

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Purificación y separación de ácidos láctico y
lactobiónico obtenidos en fermentaciones de
co-cultivos a partir de permeados de
lactosuero”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

Héctor Vicente Valdivielso

JULIO, 2015



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría abrir este apartado dando las gracias a mi director de proyecto, Manuel Rendueles de la Vega, tanto por su apoyo y orientación como por la paciencia mostrada. También tengo a bien manifestar mi agradecimiento a los miembros del departamento y personal de laboratorio, mención especial a Cristina, por su atención e inestimable ayuda, y por su disponibilidad para resolver mis dudas a lo largo de todo el tiempo que duró el proyecto.

No quiero olvidarme tampoco de mis compañeros tanto del Grado como del Máster, especialmente de mis *"Incomprendidos"*. Gracias por estar ahí día a día, por vuestros ánimos y felicitaciones y por los momentos vividos durante este año. Un pedacito de este trabajo os corresponde a vosotros.

Quisiera hacer una pequeña reseña, no menos importante, a mi compañera de aventuras desde hace ya unos años, Verónica; si he llegado hasta aquí ha sido en gran medida gracias a ti.

Y finalmente y con especial énfasis, a mi familia. Por haberme ayudado a alcanzar mis objetivos, por no permitir que me faltasen las ganas, los ánimos ni el apoyo, y por compartir conmigo el sufrimiento y las alegrías que han surgido a lo largo de este camino desde que comencé la aventura universitaria.

A todos ellos, **GRACIAS**.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE GRÁFICAS	III
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.INDUSTRIA LÁCTEA Y GENERACIÓN DE SUBPRODUCTOS	2
1.2.OBJETIVOS.....	6
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS	7
2.1.ÁCIDO LÁCTICO	8
2.2. ÁCIDO LACTOBIÓNICO	10
2.3. FILTRACIÓN POR MEMBRANAS.....	13
2.3.1.Ventajas e inconvenientes en procesos de separación por membranas... 16	
2.3.1.1.Polarización de concentración.....	17
2.3.1.2.Ensuciamiento de la membrana	18
2.3.2.Modos de operación	19
2.3.2.1.Filtración de flujo normal o "Deathendfiltration"	20
2.3.2.2.Filtración de flujo tangencial o "Cross flowfiltration"	20
2.3.3.Módulos de membranas.....	21
2.3.3.1.Hojas planas.....	21
2.3.3.2.Fibras huecas	22
2.3.3.3.Tubulares.....	22
2.3.3.4.En espiral	23
2.4. CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC).....	24
2.4.1.Introducción.....	24
2.4.2.Proceso de la HPLC	25

2.4.3.	Clasificación de la CL	25
2.4.4.	Instrumentación	26
2.4.5.	Mecanismos de separación	30
2.4.5.1.	<i>Cromatografía de adsorción líquido-sólido (CLS)</i>	30
2.4.5.2.	<i>Cromatografía con fases ligadas (CFL)</i>	31
2.4.5.3.	<i>Cromatografía de intercambio iónico (CII)</i>	31
2.4.5.4.	<i>Cromatografía de exclusión molecular (CEM)</i>	31
2.4.6.	Aplicaciones	31
2.4.7.	Ventajas	32
2.5.	INTERCAMBIO IÓNICO	32
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	38
3.1.	SEPARACIÓN POR MEMBRANAS	39
3.1.1.	Disoluciones empleadas	39
3.1.2.	Equipo empleado	40
3.1.3.	Membrana empleada	41
3.1.4.	Procedimiento.....	42
3.2.	ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA....	43
3.2.1.	Equipo empleado	44
3.2.2.	Rectas de calibrado del ácido láctico y el ácido lactobiónico	45
3.3.	INTERCAMBIO IÓNICO	47
3.3.1.	Muestras empleadas	47
3.3.2.	Resinas empleadas.....	47
3.3.3.	Equipo empleado	47
3.3.4.	Acondicionamiento de la resina	48
3.3.5.	Acondicionamiento de la muestra	49
3.3.6.	Lavado de la resina.....	49
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1.	MICROFILTRACIÓN POR MEMBRANAS	51
4.1.1.	Caracterización de la membrana	51
4.1.1.1.	<i>Comportamiento de la membrana con agua</i>	51

4.1.1.2. <i>Comportamiento de la membrana con suero</i>	51
4.1.2. Microfiltración de muestras.....	52
4.1.2.1. <i>Muestra 1</i>	52
4.1.2.2. <i>Muestra 2</i>	53
4.1.2.3. <i>Muestra 3</i>	55
4.1.2.4. <i>Muestra 4</i>	56
4.1.2.5. <i>Muestra 5</i>	57
4.2. INTERCAMBIO IÓNICO	58
4.2.1. Resina aniónica.....	59
4.2.1.1. <i>Mezcla muestras 1, 2, 3 y 4 (pH=5)</i>	59
4.2.1.2. <i>Mezcla muestras 1, 2, 3 y 4 (pH=6)</i>	60
4.2.1.3. <i>Muestra 5 (pH=6)</i>	62
4.2.2. Resina catiónica.....	64
4.2.2.1. <i>Mezcla muestras 1, 2, 3 y 4 (pH=5.6)</i>	64
4.2.2.2. <i>Muestra 5 (pH=5.6)</i>	65
5. CONCLUSIONES	67
6. BIBLIOGRAFÍA	68

