema de obstrucción en una membrana tubular es poco probable, debido al tamaño de la superficie de la membrana. Pero este tipo de membrana tiene un mayor coste económico porque la densidad de empaquetamiento es baja.

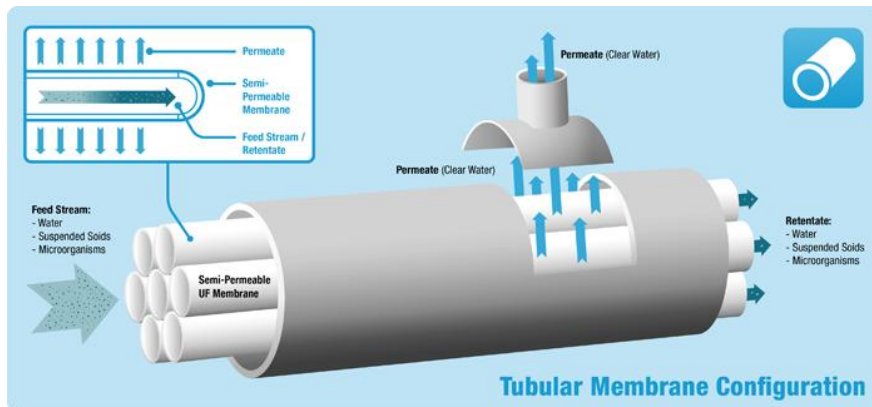


Figura. 2.8. Membranas tubulares

• Membranas capilares

La membrana de las membranas capilares funciona como barrera selectiva y es lo suficientemente grande como para resistir las presiones de filtración. Por ello, el flujo a través de las membranas capilares puede ser en ambos sentidos. El diámetro de las membranas capilares (de 0.5 a 5 mm.) es mucho menor que el de las membranas tubulares. Una ventaja es que la densidad de empaquetamiento es mucho mayor. Pero al ser el diámetro tan pequeño las probabilidades de obstrucción son mucho mayores.

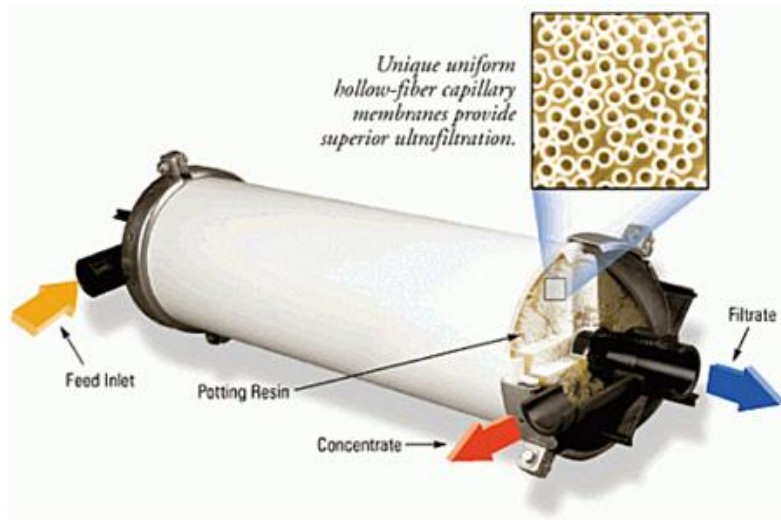


Figura. 2.9. Membranas capilares

- Membranas de fibras huecas

Poseen un diámetro muy pequeño (inferior a $0.1 \mu\text{m}$) lo cual provoca altas probabilidades de obstrucción, por ello suelen ser usadas únicamente para nanofiltración(NF) y ósmosis inversa (OI) en el tratamiento de agua con un bajo contenido de sólidos suspendidos.

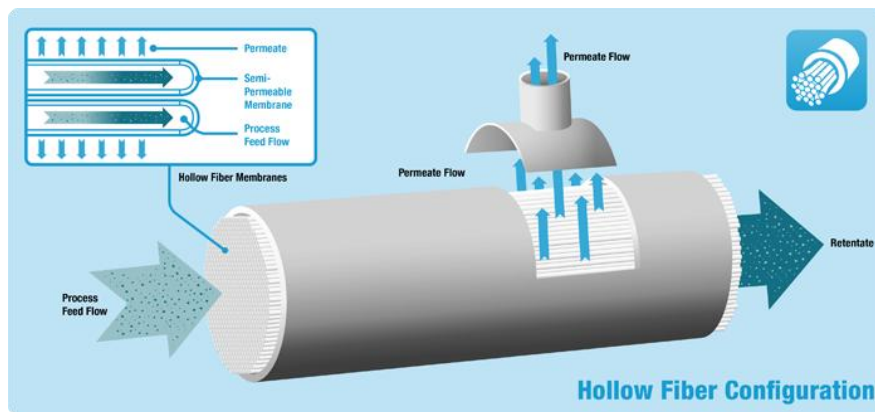


Figura. 2.10. Membranas de fibras huecas

- Membranas espirales

Están hechas de capas de membranas, de lámina plana, y separadores de alimentación, todo ello envuelto alrededor de un núcleo hueco. Son membranas robustas, económicas y eficazmente energéticas. Las soluciones de alimentación entran en un extremo del elemento, que fluye bajo presión a través de la membrana en los canales de permeado, espiral al núcleo central, y a la salida en forma de permeado. Esta

configuración ofrece la zona más alta de la membrana de envasado con la huella más pequeña.

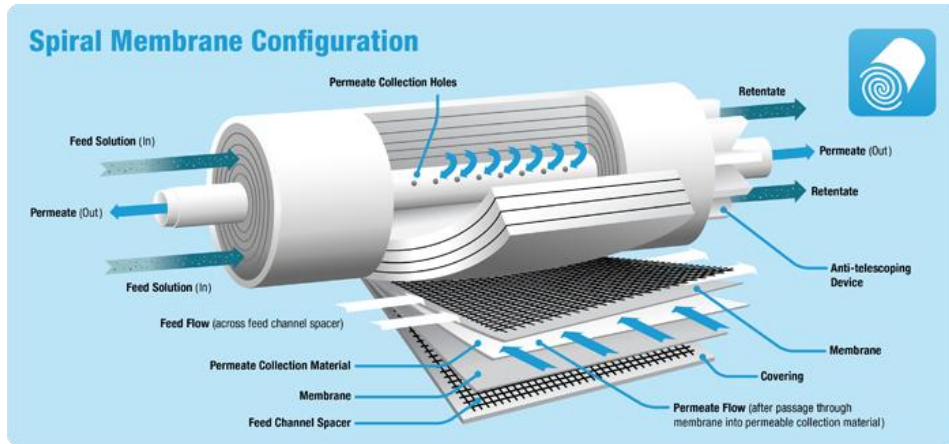


Figura. 2.11. Membranas espirales

- Sistema placa y marco de membrana
- Membranas almohadiformes

Como se muestra en la Figura 2.3.8 consisten en hojas planas de membrana instaladas en una especie de filtro o prensa. Son la configuración más simple y más antigua

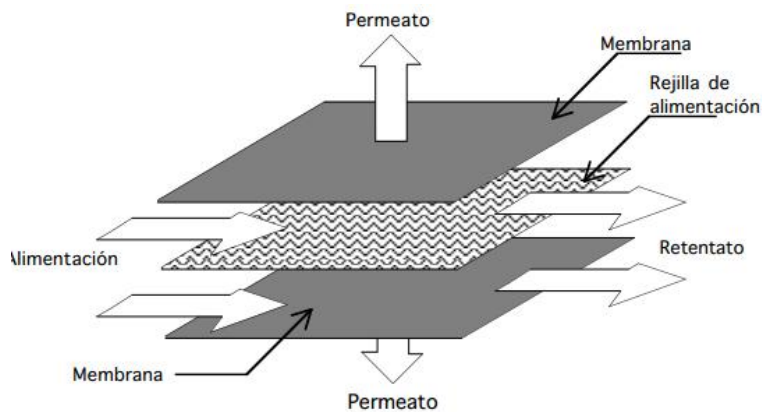


Figura. 2.12. Membranas almohadiformes

Para elegir el sistema de las membranas adecuado se tiene en consideración algunos factores como los costes, riesgos de adaptación de las membranas, densidad de embalaje y oportunidades de limpieza.

2.3.8. -Ensuciamiento

Es inevitable que la membrana se obstruya en los procesos de filtración. Los materiales acumulados en la membrana pueden experimentar cuatro fenómenos que no necesariamente ocurren de manera independiente:

- Adsorción en la membrana.
- Bloqueo superficial de los poros.
- Formación de una capa superficial a lo largo de toda la membrana.
- Penetración profunda de los poros provocando bloqueos internos no reversibles, siendo más acentuado este último problema entre mayor sea el diámetro del poro.

2.3.9-Limpieza

Por lo general un ciclo típico de limpieza incluye la remoción del producto, la recirculación de agua para eliminar remanentes, la limpieza química propiamente, la recirculación de agua para remover los agentes químicos y una desinfección final.[9]

Para un correcto funcionamiento de las membranas es necesaria una limpieza química periódica para deshacernos de la capa de colmanante al acabar el proceso de filtrado. Para ello se usa un agente químico como son los ácidos, bases, detergentes, etc, y así lograr remover los depósitos y devolver a la membrana toda su funcionalidad. En ocasiones, aunque pocas veces, también se usa la limpieza física y la limpieza biológica. [12]

2.4.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

La Cromatografía Líquida de alta eficacia o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna usada normalmente en química y bioquímica analítica. El HPLC es una técnica usada para separar los componentes de una mezcla con respecto a diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

2.4.1.-Desarrollo

En 1903, Mijail Tsvet usó columnas de adsorción de líquidos para separar clorofilas a y b. Las disoluciones atravesaban una columna de vidrio con inulina y un extracto de éter de petróleo con clorofilas; finalmente las clorofilas a y b se separan. Esta persona es considerada como la fundadora de la cromatografía en columna. Desde entonces, la cromatografía de elución se usa para la separación de compuestos de alto punto de ebullición de la mezcla de gas. [19]

En la cromatografía líquida clásica desarrollada en columna, originada por transferenciación gracias a la gravedad. La elución implica el transporte de una especie a través de la columna por la adición continuada de fase móvil. Se introduce una cantidad determinada de muestra y sus componentes comienzan a distribuirse entre las fases estacionarias y disolvente. La adición continuada de fase móvil hace que la fase móvil que contiene una porción de la muestra avance por la columna, donde continua habiendo un reparto del analito entre la fase móvil y las porciones frescas de fase estacionaria a las que va accediendo: los analitos avanzan mediante una serie de continuas transferencias entre fases. El equipo necesario es sencillo y tiene un coste reducido. Pero el flujo al ser controlado sólo por gravedad es un proceso muy lento y laborioso, con baja reproducibilidad, la eficacia y resolución son bajas.

En 1960 el análisis de la cromatografía de gases para separar la materia orgánica alto punto de ebullición (las proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas difíceles de gasificación) tienen límites, la teoría y los métodos de cromatografía de gases se reintroducen a la cromatografía líquida clásico.

Fue en la década de 1960 cuando Kirkland, Hubble, Horvath, Po Haes, Lipusike... desarrollaron la primera cromatografía líquida de alto rendimiento del mundo.

La HPLC utiliza un tamaño de partícula más fina y columnas rellenas de fase estacionaria. La mejora de la matriz de la columna a la fase de flujo es conducida a alta presión, por lo que la cromatografía líquida clásica tarda varios días o incluso meses en completar la separación de trabajo, mientras que la HPLC lo completa en unas pocas horas o incluso minutos. A lo largo de los últimos años muchos científicos e ingenieros han trabajado en el desarrollo de esta técnica. Hoy en día es una de las técnicas más versátiles que tenemos en la ciencia química.