RESUMEN

La actividad de la industria láctea viene creciendo progresivamente desde hace varios años. La búsqueda de nuevos productos y la producción en masa de los ya existentes hacen que aumente directamente la cantidad de residuos procedentes de su actividad. Un ejemplo es el suero lácteo, formado, entre otros, por ácido láctico y ácido lactobiónico.

Debido a su alto poder contaminante y, por otro lado, su alto valor industrial, se viene estudiando su aplicabilidad a otros procesos, de manera que las fases de concentración y purificación de los mismos son determinante.

En el presente trabajo, hemos estudiado la separación y purificación conjunta de ambos ácidos partiendo de fermentados de lactosuero. Para ello se sometieron los fermentados a procesos de microfiltración por membranas, con el objetivo de eliminar la biomasa de la muestra, y de intercambio iónico, tanto aniónico, cuya función es concentrar los ácidos en volúmenes de disolución menores, como catiónico, con la misión de eliminar otros iones existentes, de manera que podamos obtener los ácidos lo más purificados posible. Se han estudiado a su vez los rendimientos de los distintos procesos a los que se han llevado a cabo con el fin de tener una idea experimental acerca de la posible aplicabilidad de las técnicas empleadas.

ABSTRACT

The dairy industry has experimented a progressive growth in the last years. Research for new dairy products and the massive production of many of them already in the market have increased the amount of residues in this industry. The main byproduct of the dairy industry is whey. A valorization of whey can be achieved by fermentative processes giving for example organic acids such as lactic or lactobionic acid.

After production the organic acids concentration and purification steps are decisive in order to improve their wide applicability to different products.

In this project it has been studied the separation and purification of both acids, using the products of the fermentation of whey as baseline product. In the process the liquid fermentation product was submitted to a microfiltration process with membranes, with the aim of eliminating the existing biomass in the samples. After that, an ionic exchange separation process, both anionic and cationic, has been carried out to concentrate and purify the organic acids present in the permeates from microfiltration, respectively. Charge and elution ion exchange steps were carried out, to get a clear idea on the applicability of those techniques in an industrial scale.

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Evolución del número de explotaciones y producción media (kg/explotación). Fuente: <i>SIGLAC-FEGA</i>	2
Gráfica 2: Evolución del Comercio Intracomunitario. a) Importación de productos lácteos desde la UE de 2009 a 2012. b) Exportación de productos lácteos a la UE de 2008 a 2012. Fuente: <i>AEAT</i>	3
Gráfica 3: Recta de calibrado del ácido láctico.	45
Gráfica 4: Recta de calibrado del ácido lactobiónico.	46
Gráfica 5: Comportamiento de la membrana de microfiltración al paso de agua (volumen de permeado en ml por minuto). Las diferencias existentes entre ambas gráficas pueden deberse a diferencias en el volumen inicial de agua empleado y por tanto a diferencias en la presión del fluido en el sistema.	51
Gráfica 6: Comportamiento de la membrana de microfiltración al paso de suero.....	52
Gráfica 7: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 1 tras someterla a microfiltración.....	52
Gráfica 8: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 1 durante el proceso de microfiltración.....	53
Gráfica 9: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 2 tras someterla a microfiltración.....	54
Gráfica 10: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 2 durante el proceso de microfiltración.....	54
Gráfica 11: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 3 tras someterla a microfiltración.....	55
Gráfica 12: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 3 durante el proceso de microfiltración.....	56
Gráfica 13: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 4 tras someterla a microfiltración.....	56
Gráfica 14: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 4 durante el proceso de microfiltración.....	57
Gráfica 15: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 5 tras someterla a microfiltración.....	57

Gráfica 16: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 5 durante el proceso de microfiltración.....	58
Gráfica 17: Concentraciones de ácido láctico y lactobiónico (g/L) en la carga de la mezcla de muestras a pH=5 (aniónico).	59
Gráfica 18: Concentraciones de ácido láctico y lactobiónico (g/L) en la elución de la mezcla de muestras a pH=5 (aniónico).	59
Gráfica 19: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la carga de la mezcla de muestras a pH=6 (aniónico).	60
Gráfica 20: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la elución de la mezcla de muestras a pH=6 (aniónico).	61
Gráfica 21: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la carga de muestra 5 a pH=6 (aniónico).....	62
Gráfica 22: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la elución de la muestra 5 a pH=6 (aniónico).	62
Gráfica 23: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la carga de la mezcla de muestras a pH=5.6 (catiónico).....	64
Gráfica 24: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la carga de la muestra 5 a pH=5.6 (catiónico).	65
Gráfica 25: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la elución de la muestra 5 a pH=6 (catiónico).	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Residuos procedentes de la Industria Láctea. Fuente: <i>Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2015</i>	4
Tabla 2: Composición del lactosuero dulce y ácido (g/L). Fuente: <i>Panesar et al, 2007</i> .	5
Tabla 3: Propiedades físicas del ácido láctico.	8
Tabla 4: Aplicaciones del ácido láctico en la industria alimentaria, farmacéutica, química y cosmética.	10
Tabla 5: Propiedades fisicoquímicas del ácido lactobiónico.....	11
Tabla 6: Aplicaciones del ácido lactobiónico en las industrias alimentaria, biosanitaria, química y cosmética.	12
Tabla 7: Principales procesos de separación por membranas.....	14
Tabla 8: Muestras de fermentados empleadas en el trabajo y concentraciones iniciales de ácidos láctico y lactobiónico de las mismas antes de diluir.....	39
Tabla 9: Resultados del intercambio aniónico de la mezcla de muestras a pH=5.....	60
Tabla 10: Resultados del intercambio aniónico de la mezcla de muestras a pH=6.....	61
Tabla 11: Resultados del intercambio aniónico de la muestra 5 a pH=6.	63
Tabla 12: Resultados del intercambio catiónico de la mezcla de muestras a pH=5.6....	64
Tabla 13: Resultados del intercambio catiónico de la muestra 5 a pH=5.6.	66

LISTA DE FIGURAS

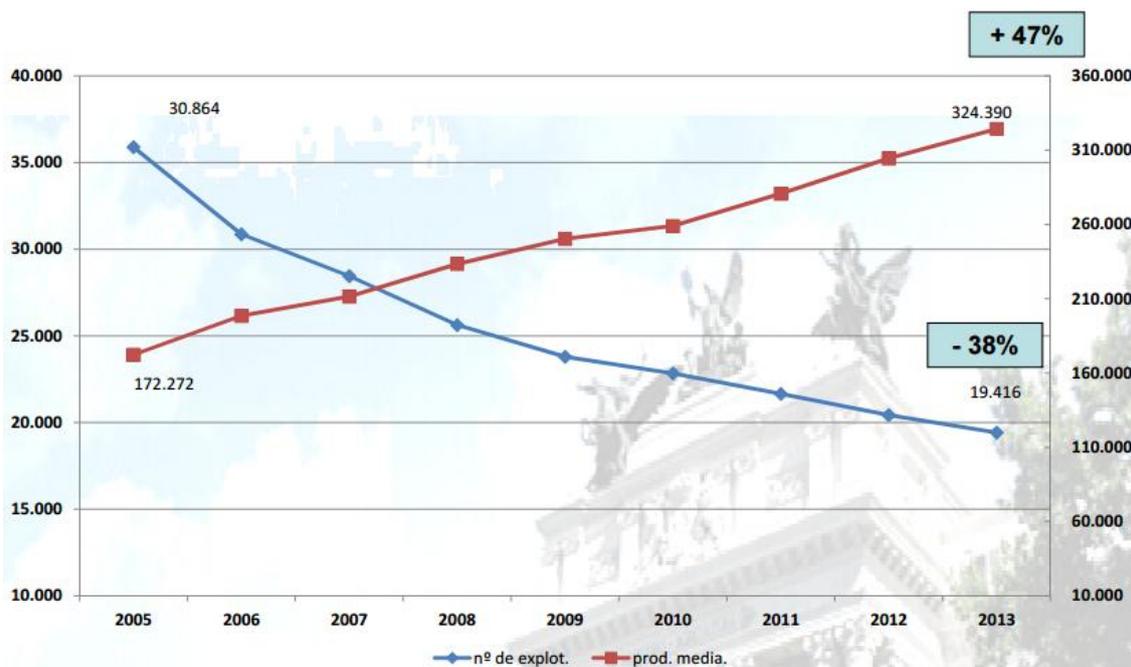
Figura 1: Diagrama de flujo simplificado del proceso de fabricación de queso	5
Figura 2: Enantiómeros L (izquierda) y D (derecha) del ácido láctico, nombre y origen de los mismos.	8
Figura 3: Esquema de la fermentación láctica de la glucosa.	9
Figura 4: Estructura química del ácido lactobiónico.	10
Figura 5: Formación de ácido lactobiónico por la acción de bacterias del género <i>Pseudomonas</i> . FUENTE: <i>S. Alonso et al., 2013</i>	11
Figura 6: Esquema básico del funcionamiento de una membrana.	13
Figura 7: Esquema de los principales procesos de filtración en respuesta a un gradiente de presión.	15
Figura 8: Polarización por concentración con formación de gel.	17
Figura 9: Ensuciamiento de la membrana; bloqueo de poros (a) y adsorción de solutos (b).	19
Figura 10: Dos tipos principales de filtración con membranas. A la izquierda se representa la filtración de flujo normal, y a la derecha la filtración de flujo tangencial.	21
Figura 11: Módulo de hojas planas.	22
Figura 12: Módulo de fibras huecas.	22
Figura 13: Módulo tubular.	23
Figura 14: Configuración del túbulo.	23
Figura 15: Módulo en espiral.	24
Figura 16: Esquema del equipo empleado en HPLC.	26
Figura 17: Resinas de intercambio catiónico (a) y aniónico (b). En naranja se muestra el ión fijo presente en el intercambiador. FUENTE: http://dardel.info/IX/sitemap.html (20/06/2015).	33
Figura 18: Etapas durante la operación con columnas de intercambio iónico.	35
Figura 19: Esquema del equipo de microfiltración empleado.	40
Figura 20: Equipo de membranas. A la izquierda, el tanque de alimentación; a la derecha, el armario eléctrico con los controladores.	41