2.4.2-Fundamento

El cromatógrafo de líquido (Figura 2.13.) está compuesto por: el dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes), el dispositivo de inyección, conducciones y conexiones, el detector y el registrador y la columna.

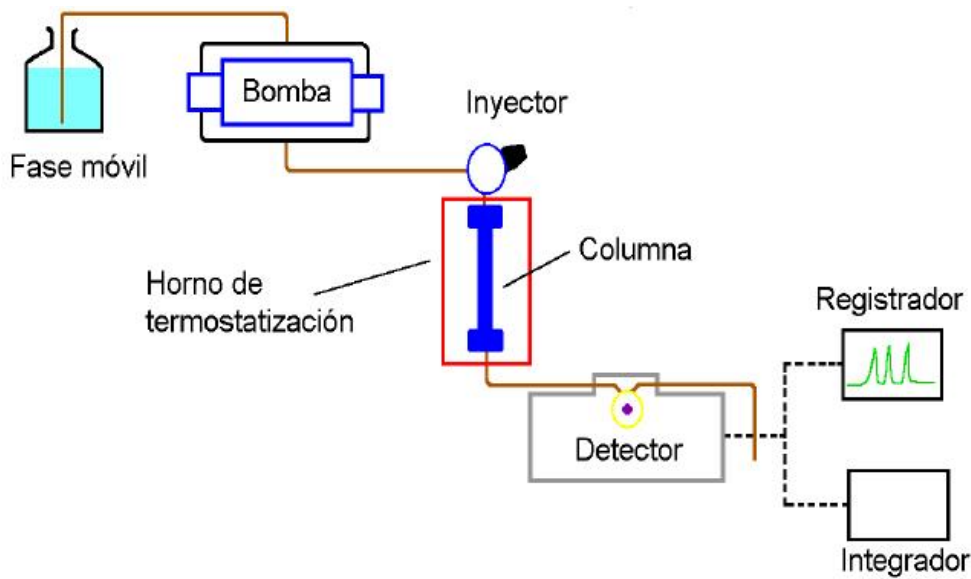


Figura.2.13. Esquema de un cromatógrafo de líquidos

Además de los dispositivos anteriores, a un cromatógrafo líquido se le pueden incorporar otros que pueden simplificar el trabajo o mejorar algún aspecto concreto de la técnica cromatográfica, como pueden ser: inyectores automáticos, colectores de fracciones, los hornos termostatazados para las columnas y los sistemas de tratamiento de datos.

- Sistema de suministro de fase móvil

Todos los equipos de HPLC tienen un sistema de bombeo de fase móvil de alta presión para obligar el paso de la fase móvil a través de la columna. Su relleno es muy compacto y es responsable de una importante sobrepresión. Los disolventes usados deben carecer de gases disueltos.

- Sistema de inyección de muestra

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto período de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación de fase móvil establecido en la columna y el detector.

- Columna cromatográfica

Es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación. En HPLC se emplean dos tipos de relleno para las columnas: relleno pelicular y partículas porosas.

- Detector

Un detector ideal en HPLC debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal amplia, tener poco ruido de fondo y ser estable en el tiempo que

dura el cromatograma. Según diferentes los casos se usan detectores espectrofotométricos, de fluorescencia, electroquímicos y refractométrico.

2.4.3.-Clasificación

Las técnicas cromatográficas se clasifican según diferentes criterios: de la naturaleza de las fases y del tipo de interacciones que tienen lugar entre los solutos y las fases utilizadas.

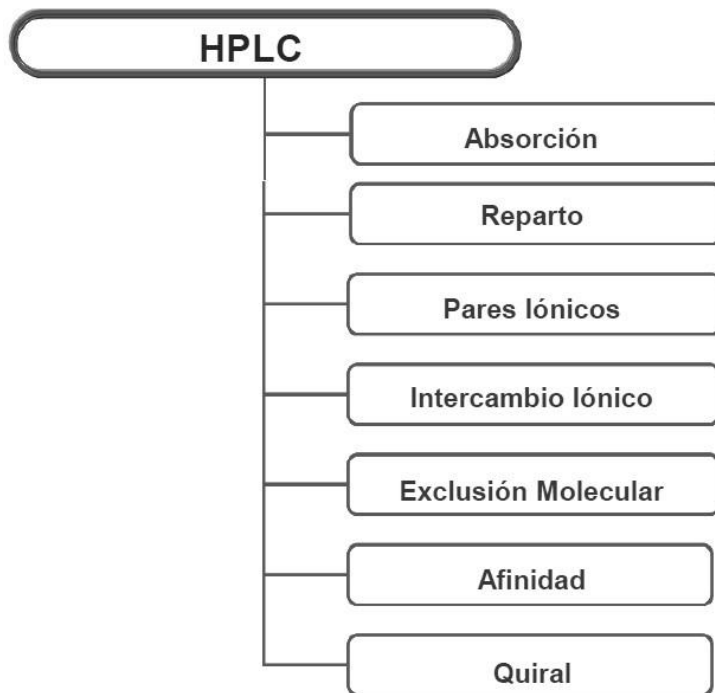


Figura.2.14. Esquema de la clasificación de HPLC

Fase estacionaria sólida: de sólidos finamente divididos (con una gran superficie específica)

- Cromatografía de adsorción

La fase estacionaria sólida retiene a los solutos por un doble efecto de adsorción física y química. Las interacciones implicadas son del tipo de fuerzas de Van der Waals.

- Cromatografía de cambio iónico

El sólido retiene a los solutos gracias a atracciones electrostáticas. La fase estacionaria sólida lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil.

- Cromatografía de exclusión

A veces también llamado de filtración sobre geles o de permeabilidad en geles (GPC), en él la fase estacionaria es un material poroso, que retiene a las moléculas en función de su tamaño.

- Cromatografía de reparto

La fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre un material inerte sólido que sólo actúa de soporte.

- Cromatografía de afinidad o de fases enlazadas

La fase estacionaria es generalmente un polímero de tipo líquido inmovilizado sobre un sólido inerte por enlaces covalentes.

- Cromatografía de Pares Iónicos

Los compuestos orgánicos iónicos son difíciles de cromatografiar directamente, se emplea la FM de un compuesto iónico que aporta un contraión de carga opuesta al analito, que forma con éste un par iónico. Especie neutra relativamente hidrofóbica que se reparte entre FE (Columna de fase inversa) y FM (Reguladora + Modificador + Contraión (+ otra sal)). [25]

2.4.4. -Campos de Aplicación

- Fármacos: antibióticos, sedantes esteroides, analgésicos
- Bioquímica: aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos
- Productos de alimentación: edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas y aditivos
- Productos de la industria química: aromáticos condensados, tensoactivos, propulsores y colorantes
- Contaminantes: fenoles, pesticidas, herbicidas y PCB
- Química forense: drogas, venenos, alcohol en sangre y narcóticos
- Medicina clínica: ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orina y estrógenos.

2.4.5. -Ventajas

- Elevada resolución picos más estrechos
- Mayor velocidad de análisis
- Columnas de HPLC pueden ser reutilizadas sin regeneración
- Mayor reproducibilidad debido al mayor control de los parámetros que afectan a la eficiencia de la separación
- Fácil automatización.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.-OBTENCIÓN DE ÁCIDO LACTOBÍONICO Y ÁCIDO LÁCTICO

3.1.1.-Fermentación de lactosuero para la producción de ácido lactobiónico

La fermentación de lactosuero para la producción de ácido lactobiónico se ha llevado a cabo en discontinuo a temperatura constante de 30 °C. El microorganismo utilizado para la fermentación es una cepa de *Pseudomonas taetrolens* (LMG 2336), la cual puede ser llevada a escala industrial. El control de la evolución del proceso fermentativo se ha realizado siguiendo los parámetros: biomasa, pH y concentración de ácido láctobionico.

Para la producción de ácido lactobiónico, la bacteria *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336 (obtenida a partir de la colección belga de cultivos tipo) fue mantenida a 4 °C en placas de Nutrient Broth n°3 agar (Fluka), con la siguiente composición del medio: extracto de carne (1 g/L), extracto de levadura (2 g/L), peptona (5 g/L) y NaCl (5 g/L). Los cultivos son incubados a 30 °C y bajo condiciones de agitación continua (250 rpm) en un incubador orbital

El procedimiento seguido fue el siguiente:

Día 0.

Se llevó a cabo la inoculación. El volumen final de fermentación es de 400 mL de lactosuero dulce proporcionado por la empresa Industrias Lácteas asturianas (ILAS) de Navia (Asturias). El lactosuero fue esterilizado por filtración tangencial (membrana PVDF de 0.22 m, Durapore, Millipore). Como pre-inóculo se utilizó un cultivo crecido durante 10 horas (100 mL en un matraz Erlenmeyer de 500 mL) del microorganismo *Pseudomonas taetrolens* (LMG 2336) en medio Nutrient Broth. Tras centrifugar todo el volumen de cultivo a 12000 x g durante 10 minutos, la biomasa se inoculó en 100 mL de lactosuero manteniendo durante 12 horas el proceso. La biomasa resultante se utilizó como inóculo del proceso fermentativo final.

La fermentación discontinua (con un inóculo del 25%, v/v) se puso en marcha en un incubador orbital (New Brunswick Scientific Co., modelo G25) a una temperatura de 30 °C y con una agitación de 250 rpm. Se tomaron muestras de medio de fermentación correspondiente al tiempo 0, midiendo a continuación D.O., pH y ácido láctobiónico.

Día 1 y 4

A las 24 y 96 h se tomó una muestra de 25 mL de forma aseptica con pipeta de cristal previamente esterilizada. Esta muestra se dividió en 20 mL para la valoración del ácido lactobiónico, 3 mL para la medida del pH y 2 mL para la determinación de la concentración celular en el medio.

La medida de la densidad óptica se llevó a cabo a una longitud de onda de 600 nm tras centrifugar una muestra (1 mL) durante 10 minutos a 16.000 x g en una centrífuga de meseta (Eppendorf, modelo 5415 D). Como blanco se utilizó NaCl 0.7% (v/v). La medida del pH del sobrenadante de la muestra se realizó tras eliminar las células mediante centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C (centrífuga Kubota, modelo 6500). Alternativamente, se pueden eliminar las células del medio de cultivo por centrifugación, para ello se monta el equipo de filtración, conectado a una trompa de vacío, con un filtro de 47 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro. Conservación de la muestra filtrada a 4 °C o congelada a -20 °C. [28]

3.1.2 -Fermentación de lactosuero para la producción de ácido láctico

La cepa 393 de *Lactococcus lactis* ATCC, se mantuvo congelada (en 40% v/v de glicerol a -2 °C). La cepa se cultivó en caldo M17 (de Sigma-Aldrich) o en placas sólidas (que contiene 2% w/w de agar). Después de la reactivación en 16R en condiciones de microaerofilia (sin agitación), 10% (v/v) de este cultivo (fase de crecimiento exponencial) se utilizó para inocular 90 ml de suero de yogur. Los pre-cultivos fueron incubados a 37 °C durante 20 h, a 100 rpm en un agitador orbital (Infors HT, modelo folleto Aerotron, Bottmingen, Suiza). Posteriormente, se emplearon estos pre-cultivos para inocular fermentaciones en lotes de suero. Se llevaron a cabo fermentaciones sin control de pH en un volumen de trabajo final de 1 litro a 37 °C en un agitador orbital (100 rpm). [27]

3.2.-DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

Una vez realizadas las fermentaciones se procedió a la separación de la biomasa del caldo de fermentación para ello se utilizó un equipo de membranas que se describe en este capítulo.

El equipo experimental de membranas usado en el presente trabajo fue desarrollado por ADEPRO INGENIERÍA S.L. para el estudio del comportamiento de los distintos tipos de membranas.