Figura 21: Equipo de HPLC.....	44
Figura 22: Equipo empleado para el intercambio iónico.....	48

1. INTRODUCCIÓN

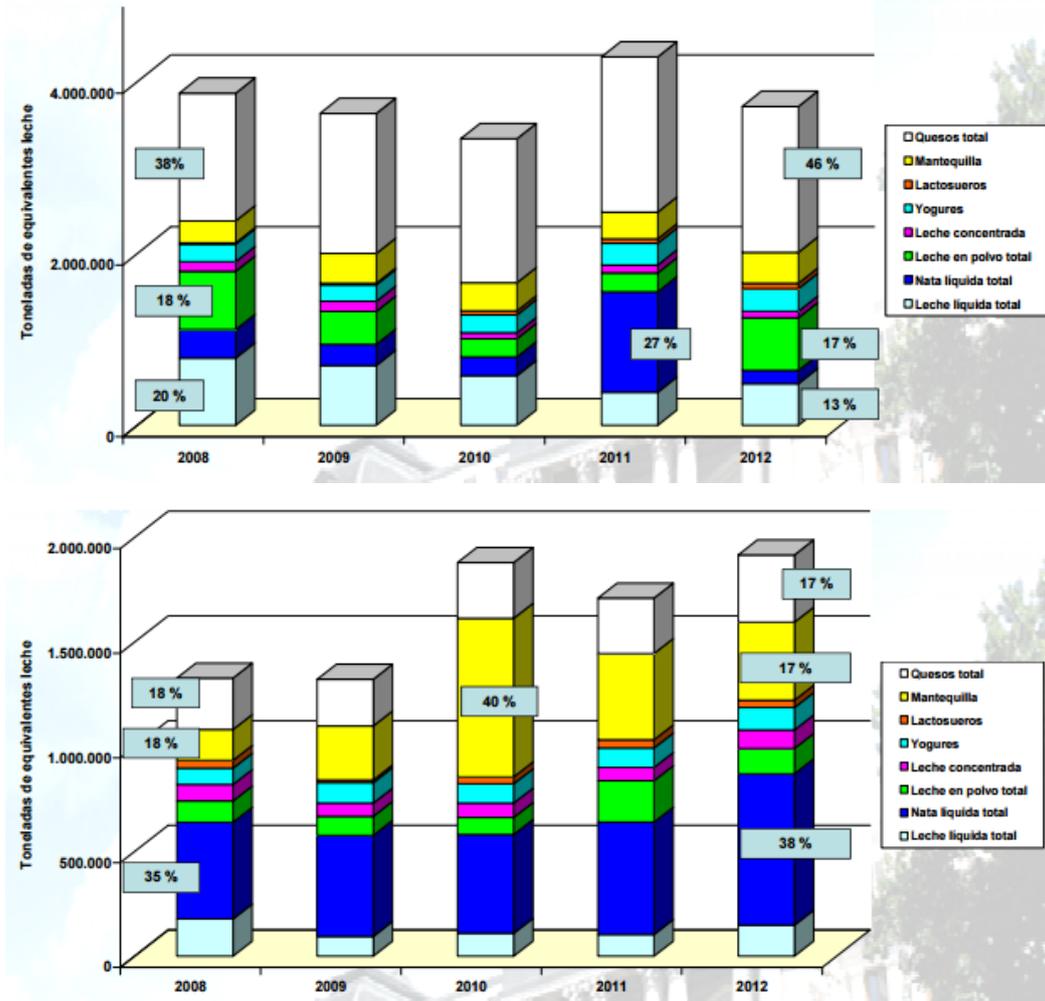
1.1. INDUSTRIA LÁCTEA Y GENERACIÓN DE SUBPRODUCTOS

En los últimos tiempos la industria láctea ha protagonizado un intenso crecimiento como consecuencia de mejoras en los procesos de obtención de leche y en el sistema productivo, que han derivado en la constante salida de nuevos productos al mercado para adaptarse a un modelo de cliente cada vez más exigente. Dicho crecimiento en la producción lechera no se debe a un aumento de las explotaciones, ya que como podemos ver en la gráfica 1, el número de éstas se ha reducido drásticamente en España en los últimos 10 años, sino más bien en las mencionadas mejoras a nivel productivo e innovaciones a nivel técnico, permitiendo un aumento sustancial de la producción.