Todos los elementos van montados sobre una estructura construida en acero inoxidable 304 con ruedas. El elemento central de la instalación es una carcasa construida de acero inoxidable de 600 mm de longitud, dentro de la cual se ponen las membranas.

Un depósito de metacrilato transparente con forma cilíndrica y tapa embridada almacena la alimentación que va ser tratada, la cual se aspira por la parte inferior del depósito y se lleva a las membranas gracias a una bomba EBARA (Mod :2CDXA 70/20). A través de un rotámetro podemos observar el caudal de alimentación. En la entrada y salida de la carcasa de membranas hay dos sensores de presión con sus

correspondientes visualizadores digitales. Dichos controladores son de la marca Omron, modelo E5CN, instalados en el 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

El permeado se saca mediante una válvula manual y el retenido puede recircularse de nuevo al depósito o sacarse al exterior mediante un sistema de válvulas manuales.

En la Figura 3.2 y 3.3 se puede observar el equipo empleado y el diagrama de su funcionamiento



Figura. 3.1. Equipo de membranas

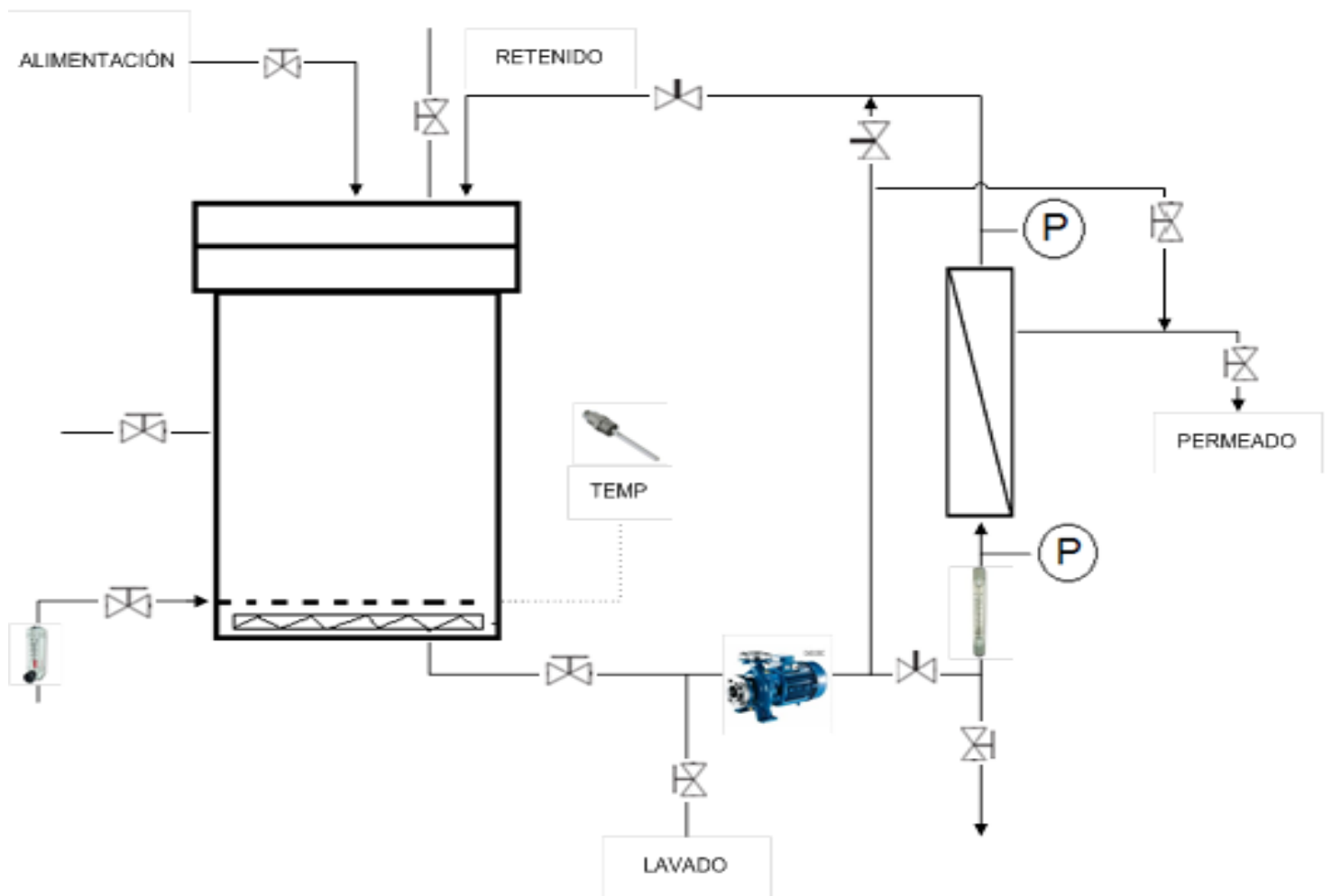


Figura. 3.2. Esquema del equipo de membranas

3.3.-DESCRIPCIÓN DE LA MEMBRANA EMPLEADA

La membrana cerámica (25-60-120 HOUSINGS) usada consta de un soporte de óxido de titanio y una capa activa de ZrO_2 / TiO_2 de la empresa TAMI. $\varnothing 10$ mm con 1 canal de diámetro hidráulico 6mm. Las características principales de la membrana empleada son las que aparecen en la siguiente Tabla 3.1

Tabla. 3.1. Características de la membrana empleada

Tipo de membrana	Membrana CERAM (Tami Industries, Nyons, France)
Diámetro interno	10 mm
Diámetro de poro	150 kDa
Longitud	600 mm

Siempre se hace necesaria una limpieza de la membrana, tanto previamente a la elaboración de la primera producción como en las sucesivas. El procedimiento clásico recomendado se puede observar en la Tabla 3.2.

Tabla .3.2. El procedimiento clásico de la limpieza

Limpieza alcalina Hidróxido sodio (NaOH)	C (g/L)	T (°C)	t (min)
	15-20	85	30
Aumentando hasta neutralidad			
Limpieza ácido ácido nítrico al 58% (HNO₃)	C (mL/L)	T (°C)	t (min)
	5	50	15
Aumentando hasta neutralidad			
Agua			

3.4.-OPERACIÓN DEL EQUIPO

En el proceso de separación con membranas el elemento primordial es la propia membrana. En el presente trabajo se ha utilizado una membrana cerámica, con un caudal de 800L/h.

En un trabajo previo del mismo grupo [29] se han utilizado dos membranas diferentes (cerámica y plástica) 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. Los caudales estudiados han sido 500, 600, 700, 800 L/h. El agua y el suero láctico se utilizan como materiales experimentales para poder llevar a cabo la caracterización de las membranas. Las conclusiones nos dicen que de las dos membranas que se usaron, la cerámica es la que presenta un comportamiento más favorable, y el caudal de 800 L/h es el que proporciona mejores resultados. Éstos

quedan reflejados en la menor pérdida de contenido de lactosa de la mezcla de suero analizado. [29]

Además, sabemos que la presión transmembranal existente en la membrana cerámica fue descendiendo con el paso del tiempo. La temperatura es un factor a considerar, ya que se produce un incremento de la misma por la recirculación del fluido, causando la formación de espuma en los procesos. Así que en el presente trabajo me he centrado en la presión de entrada, presión de salida, temperatura y el tiempo de la filtración.

3.4.1-Pruebas con agua

Previo a la utilización de una membrana nueva se hace necesaria una limpieza completa como muestra la Tabla 3.2. Utilizamos la muestra agua para examinar y ajustar el equipo. Tras comprobar que los elementos están en buen estado y bien conectados entre sí se acciona el interruptor general. A continuación se comprueba la posición de las válvulas para una correcta realización de la operación. Se ajusta el caudal de aire a través de la válvula existente en el rotámetro, observando que el caudal en el propio rotámetro llegue hasta los 800 L/h. Se acciona la bomba de alimentación para que el agua que vamos a tratar se introduzca en el reactor. El caudal se regula mediante la válvula de aguja situada en la línea de retenido. Una vez terminada la operación, se procede a desconectar los aparatos eléctricos a través de sus interruptores y de la propia red.

3.4.2-Pruebas con ácido lactobiónico y ácido láctico

Procedemos a introducir una disolución de 1L de ácido lactobiónico o ácido láctico con 3 L de agua para conseguir un volumen final de 4L, la colocamos y ajustamos para comprobar que no se produce pérdidas por las uniones, filtrando las distintas muestras. Se mantuvo el caudal de 800 L/h. Una vez que se ha filtrado una cantidad fija de muestra (200 mL, 225 mL o 250 mL, según diferentes muestras) se registran los datos mostrados en pantalla: presión de entrada, presión de salida y temperatura. Con ayuda de un cronómetro se han ido tomando los tiempos.

La primera muestra de filtrado se ha denominado “Permeado1”. Una vez obtenida esta muestra del proceso se ha procedido a realizar los mismos pasos con las muestras 2, 3, 4 y 5 de permeado. La velocidad de filtrado será menor a lo largo del proceso, debido al ensuciamiento de la membrana, lo cual provoca que necesitemos más tiempo para filtrar la misma cantidad de muestra. Después de sacar la muestra Permeado 5, se obtiene la muestra del retenido gracias a una válvula que se encuentra en la parte inferior del tanque de recogida. Inicialmente se ha vaciado totalmente el tanque para a continuación llenarlo de 4 L de agua destilada, accionar todo el equipo de nuevo y obtener finalmente una nueva muestra de agua de lavado denominada muestra Agua.

Una vez concluidos los experimentos se inicia el protocolo de limpieza de las membranas. Antes, hemos de esperar unos minutos para que enfríe el tanque de

alimentación, procediendo a continuación con la limpieza según muestra la Tabla 3.2, para así poder meter más muestras. Una vez finalizado el proceso de la filtración de ácido láctico o de ácido lactobiónico, se procede con los mismos pasos anteriores realizados tras obtener las muestras.

3.5.- ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ÁCIDO LACTOBIÓNICO Y ÁCIDO LÁCTICO

3.5.1-El equipo de Cromatografía de Alta Eficacia (HPLC)

Siguiendo el método descrito por Pedruzzi et al. 2007 [26] con unas pequeñas modificaciones se analiza mediante Cromatografía de Alta Eficacia (HPLC) el contenido de ácido láctico y ácido lactobiónico presentes en la muestra. Se utilizan las siguientes condiciones analíticas, 450 mM de H₂SO₄ como fase móvil (pH=3,1), la temperatura de la columna fijada en 75 °C y un flujo de 0,3 mL/min. Para determinar y cuantificar los análisis se usa una columna ICsep ICE-ION-300 (Transgenomic Inc., San Jose, California, Estados Unidos), utilizamos el índice de refracción como detector en un Cromatógrafo Agilent (modelo serie 1200, California, Estados Unidos). Las muestras son cuantificadas usando estándares externos de grado HPLC obtenidos de las siguientes casas comerciales: ácido láctico y ácido lactobiónico (Sigma-Aldrich). La obtención y análisis de datos se hace con el software Agilent ChemStation. El equipo empleado se muestra en la Figura 3.4. [27]



Figura. 3.3. Equipo de Cromatografía de Alta Eficacia

3.5.2-La preparación de muestra para el análisis cuantitativo de ácido lactobiónico y ácido láctico

El rango del equipo va desde los 200 ppm hasta los 4000 ppm. En algunos casos las muestras necesitan ser diluidas debido a su concentración, como mínimo 1:5. Se necesita recoger una muestra de 2 mL (400 μ L de muestras más 1600 μ L de agua destilada). Se filtra con la ayuda de un filtro de jeringa de 5mL (Minisart® 5 mL). Si la concentración está dentro del rango, no hace falta diluir, sólo filtrar.

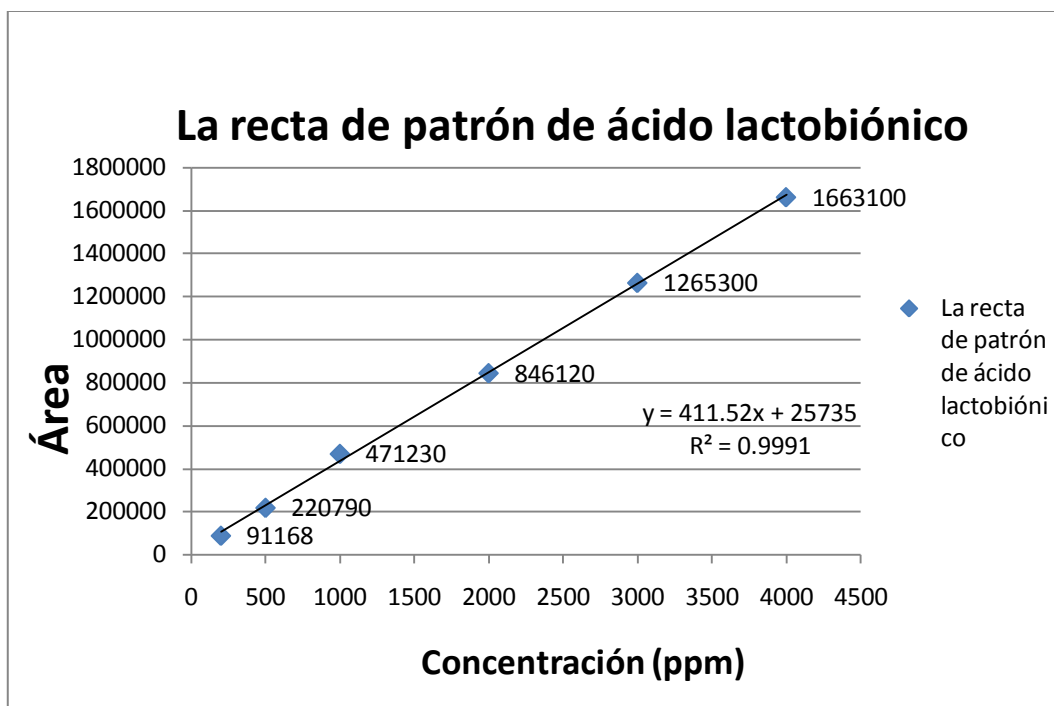


Figura. 3.4. La recta de patrón de ácido lactobiónico

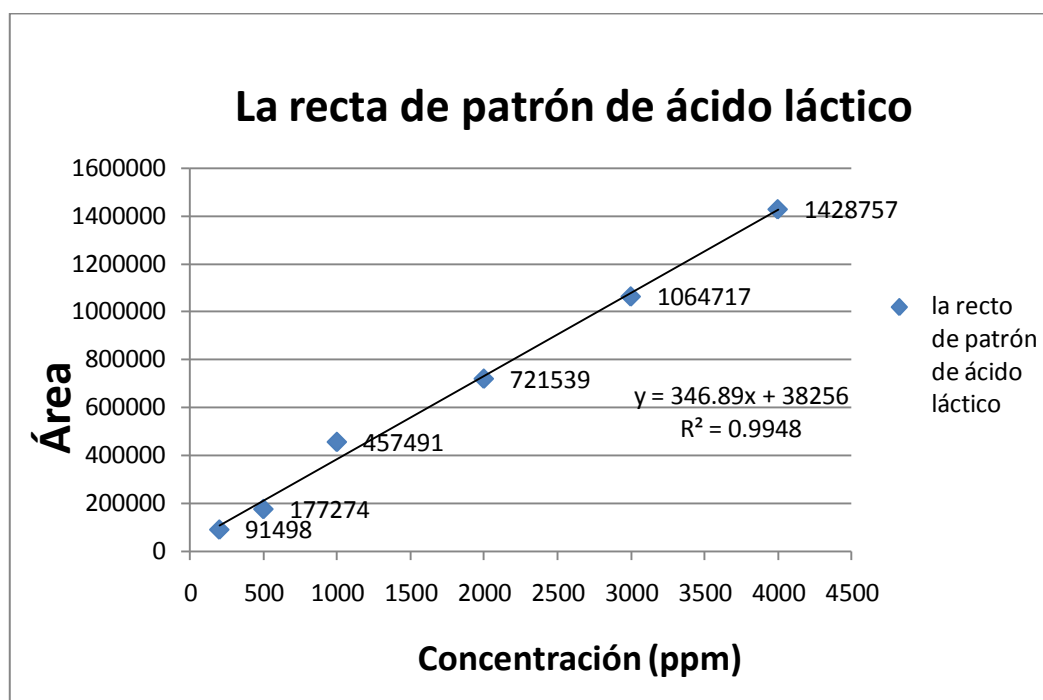
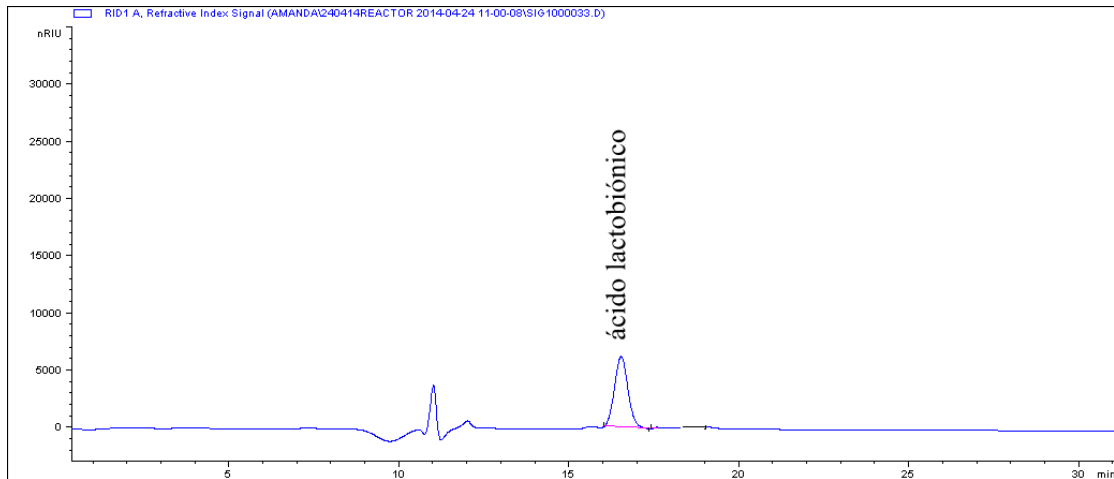
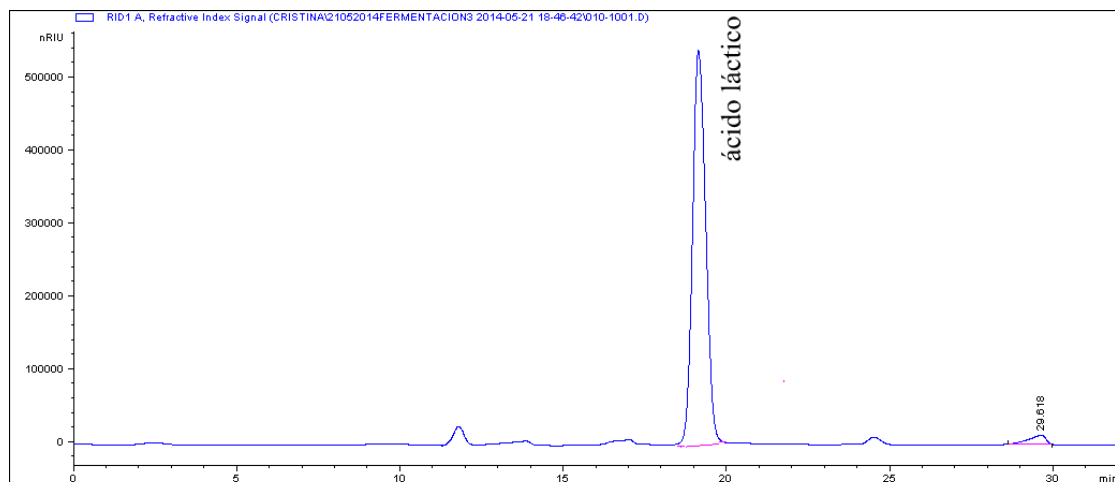


Figura. 3.5. La recta de patrón de ácido láctico

Para la determinación cuantitativa del ácido lactobiónico se ha usado el mismo procedimiento que para la cuantificación de ácido láctico. Obteniéndose los cromatogramas tipo que aparecen a continuación en la Figura 3.4 y 3.5.

**Figura 3.6. Cromatograma de la elución del ácido lactobiónico****Figura 3.7. Cromatograma de la elución del ácido láctico**

3.6-DETERMINACIÓN DE PH, DENSIDAD ÓPTICA Y BIOMASA DE ÁCIDO LACTOBIÓNICO Y ÁCIDO LÁCTICO

Una vez obtenemos las muestras del permeado, retenido y agua, se usan para determinar el pH y su densidad óptica.

3.6.1- Determinación del pH

El equipo que usamos es el pH metro Crison, modelo 2000. Para muestras líquidas, se procede a eliminar la biomasa mediante centrifugación (centrifuga Kubota, modelo 6500) durante 10 minutos a 12000 rpm con 3mL de muestra. Con la ayuda del pH metro se puede saber su pH desde la pantalla digital.

3.6.2- Determinación de la densidad óptica (OD)

Para la determinación de la densidad óptica necesitamos preparar previamente el Blanco que se hará en una disolución de cloruro de sodio (NaCl) a 0,7% (w/v). Para muestras líquidas, se procede a concentrar la biomasa mediante centrifugación a 13200 rpm durante 5 minutos con un mililitro de muestra, con la ayuda del equipo Centrifuge 5415D. Se elimina con mucho cuidado el sobrenadante y se añade 1 ml adicional del Blanco, es decir, la disolución de NaCl. Usamos el equipo Espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV 1203, a una longitud de onda de 600 nm para saber su densidad óptica (OD). [22]

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- MEMBRANAS

4.1.1-Con agua

Para la caracterización de las mismas empezamos llenando el tanque anteriormente descrito con 4 L de agua, para observar el comportamiento frente al caudal de 800 L/h con la membrana cerámica. Mientras que se evita la posibilidad de la pérdida de agua, y nos fijamos los cambios en la presión de entrada, presión de salida, temperatura y el tiempo.

4.1.2-Con ácido lactobiónico(I).

Para cada experimento se pretende determinar la variación del filtrado con respecto al tiempo. Registro los datos de la presión de entrada, presión de salida, temperatura y el tiempo de las muestras del ácido lactobiónico.

Para poder llevar a cabo la caracterización de las membranas se tomaron 1 litro de muestra de la fermentación del ácido lactobiónico (proporcionado por la fermentación de Cristina) que fueron mezclados con tres litros de agua, para así poder trabajar con un volumen de alimentación final de cuatro litros, ya que si no el funcionamiento del rotámetro sería erróneo, debido a que su manipulación no podrá ser llevada a cabo por coger aire. En este caso el caudal estudiado ha sido 800 L/h y con la membrana cerámica.

Los datos que aparecen reflejados en la Tabla.4.1, muestran los permeados que se obtuvieron según se fueron sacando del equipo. El Permeado 1 es la primera muestra de 225ml que se sacó después de 50s tras haber inicializado el equipo. Al mismo tiempo se pueden leer los datos en su pantalla. La temperatura del Permeado 1 es baja porque el equipo acababa de comenzar su funcionamiento. Se produjo un aumento del tiempo a la hora de conseguir más muestras. Éste puede ser debido a que se estaba produciendo una mayor retención en la membrana cuando trabajaba con caudales durante más tiempo, lo que reduce el diámetro de poro causando una menor permeabilidad de la misma. Igualmente se obtuvieron las muestras 2, 3, 4 y 5 de permeado para un volumen de 225mL. Finalmente obtuve una muestra de permeado de 1,125L. Después de sacar la muestra Permeado 5, se obtuvo la muestra del retenido. Añadí cuatro litros de agua destilada, se grabaron los datos y conseguí la muestra Agua de 225mL.