Gráfica 1: Evolución del número de explotaciones y producción media (kg/explotación). Fuente: SIGLAC-FEGA.

En este contexto, España se mueve en un mercado fundamentalmente de importación (gráficas 2a y 2b), como podemos observar en los datos recogidos por la Agencia Española de Aduanas e Impuestos Especiales (AEAT). Por otro lado, en el mercado lácteo van ganando cierta relevancia productos que hace unos años eran tratados como simples residuos del proceso productivo de otros productos finales, como es el caso del lactosuero.



Gráfica 2: Evolución del Comercio Intracomunitario. a) Importación de productos lácteos desde la UE de 2009 a 2012. b) Exportación de productos lácteos a la UE de 2008 a 2012. Fuente: AEAT.

El desarrollo tanto económico como industrial de este sector lleva ligado un inherente aumento en la producción de residuos orgánicos procedentes de los procesos de fabricación (tabla 1). Estos residuos eran hace años vertidos al medio ambiente, causando graves daños en muchos de los casos, de manera que se estableció una legislación por la cual dichos residuos debían ser tratados previamente con el objetivo de minimizar esos daños. Se implementaron por tanto en las industrias lecheras protocolos destinados a tratamientos de los residuos, resultando estos muy caros para la economía de las empresas. En ocasiones, se destinaban incluso a productos de alimentación animal o eran empleados como fertilizantes.

Tabla 1: Residuos procedentes de la Industria Láctea. Fuente: *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2015.*

Grupo	Residuo	Lugar de generación	Destinos más habituales
Residuos orgánicos	Producto no conforme, lactosuero, mazada, restos de producción.	Proceso productivo	Alimentación animal, aprovechamiento de subproductos.
Envases y embalajes	Vacios	Film retráctil, palets de madera, sacos de papel kraft. Envases de plástico, vidrio, cartón, papel.	Recepción, expedición
	Llenos	Envases de plástico, vidrio, cartón, papel.	Envasado Almacenamiento Devoluciones
Asimilables a los domésticos	Papel, desechables oficina, basura doméstica	Oficinas, comedor, baños, etc.	Depósito en vertedero o separación de envase-producto y gestión por separado.
Residuos peligrosos	Aceites usados, baterías, envases de productos peligrosos.	Laboratorio Almacén Taller Áreas de limpieza	Transporte, tratamiento y eliminación o depósito en vertedero de peligrosos.
Residuos no peligrosos/otros	Lodos depuración, grasas	Sistema tratamiento aguas residuales	Compostaje, aplicación como abono orgánico.

Con el tiempo y debido a las nuevas tendencias sostenibles, las industrias han ido concienciándose en términos como la recuperación, el reciclaje y la adición de valor de dichos residuos. El tratamiento de residuos industriales, aplicado a cualquier sector, es una actividad costosa tanto a nivel económico como ambiental, pero de necesario cumplimiento para la empresa. En este punto es donde surge el interés por minimizar dichos costes, con el fin de sacar el máximo rendimiento posible no solo al proceso en sí, sino a los subproductos derivados del éste.



Esta búsqueda de valor añadido es el motivo de la realización de este proyecto. Como hemos visto, el lactosuero es un residuo orgánico, que procede de la fabricación de productos lácteos fermentados, tales como la mantequilla o los quesos (figura 1).

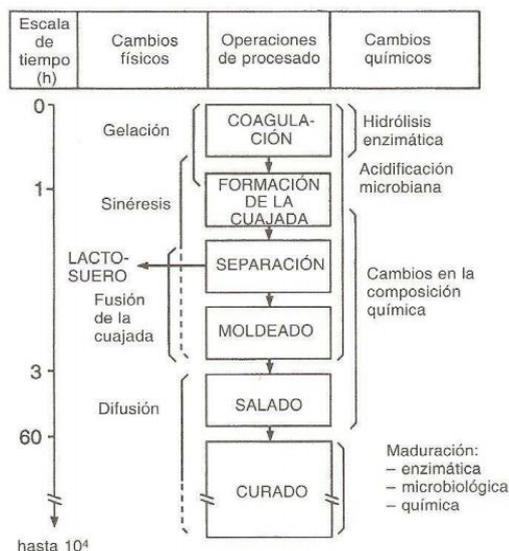


Figura 1: Diagrama de flujo simplificado del proceso de fabricación de queso

Este lactosuero está formado a su vez por distintos componentes, algunos de mayor valor que otros dadas sus propiedades nutricionales, así como su posible aplicabilidad a otros procesos productivos. La composición estándar del suero de la leche sufre ligeras variaciones, según el método de eliminación de la caseína. Así pues, tenemos dos tipos de suero (tabla 2):

- **Lactosuero dulce:** se basa en la coagulación por la renina a pH 6,5.
- **Lactosuero ácido:** resultante del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o minerales para coagular la caseína, como es el caso de los quesos frescos.