Tabla. 4.1. Presión de salida, temperatura, presión de entrada y el tiempo de filtración del ácido lactobiónico (I).

	P.salida (bar)	T (°C)	P.entrada (bar)	t (s)
Permeado 1	4.03	28	5.85	157
Permeado 2	3.88	33.2	5.65	128
Permeado 3	3.81	36	5.56	152
Permeado 4	3.71	38.3	5.35	170
Permeado 5	3.39	39.4	5.31	240
Agua	4.03	30.1	5.85	80

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. El cambio de la temperatura es desde los 28 °C a 39,4 °C. La media del cambio de la temperatura es de 3,1 °C. A medida que aumenta el tiempo el aumento de la temperatura se ralentiza, porque cuando la temperatura llega a un punto alto es más difícil lograr aumentarla. Se produce un aumento a la hora de sacar las muestras, desde un mínimo de 124 s hasta un máximo de 240 s, especialmente la última muestra Permeado 5. La media de tiempo es de 169,4 s, aunque la muestra Permeado 2 tarda menos tiempo en filtrar, no obstante tiene una tendencia de crecimiento en general. Los datos de la muestra Agua son parecidos a los datos de la muestra Permeado 1, pero el tiempo para conseguir la misma cantidad de muestra es mucho menor, porque dentro de la muestra de agua no tiene tanto ácido lactobiónico.

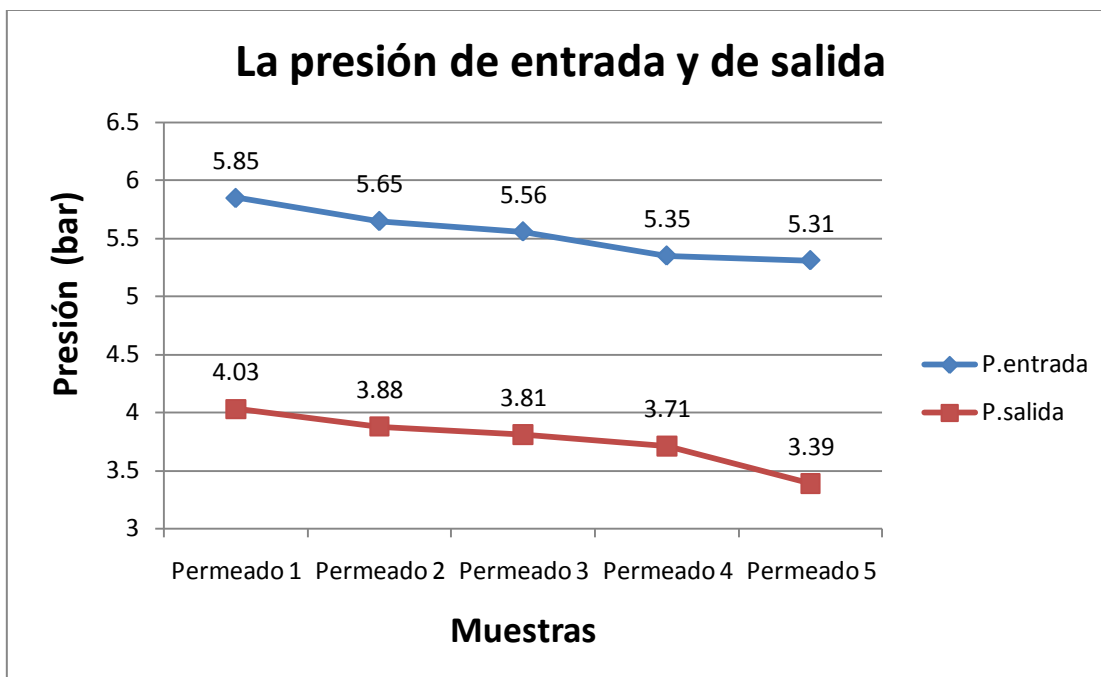


Figura.4.1. La presión de salida y de entrada de la filtración ácido lactobiónico (I).

Las condiciones físicas y/o químicas de las muestras a tratar producen un ensuciamiento más o menos importante en las membranas, lo cual hace descender sus prestaciones. El efecto de la presión en la productividad total de la membrana es el resultado de la suma de la productividad instantánea y de la compactación. Normalmente, la productividad es siempre mayor si operamos a alta presión. La presión de entrada va desde los 5,85 bares hasta los 5,31 bares. La media de cada fila de presión de entrada es de 0,135 bares. La presión de salida va desde los 4,03 bares hasta los 3,39 bares. La media de la cada fila de presión de salida es de 0,16 bares. Las dos líneas tienen la misma tendencia descendente.

4.1.3.-Muestra de ácido lactobiónico (II)

Los datos de la muestra de ácido lactobiónico (II) aparecen reflejados en la Tabla.4.2. Las muestras se denominan como se describió anteriormente, y cada vez se obtuvo 200mL.

Tabla.4.2. Presión de salida, temperatura, presión de entrada y el tiempo de filtración del ácido lactobiónico (II).

	P.salida (bar)	T (°C)	P.entrada (bar)	t (s)
Permeado 1	4.95	26.3	5.95	482
Permeado 2	4.54	33.1	5.68	545
Permeado 3	4.26	40.2	5.31	426
Permeado 4	3.87	45.1	4.85	418
Permeado 5	3.62	48.2	4.49	697
Agua	4.88	24.5	5.90	270

El cambio de la temperatura es desde los 26,3 °C a los 48,2 °C. La media del cambio de la temperatura es de 5,4 °C. El tiempo para sacar las muestras es desde un m ínimo de 426 s hasta un m áximo de 697 s, la media es de 513,6 s.

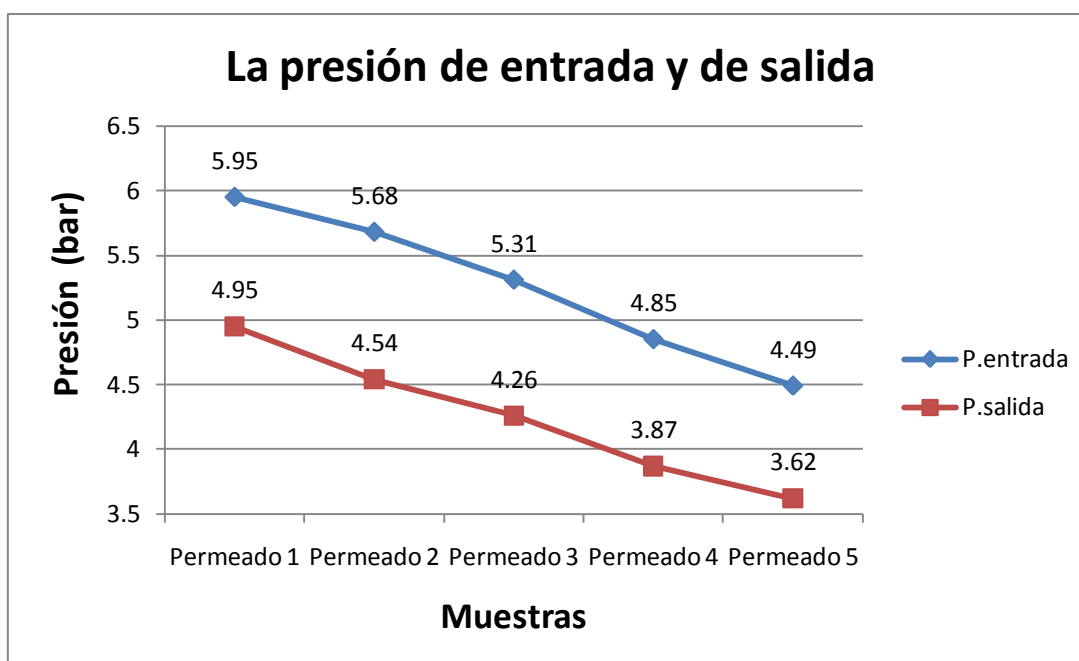


Figura.4.2. La presión de salida y de entrada de la filtración ácido lactobiónico (II).

La presión de entrada es desde 5,95 bares a 4,49 bares. La media de cada fila de presión de entrada es de 0,365 bares. La presión de salida va desde los 4,95 bares hasta los 3,62 bares. La media de cada fila de presión de salida es de 0,3325 bares.

4.1.4.-Con ácido láctico (I)

Tenemos dos muestras de ácido láctico que tienen diferentes concentraciones. Se tomaron 1 litro de ácido láctico (I) (proporcionado por la fermentación de Cristina) que fue mezclado con tres litros de agua destilada para poder trabajar con un volumen de alimentación final de cuatro litros. No hay cambios en los datos básicos, el caudal ha sido 800 L/h y con la membrana cerámica. Las muestras son los permeados que se obtuvieron según se fueron sacando del equipo. El Permeado 1 es la primera muestra de 225ml que se obtuvo después de 1min del inicio del equipo. Se consiguieron los Permeados 2, 3, 4 y 5 con un volumen de 225mL, haciendo un total de 1,125L. A continuación se obtuvo el retenido y se añadió cuatro litros de agua destilada para conseguir la muestra Agua.

Tabla.4.3. Presión de salida, temperatura, presión de entrada y el tiempo de filtración del ácido láctico (I)

	P.salida (bar)	T (°C)	P.entrada (bar)	t (s)
Permeado 1	4.13	31.2	5.93	114
Permeado 2	4.02	34.4	5.73	101
Permeado 3	3.97	36.5	5.68	118
Permeado 4	3.92	39.2	5.65	102
Permeado 5	3.82	42	5.48	116
Agua	4.13	30.2	5.92	110

Como podemos ver en la Tabla 4.3 el cambio de la temperatura va desde los 31,2 °C a los 42 °C. La media de cambio de temperatura es de 2,7 °C. La temperatura llegó a 42 °C cuando se sacó la última muestra, es mejor que siempre sea inferior a 40 °C, porque a medida que la temperatura aumenta, hay más probabilidades de producir grandes cantidades de espuma. La generación de espuma es producida por la fuerza externa, las sustancias tensioactivas contenidas en la solución y las burbujas creadas por el aire de la solución. El tiempo empleado para sacar cada muestra fue desde un mínimo de 101s hasta un máximo de 118s. El tiempo que tardé en obtener sucesivas muestras no fue en aumento como sí ocurrió con el anterior experimento. Es decir, la membrana no se ensució mucho a pesar de que no filtró perfectamente la muestra de ácido láctico, que permaneció dentro. La media de tiempo es 110,42s (se filtraron demasiado rápido).

Los datos de la muestra Agua son parecidos a los datos de la muestra Permeado 1. En teoría, el tiempo necesario para sacar la misma cantidad de permeado de la muestra Agua es menos que con la muestra Permeado 1.