Tabla 2: Composición del lactosuero dulce y ácido (g/L). Fuente: Panesar et al, 2007

COMPONENTE	LACTOSUERO DULCE g/L	LACTOSUERO ÁCIDO g/L
Sólidos Totales	63 - 70	63 - 70
Lactosa	46 - 52	44 - 46
Proteína	6 - 10	6 - 8
Grasa	0.5 - 7	0.4 - 0.6
Calcio	0.4 - 0.6	1.2 - 1.6
Fosfatos	1 - 3	2 - 4.5
Lactatos	2	6.4
Cloruros	1.1	1.1
pH	5.6 - 6.1	4.3 - 4.7

1.2. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos a la hora de realizar este proyecto son lograr un alto grado de aislamiento y de purificación de los ácidos láctico y lactobiónico de varios cultivos de suero, empleando para ello técnicas de separación mecánica por membranas (microfiltración) y químicas (intercambio iónico).

Durante la realización de las mismas, se fueron planteando una serie de objetivos particulares surgidos de la aplicación de cada uno de los procesos, tales como:

- Caracterización de la membrana de microfiltración, analizando las presiones de entrada y salida de la membrana (presión transmembranar) y el caudal de permeado obtenido a lo largo del tiempo, así como la composición tanto en ácido láctico como en ácido lactobiónico del mismo.
- Obtener y caracterizar tanto los permeados como los concentrados de microfiltración para determinar si la eliminación de la biomasa en el concentrado comporta una pérdida de los ácidos en los permeados.
- Estudiar el comportamiento de cada uno de los ácidos en procesos de separación y concentración por intercambio iónico a distintos pH, buscando una mejor retención de los ácidos en la columna.
- Estudio del comportamiento de resinas tanto aniónicas como catiónicas, con el fin de optimizar la separación de los componentes y concentrarlos en la medida de lo posible.
- Lleva a cabo la elución de las resinas de forma que se recupere en la mayor concentración posible cada uno de los ácidos, bien juntos o de forma diferenciada.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1. ÁCIDO LÁCTICO

Se trata del hidroxiaácido más sencillo que existe. Fue descubierto en el año 1780 por un químico sueco, Carl Wilhelm Scheele, que lo aisló de muestras de leche agria. Más tarde, en 1847, el profesor de química francés Blondeau fue quien lo identificó como producto de un proceso fermentativo. Ya en el año 1881, sería Littleton quien iniciaría la fermentación a escala industrial.

El ácido láctico, o también conocido oficialmente como ácido 2-hidroxi-propanoico, posee dos isómeros ópticos: el D (-) láctico y el L (+) láctico, además de una forma racémica formada por fracciones equimolares de ambos. La configuración metabolizada por el organismo humano es la L (+).

La fórmula química del ácido láctico es $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), y su estructura es la representada en la figura 2:

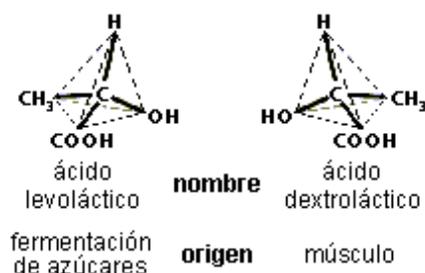


Figura 2: Enantiómeros L (izquierda) y D (derecha) del ácido láctico, nombre y origen de los mismos.

El ácido láctico presenta una serie de propiedades físicas características, que son las recogidas en la siguiente tabla 3:

Tabla 3: Propiedades físicas del ácido láctico.

Peso molecular	90.08
Punto de ebullición	125 °C
Punto de fusión	52-54 °C
Solubilidad	10 mg/ml
PKa	3.87 (25 °C)
Estado físico	Líquido

El ácido láctico, como hemos mencionado previamente, se puede obtener mediante la fermentación de azúcares, en concreto de la lactosa, que es un disacárido formado por la unión de una molécula de glucosa y otra de galactosa. La reacción se lleva a cabo por bacterias ácido-lácticas.

En primer lugar, la molécula de lactosa es hidrolizada, resultando en una molécula de galactosa y otra molécula de glucosa. La galactosa, para poder entrar en el proceso de la glucolisis, debe entrar en forma de glucosa, por lo que la enzima galactosa isomerasa va a catalizar esta transformación. A continuación, se lleva a cabo la glucolisis de las moléculas de glucosa, dando cada una de ellas dos moléculas de piruvato, que van a ser las que sufran el proceso fermentativo, por el cual, en presencia de NADH y protones (H^+), van a dar lugar a dos moléculas de ácido láctico o lactato (figura 3).

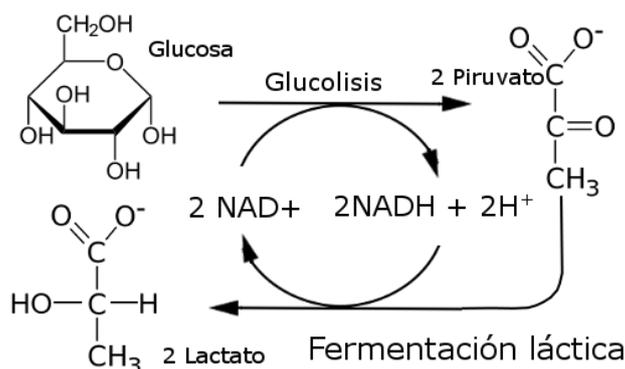


Figura 3: Esquema de la fermentación láctica de la glucosa.

El ácido láctico es un compuesto de fácil obtención y económicamente barato, por lo que, a lo largo del tiempo, conforme las industrias han ido avanzando y desarrollando nuevos productos, ha ido incorporándose a campos distintos del alimentario. De esta forma, se han desarrollado aplicaciones del ácido láctico en industrias como la farmacéutica, la industria química y más recientemente y aún en proceso de expansión, en la industria cosmética, dadas sus propiedades hidratantes y reguladoras del pH. Las distintas aplicabilidades en cada sector industrial están recogidas en la siguiente tabla 4:

Tabla 4: Aplicaciones del ácido láctico en la industria alimentaria, farmacéutica, química y cosmética.

INDUSTRIA ALIMENTARIA	INDUSTRIA FARMACÉUTICA	INDUSTRIA QUÍMICA	INDUSTRIA COSMÉTICA
Conservante	Soluciones de diálisis	Solvente	Agente humectante
Acidulante	Preparaciones minerales	Polímeros biodegradables	Lociones hidratantes
Estabilizador de pH	Suturas médicas	Síntesis de otras moléculas	Soluciones anti-acné
Aromatizante	Prótesis	Neutralizante	Agente rejuvenecedor
Fortificantes minerales	Liberación controlada de fármacos	Agente quelante	Control de pH de la piel
Emulsionante	Tabletas		

2.2. ÁCIDO LACTOBIÓNICO

Se trata de un ácido orgánico carboxílico con 8 grupos hidroxilo (polihidroxiácido), englobado en el grupo de los ácidos aldobiónicos. La estructura del ácido lactobiónico la conforman una molécula de galactosa unida a otra de ácido glucónico mediante un enlace de tipo éster (figura 4).

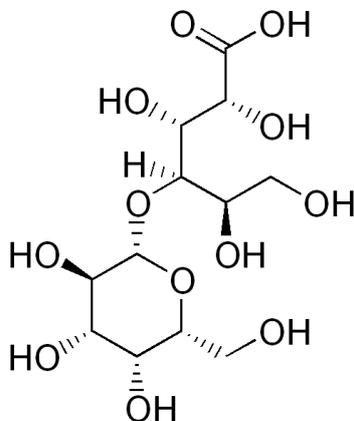


Figura 4: Estructura química del ácido lactobiónico.

La formación del ácido lactobiónico está basada en una reacción de oxidación que va a afectar al grupo aldehído de la lactosa, generando un grupo carboxilo. Éste se puede sintetizar enzimáticamente o mediante el uso de bacterias.

El ácido lactobiónico empleado durante el desarrollo de nuestro proyecto procede de la bioconversión de la lactosa del suero por bacterias del género *Pseudomonas*, que la llevan a cabo mediante una deshidrogenasa de membrana que cataliza la oxidación de dicha lactosa, y la posterior hidrólisis de la lactobiono- δ -lactona que va a dar lugar al ácido lactobiónico (figura5).

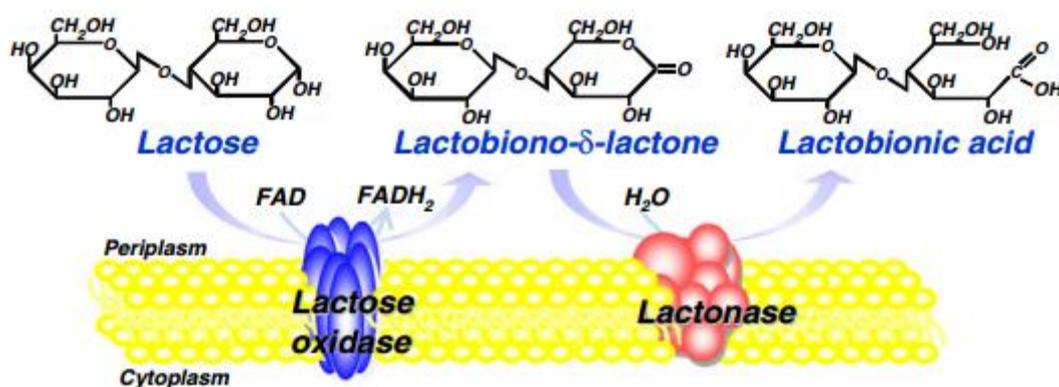


Figura 5: Formación de ácido lactobiónico por la acción de bacterias del género *Pseudomonas*. FUENTE: S. Alonso et al., 2013.