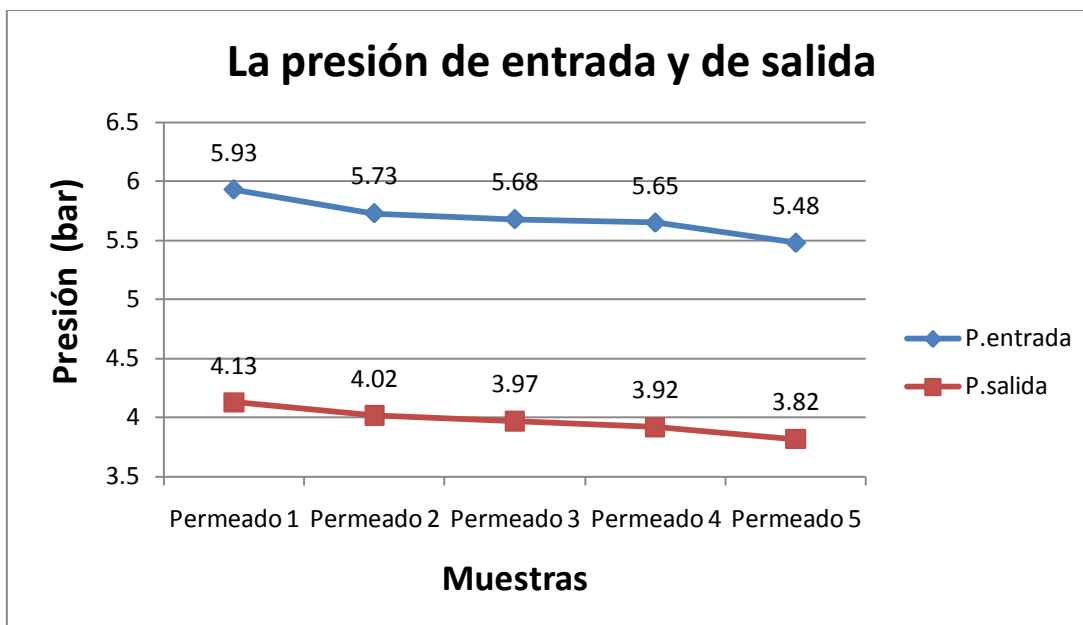


Figura. 4.3. Presión de salida y de entrada de la filtración del ácido láctico (I).

Sabemos los datos de la presión de entrada y de salida de cada muestra, con lo cual podemos saber que las presiones están bajando, porque producen un ensuciamiento más o menos importante en las membranas. La presión de entrada es desde 5,93 bares a 5,48 bares. La media de la cañía de presión de entrada es 0,1125 bares. La presión de salida va desde los 4,13 bares hasta los 3,82 bares. La media de la cañía de presión de salida es de 0,0775 bares, menos de la mitad de la media de cañía de salida de la muestra del ácido lactobiónico. Ambas líneas tienen tendencias descendentes.

4.1.5.-Con ácido láctico (II)

Se tomaron 1,2 L de ácido láctico (II) -proporcionado por la fermentación de Cristina-, que fueron mezclados con 2,8 L de agua, para poder trabajar con un volumen de alimentación final de tres litros. El caudal ha sido de 800 L/h, con la membrana cerámica. Se obtuvieron 200 mL de muestras de Permeado 1, 2, 3, 4, Retenido y Agua, como antes. Es decir 25 mL menos que antes. Sólo cuatro permeados con volumen total de 0,8 L.

Tabla.4.4. Presión de salida, temperatura, presión de entrada y el tiempo de filtración del ácido láctico (II).

	P.salida (bar)	T (°C)	P.entrada (bar)	t (s)
Permeado 1	5.75	20.2	5.92	439
Permeado 2	5.2	30.4	5.65	455
Permeado 3	4.85	38.1	5.21	471
Permeado 4	4.41	45.3	4.7	530
Agua	5.81	22.7	5.85	291

El cambio de la temperatura es desde 20,2 °C a 43,3 °C. La media del cambio de la temperatura es 8,23 °C. Esta vez la temperatura máxima es superior a 40 °C (siempre es mejor menos de 40 °C). La temperatura subió mucho por encima de los 20,2 °C porque el tiempo de cada filtración es mucho mayor que antes. El tiempo para sacar cada muestra fue desde los 439 s hasta un máximo de 530 s, la última muestra Permeado 4 fue la que más tiempo tardó en filtrar. La media del tiempo es de 473,7 s. La membrana se ensució mucho y la muestra se filtró completamente. Los datos de la muestra Agua sobre la presión de entrada y salida son parecidos a los datos de la muestra Permeado 1. El tiempo necesario para conseguir la misma cantidad de muestra es mucho menor porque dentro de la muestra de agua hay menos ácido láctico.

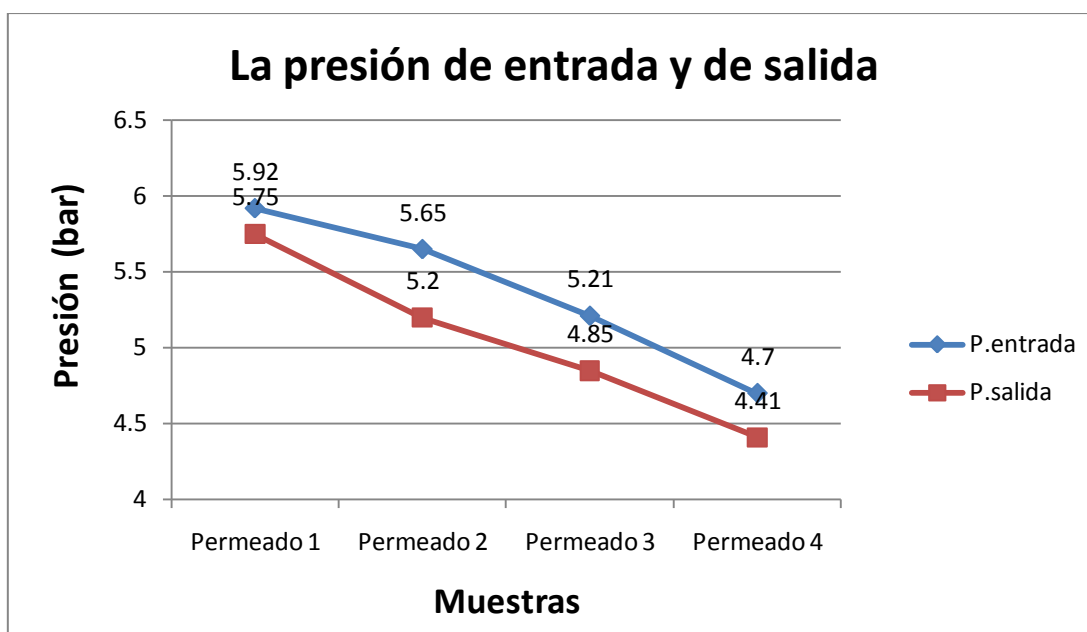


Figura.4.4. La presión de salida y de entrada de la filtración ácido láctico (II).

Según la Figura 4.4. La presión de entrada va desde 5,92 bares a 4,7 bares. La media de la caída de presión de salida es 0,41 bares. La presión de salida es desde 5,75 bares

hasta los 4,41 bares. La media de la ca ña de presi ón de entrada 0,45 bares. La membrana se ensuci ó mucho y la presi ón de salida es muy grande.

4.2-ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ÁCIDO LACTOBIÓNICO Y ÁCIDO LÁCTICO

4.2.1. -Ácido lactobi ónico (I)

Las muestras de ácid o lactobi ónico se denominan tal como se describe con anterioridad. Para determinar la concentraci ón de ácid o latobi ónico se utiliz ó la metodolog ía de cromatograf ía líquida de alta precisi ón (HPLC). De este modo consegu í la concentraci ón de la unidad ppm de la tabla 2.1.

Tabla.4.5.Las concentraciones experimentales de las muestras del ácid o lactobi ónico(I)

Inicial	Diluido	Permeado1	Permeado2	Permeado3	Permeado4	Permeado5	Retenido1	Retenido2	Agua
15813.61	3713.35	1221.81	1833.13	1886.98	1850.68	1837.73	2139.56	2148.17	1010.4

Cada muestra se corresponde con un determinado volumen. Con su concentraci ón se pueden calcular los pesos del ácid o lactobi ónico de todas las muestras. (Tabla. 2.2)

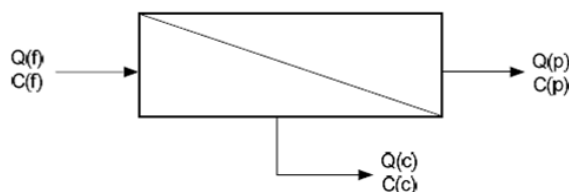


Figura.4.5. Esquema del sistema por membrana.

La recuperaci ón del sistema por membrana se calcula de la siguiente forma:

$$[Q(p) / Q(f)] \times 100 = \% \text{ de recuperaci ón} \quad (1)$$

Siendo Q(f): Flujo de alimentaci ón

Q(p): Flujo de permeado.

El balance de masa en torno a la alimentaci ón de TDS (soluto) se puede escribir como:

$$Q(f)C(f) = Q(p)C(p) + Q(c)C(c) \quad (2)$$

Siendo: Q(c): Flujo de concentrado.

C(c): Concentración de soluto.

C(f): Concentración de alimentación de soluto concentrado.

C(p): Concentración de soluto permeado.

Tabla.4.6. Las concentraciones, los volúmenes y los pesos de las muestras del ácido lactobiónico (I)

	C (g/L)	V(L)	M (g)
Inicial	15.81	1	15.81
Diluido	3.71	4	14.84
Permeado 1	1.22	0.225	0.275
Permeado 2	1.83	0.225	0.412
Permeado 3	1.88	0.225	0.423
Permeado 4	1.85	0.225	0.416
Permeado 5	1.83	0.225	0.412
Retenido 1	2.139	0.225	6.171
Retenido 2	2.148	2.65	
Agua	1.010	6.1	6.161

Como se puede observar en la Tabla.4.6, las muestras de Permeado1, 2, 3, 4, 5 (se sacaron de una a una) tienen las concentraciones parecidas a la mitad de la muestra diluida. Solo la concentración de Permeado 1 es un poco baja, porque se quedó un poco de agua destilada en el tubo de permeado, así que influyó en el resultado. Aunque solo metí cuatro litros de agua destilada en el equipo, el volumen total es 6,10. Esto es debido a que el equipo tiene un volumen muerto de 2,1 litros. El ácido lactobiónico(I) de la muestra Agua está compuesto por 2,1 litros de retenido.

Tabla.4.7. Resultados del proceso de filtración de las muestras del ácido lactobiónico (I)

Ácido lactobiónico (I)			
Muestras	Peso (g)	Porcentaje de inicio	
Peso de LBA tanque inicio proceso	15.81	100%	
Peso de LBA del permeado	1.938	12.2%	51.2%
Peso de LBA del retenido	6.171	39%	
Peso de LBA del agua	6.161	40%	
La recuperación del sistema por membrana	12.2 %		

En la Tabla 4.7 podemos observar un pequeño resumen. En principio se puede saber que la membrana cerámica funciona bien con la filtración de ácido lactobiónico(I). La parte de la cantidad de ácido lactobiónico en la muestra de Agua es grande, un 40% de la muestra inicial, porque el equipo tiene un gran volumen muerto, muchos retenidos se quedaron dentro. Se ha determinado un error del 9% en la medida de los volúmenes.

4.2.2 -Ácido lactobiónico (II)

Con la ayuda del equipo de HPLC, sabemos la concentración del ácido lactobiónico (II) de todas las muestras, junto con el volumen de cada una de ellas, tal y como se describe en la tabla 4.8.

Tabla.4.8. Las concentraciones, los volúmenes y los pesos de las muestras del ácido lactobiónico (II)

	C (g/L)	V(L)	M (g)
Inicial	13.89	1	13.89
Diluido	3.37	4	13.48
Permeado 1	1.18	0.250	0.295
Permeado 2	2.51	0.200	0.502
Permeado 3	1.69	0.200	0.338
Permeado 4	2.09	0.200	0.420
Permeado 5	2.10	0.200	0.420
Retenido	1.71	2.95	5.044
Agua	1.01	6.1	6.161

Como se muestra en la Tabla 4.9, el ácido lactobiónico(II) del permeado es del 14,2% de la cantidad total, y la muestra en el retenido es del 36,3%, el total es un 50,5%. Hay 44,3% de muestra que se quedó dentro del equipo por el volumen muerto.

Tabla.4.9. Resultados del proceso de filtración de las muestras del ácido lactobiónico (II)

Ácido lactobiónico (II)			
Muestras	Peso (g)	Porcentaje de inicio	
Peso de LBA tanque inicio proceso	13.89	100%	
Peso de LBA del permeado	1.975	14.2%	50.5%
Peso de LBA del retenido	5.044	36.3%	
Peso de LBA del agua	6.161	44.3%	
La recuperación del sistema por membrana	14.2 %		

4.2.3.-Ácido láctico (I)

Para determinar la concentración de ácido láctico se utilizó también la metodología de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC). La muestra inicial que se usó era ácido láctico (I). Como ya tenía de los datos de la presión de entrada y de salida del proceso de esta muestra sabía que esta membrana no filtraría perfectamente. Tuve la hipótesis de que en la muestra inicial, los permeados y el retenido no tienen mucho ácido láctico, así que esta vez las muestras para HPLC son 2mL sin diluir, y después de filtrar conseguimos los datos mostrados abajo (Tabla 4.10).

Tabla.4.10. Las concentraciones, los volúmenes y los pesos de las muestras del ácido láctico (I)

	C (g/L)	V(L)	M (g)
Inicial	2.76	1	2.76
Diluido	0.67	4	2.70
Permeado 1	0.17	0.225	0.038
Permeado 2	0.30	0.225	0.067
Permeado 3	0.29	0.225	0.065
Permeado 4	0.32	0.225	0.072
Permeado 5	0.42	0.225	0.094
Retenido	0.35	2.875	1.006
Agua(fil)	0.20	6.1	1.22

La concentración inicial de la muestra ácido láctico (I) es muy poca. Obtenemos resultados parecidos a la muestra anterior. La concentración de la muestra Permeado 1 es más baja que otras muestras de permeado por la dilución del agua que se había quedado. La concentración de otros permeados no tiene mucha diferencia, son la mitad de la concentración diluida. Se quedó una gran cantidad de muestra en el agua destilada que se añadió después. (Tabla. 4.11)

Tabla.4.11. Resumen de los pesos de las muestras del ácido láctico (I)

Ácido láctico (I)			
Muestras	Peso (g)	Porcentaje del inicio	
Peso de ácido láctico tanque inicio proceso	2.76	100%	
Peso de ácido láctico del permeado	0.336	12.1%	48.5%
Peso de ácido láctico del retenido	1.006	36.4%	
Peso de ácido láctico del agua	1.22	44%	
La recuperación del sistema por membrana	12.1 %		

La Tabla 4.11 representa el resumen de las muestras del ácido láctico (I). El porcentaje del ácido láctico en el permeado, en el retenido y lo que quedó dentro del equipo.

4.2.4-Ácido láctico (II)

Esta muestra es la mezcla de 1,2L de ácido láctico (II) con 1,8L de agua. Se utilizó HPLC para calcular su concentración. Debido a que no tenemos muchas diluciones sólo se obtuvieron cuatro botellas de muestra de permeado con 200mL.

Tabla.4.12. Concentraciones, volúmenes y pesos de las muestras del ácido láctico (II)

	C (g/L)	V(L)	M (g)
Inicial	13.21	1.2	15.856
Diluido	5.00	3.0	14.980
Permeado 1	2.14	0.2	0.428
Permeado 2	3.40	0.2	0.680
Permeado 3	3.40	0.2	0.680
Permeado 4	3.18	0.2	0.636
Retenido	2.51	2.2	5.522
Agua(fil)	1.55	0.2	6.8
Agua(ret)	1.10	5.9	

Excepto la concentración de la muestra Permeado1, las demás no son tan bajas. La concentración de los otros Permeados 2, 3, 4 son parecidas. Según los resultados de la presión de entrada y salida y de sus tiempos de filtrado, se sabe que la membrana se ensució mucho debido a que tenía los poros de filtrar más pequeños. La presión de salida es muy grande, tardó más tiempo en sacar la misma cantidad de muestra que antes y los permeados se concentraron más. Según los resultados, sabemos que la concentración de los permeados es más de la mitad de la concentración diluida.

Tabla.4.13. Resultados del proceso de filtración de las muestras del ácido láctico (II)

Ácido Láctico (II)			
Muestras	Peso (g)	Porcentaje del inicio	
Peso de ácido láctico del tanque inicio proceso	15.856	100%	
Peso de ácido láctico del permeado	2.424	15.3%	50.1%
Peso de ácido láctico del retenido	5.522	34.8%	
Peso de ácido láctico del agua	6.800	42%	
La recuperación del sistema por membrana	15.3 %		

Observemos la Tabla 4.13. Por la presencia del volumen muerto del equipo, la parte del peso del ácido láctico (II) del agua es del 42%, del permeado un 15,3% y del retenido un 34,8%, todo ello con respecto a la muestra inicial

4.3-DETERMINACIÓN DEL pH Y DENSIDAD ÓPTICA.

4.3.1.-Determinación del pH y densidad óptica de ácido lactobiónico (II)

Según la Tabla 4.14 podemos observar el pH y densidad óptica del ácido lactobiónico (II)

Tabla.4.14. El pH, la densidad óptica y la presencia de biomasa de las muestras del ácido lactobiónico (II)

	Inicial	Diluido	Permeado1	Permeado2	Permeado3	Permeado4	Permeado5	Afil	Are
pH	4.61	4.6	6.4	6.36	5.89	5.61	5.53	5.26	5.44
Densidad Óptica	1.21	0.244	0.016	0.024	0.01	0.006	0.012	0.174	0.04
Biomasa	P	P	A	A	A	A	A	P	P

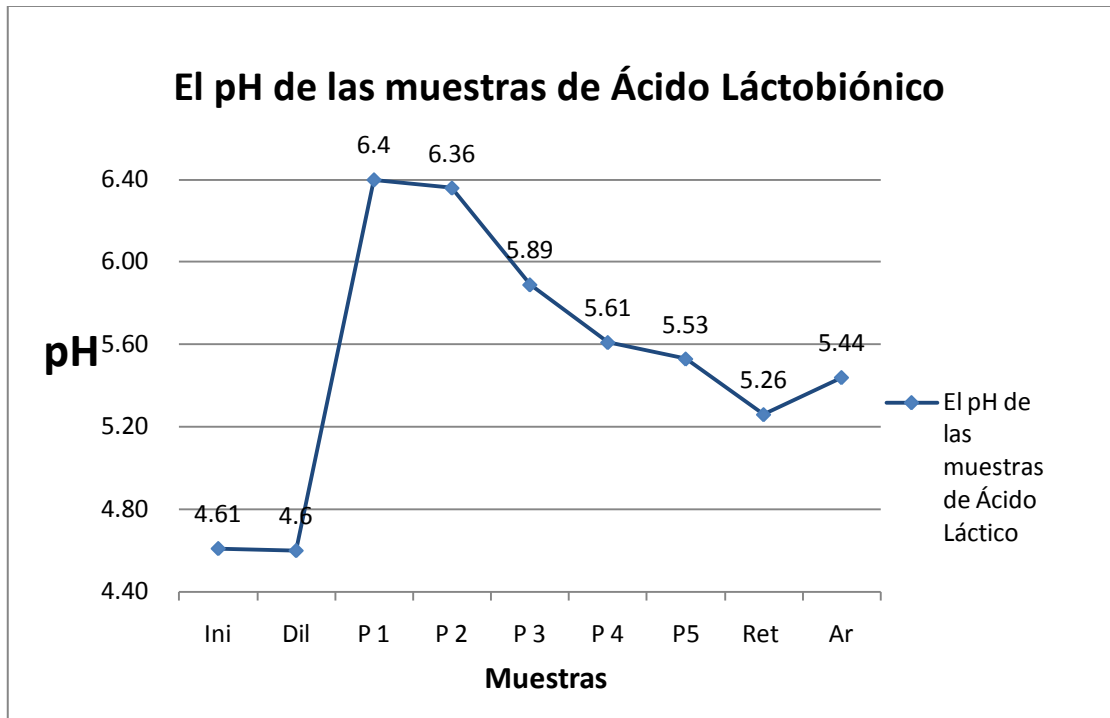


Figura.4.6. pH de la muestra de ácido lactobiónico (II)

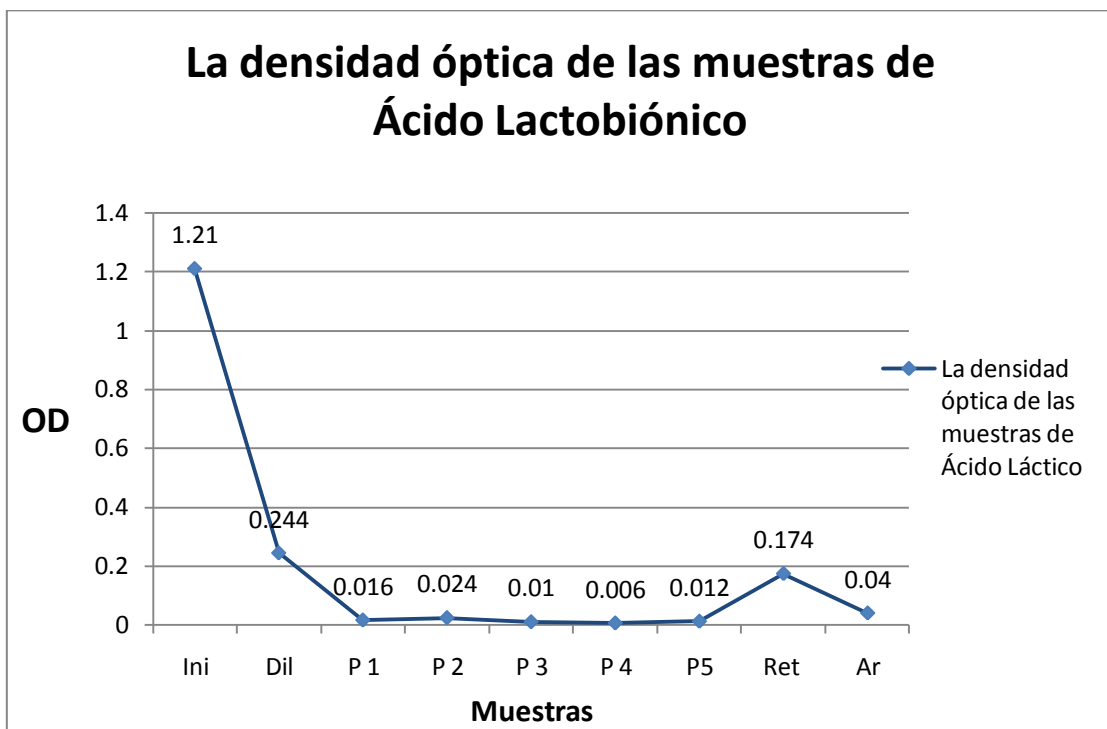


Figura. 4.7. Densidad óptica de la muestra de ácido lactobiónico (II)

Según la Figura 4.6, 4.7, y la Tabla 4.14, sabemos en este caso que la membrana funcionó correctamente en el proceso de separación de biomasa, la cual se quedó en el retenido.

4.3.2.-A continuación, Tabla 2.8, podemos observar el pH y densidad óptica de ácido láctico (II).

Tabla.4.15. El pH, la densidad óptica y la presencia de biomasa de las muestras del ácido láctico (II)

	Inicial	Diluido	Permeado1	Permeado2	Permeado3	Permeado4	Retenido	Afil	Are
pH	4.60	4.65	5.66	4.77	4.73	4.69	4.67	4.67	4.77
Densidad Óptica	1.71	0.104	0.016	0.005	0.011	0.003	0.157	0.006	0.133
Biomasa	P	P	A	A	A	A	P	A	P

En las siguientes figuras 3.1 y 3.2, mostramos la tendencia de los cambios del pH y la densidad óptica de la muestra ácido láctico.

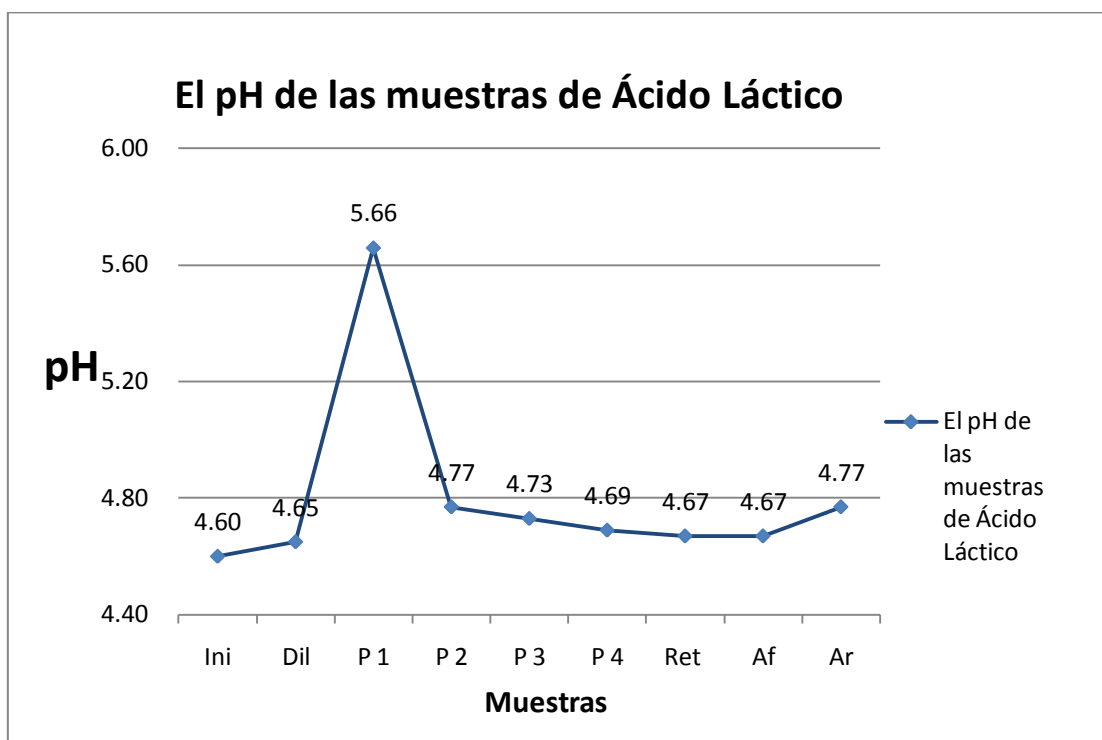


Figura.4.8. pH de la muestra de ácido láctico (II).

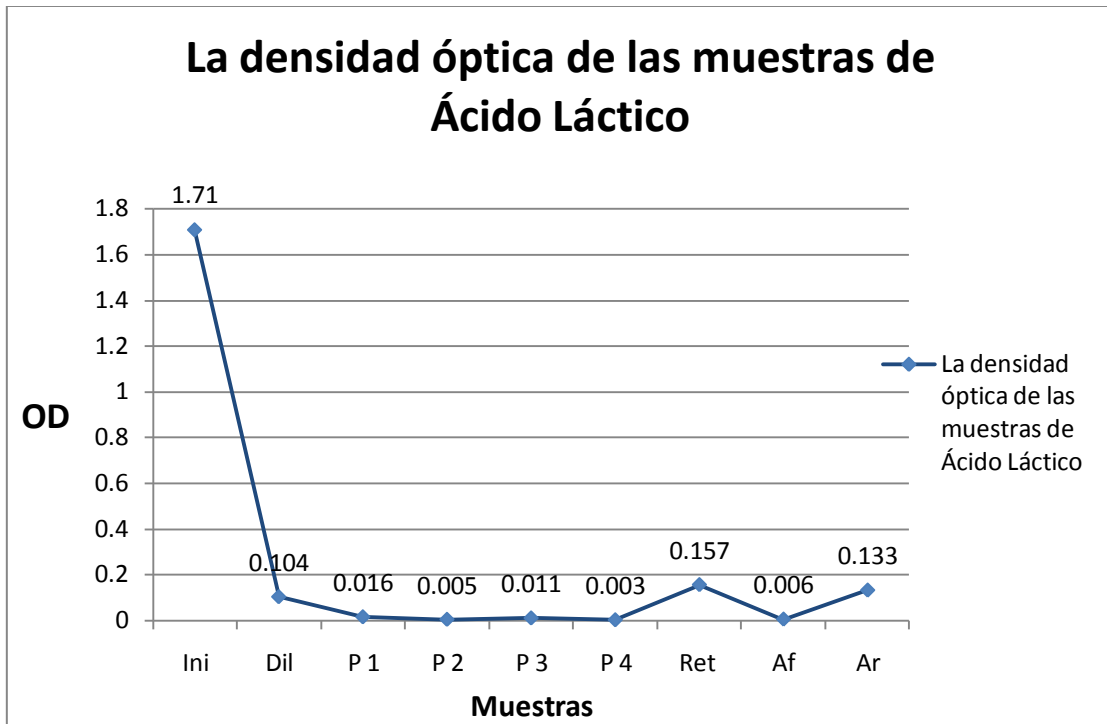


Figura. 4.9. Densidad óptica de la muestra de ácido láctico (II)

Según la figura 3.2 sabemos en este caso que la membrana funcionó bien para la separación de biomasa, la cual se quedó en el retenido. En los permeados no tenían biomasa. Si nos centramos en los resultados de la presión de entrada y salida, podemos saber que las presiones son altas, especialmente la presión de salida. Es decir que para retener la biomasa se necesita una membrana con poros pequeños y con presión alta.

5. CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos previamente podemos sacar las siguientes conclusiones:

Análisis de propiedades físicas:

- La presión transmembranal existente en la membrana cerámica fue descendiendo con el paso del tiempo en los procesos del fermentado de ácido lactobiónico y ácido láctico.
- La temperatura fue aumentando con el paso del tiempo. Genera una gran cantidad de calor con el sistema cerrado, como consecuencia de la recirculación del fluido con un caudal de 800L/h.
- La velocidad de filtrado será menor a lo largo del proceso, debido al ensuciamiento de la membrana (bloqueo superficial de los poros, se forman unas capas superficiales a lo largo de toda la membrana), lo cual provoca que necesitemos más tiempo para filtrar la misma cantidad de muestra.

Análisis cuantitativo de ácido lactobiónico y ácido láctico tras su filtrado:

- La recuperación del sistema por membrana con el análisis cuantitativo de ácido lactobiónico es aproximadamente del 13,2%.
- La recuperación del sistema por membrana con el análisis cuantitativo de ácido láctico es aproximadamente del 13,7%.
- El equipo tiene un volumen muerto de 2,1 litros. El retenido de las muestras se separaron en dos partes, la mitad se quedó en el tanque y la otra mitad se quedó en el volumen muerto del equipo y en el ensuciamiento de la membrana.
- Se ha determinado un error del 8% en la medida de los volúmenes.

La capacidad y la viabilidad de la separación de biomasa:

- La membrana funcionó correctamente en la separación de la biomasa, la cual se quedó en el retenido.

6. BIBLIOGRAF 

6.- BIBLIOGRAFÍA

- [1]Prevención de la contaminación de la industria láctea. Centro de actividad regional para la producción limpia (CAR/PL, 2002) plan de acción para el mediterráneo.
- [2]Alternativas para el tratamiento de lactosuero para un desarrollo sostenible en el Valle de Tulancingo, Hidalgo. Rafael Germán Campos Montiel Coordinador. Universidad autónoma del estado de Hidalgo Tulancingo de bravo, Hidalgo 2007 IBSN 970-769-120-4
- [3]Ricardo Heliodoro Gil-Horán, Rosa María Domínguez-Espinosa, Juan Daniel Pacho-Carrillo. (2008) Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnol. Ciencia Ed (IMIQ)*, 23(2):79
- [4]Serna L.C. y Rodríguez de S. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico:Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(1):54-65.
- [5]Weey, Kimj, Ryuh. (2006) Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 163-172.
- [6]Skory, C. (2000). Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 6: 2343-2348.
- [7] Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Capítulo 1 en *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Salminen, S., Wright A. Y Oumehand. Ed. Marcel – Dekker, Nueva York.
- [8]Saúl Alonso, Manuel Rendueles, Mario Dáz, M. (2012).Role of dissolved oxygen availability on lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresource Technology* 109 (2012) 140–147

- [9]Saúl Alonso, Manuel Rendueles, Mario Dáz. (2013) Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. *Biotechnology Advances* 31: 1275–1291
- [10]Alonso, S., Rendueles, M., & Dáz, M. (2011). Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-Shift conditions. *Bioresource Technology*,102: 9730-9736.
- [11] Baruah, G. L.; Belfort, G. (2004) Optimized recovery of monoclonal antibodies from transgenic goat milk by microfiltration. *Biotechnology and Bioengineering*. 87(3):274-285.
- [12]Alejandro Chacón-Villalobos. (2006).Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Revisión bibliográfica*. 17(2): 243-264.
- [13]Brans, G.; Schoen, C.G.P.H.; Vander Sman, R.G.M; Boom, R.M. (2004) Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *Journal of Membrane Science* .243: 263–272.
- [14]Pandolfi, E. (2008). Aplicación de la tecnología de membranas en el proceso de vinificación., Universidad de Concepción, Santiago.
- [15]Arunima Saxena, Bijay P. Tripathi, Mahendra Kumar, Vinod K. Shahi . (2009) Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins:An overview. *Advances in Colloid and Interface Science* 145, 1–22
- [16]Chen, W., Parma, A., Patkar, A., & Sen, S. (2004). Selecting membrane filtration systems. *Chemical Engineering Progress*, 12:22-25.
- [17]Cheryan , M. (1998). "Ultrafiltration and Microfiltration Handbook". Switzerland: Technomic publication.

- [18]Coca, J., & Luque, S. (1999). Membrane Applications in the Food & Dairy Industry. Universidad de Oviedo: Servicio de Publicaciones.
- [19]Freemantle, M. (2003). Membrane separations. *Chemical & Engineering Progress*, 81:24:33-35.
- [20]Guizard, C. (1999). Cuaderno FIRP S452-B : " Clasificación de las membranas y los procesos que las utilizan". Venezuela.
- [21]Saavedra, A., & Romero, J. (1999). Aspectos generales sobre procesos y tecnologías de membranas (Documento 1). Grupo de procesos de membranas.
- [22]Las técnicas de filtración tangencial y el medio ambiente.
- [23] Tragardh, G. (1989). Membrane cleaning. *Desalination* 71(1):325–335.
- [24] Tswett, M. (1906). Fiziko-khimicheskoe stroenie khlorofil. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 24: 384-393.
- [25] Dong, M.W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley and Sons, New York.
- [26] 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.
- [27] Saúl Alonso, Mónica Herrero, Manuel Rendueles, Mario Dáz, A. (2010). Residual yogurt whey for lactic acid production. *Journal of Biomasa and bioenergy* 34, 931 -938

[28] Saúl Alonso, Manuel Rendueles, Mario D áz, A. (2011). Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH –shift conditions. *Journal of Bioresource Technology*. 102(20), 9730–9736.

[29] Mar á Gonz áles Rivas. Separaci ón y purificaci ón de ácido lactobi ónico.

[30] Centro de Actividad Rgional para Producci ón Limpia, CAR/PA (2002). Prevenci ón en la contaminaci ón de la Industria L áctea. 164.

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

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

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

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