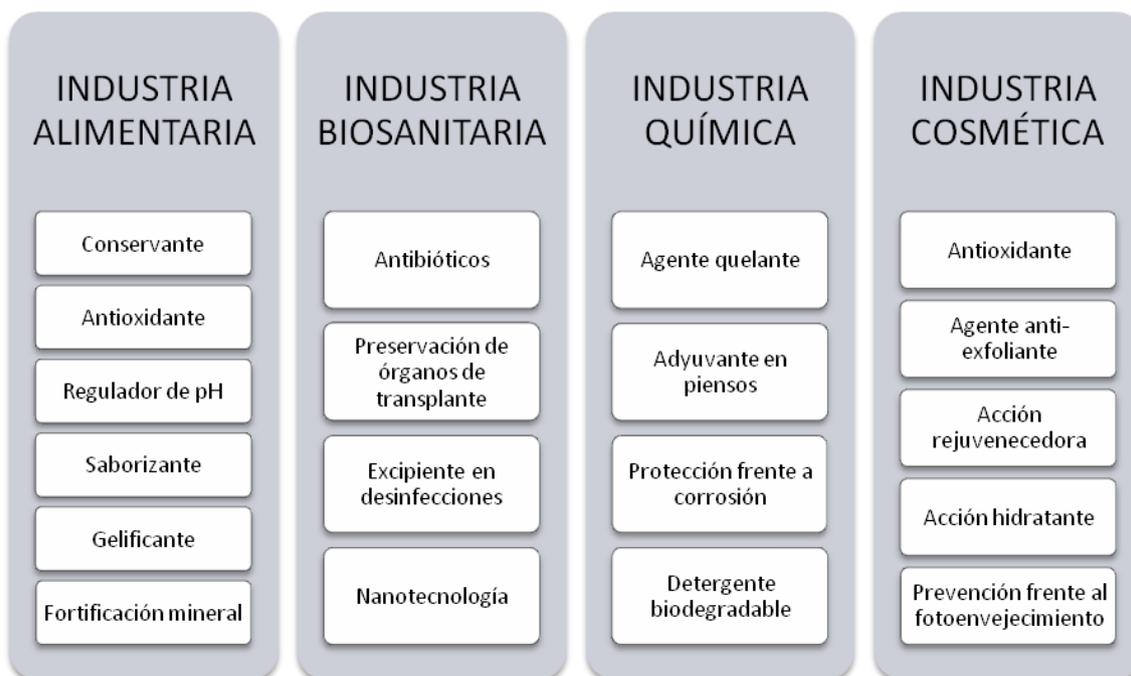
Las propiedades fisicoquímicas del ácido lactobiónico son ligeramente distintas de las del ácido láctico, lo cual hace que el trabajo de separación y purificación de ambos ácidos en conjunto sea relativamente complejo. Dichas propiedades se presentan en la siguiente tabla 5:

Tabla 5: Propiedades fisicoquímicas del ácido lactobiónico.

Peso molecular	358.3
Punto de fusión	128-130 °C
Solubilidad	0.1 g/ml
PKa	3.6 (25 °C)
Estado físico	Sólido

El ácido lactobiónico reviste gran importancia en la industria alimentaria, concretamente en la industria láctea, ya que es un subproducto de fabricación de gran valor dada su gran aplicabilidad a otros campos, por lo que se han dedicado grandes esfuerzos a conseguir y mejorar la obtención purificada de este compuesto. Actualmente se aplica en varios campos tales como la ya mencionada industria alimentaria, donde desempeña una amplia variedad de funciones, tales como conservante, agente antioxidante de los alimentos, saborizante,...; en el campo biosanitario para el desarrollo de antibióticos, la preservación de órganos para trasplantes y más recientemente se va incorporando al campo de la nanotecnología para la liberación controlada de fármacos. También tiene empleos tanto en la industria química como en la cosmética, siendo esta última tal vez la más conocida (tabla 6).

Tabla 6: Aplicaciones del ácido lactobiónico en las industrias alimentaria, biosanitaria, química y cosmética.



2.3. FILTRACIÓN POR MEMBRANAS

La filtración se define como la separación de dos o más componentes de un fluido basada principalmente en el tamaño de las partículas (Cheryan M., 1998). Comúnmente se denomina así al proceso de separación de partículas sólidas inmiscibles de los líquidos o gases que las contienen, pero la filtración por membranas extiende el término a separaciones de solutos disueltos en líquidos y a separaciones de gases.

En la actualidad la filtración por membranas se emplea en gran escala para fines muy variados, tales como la potabilización de agua de mar, el tratamiento de efluentes industriales, el fraccionamiento de disoluciones de macromoléculas en las industrias alimentaria y farmacéutica,...

Estos procesos tienen algunos aspectos comunes que les proporcionan gran interés como elementos de separación, pese a ser muy diferentes en cuanto al modo de operar (Figura6).

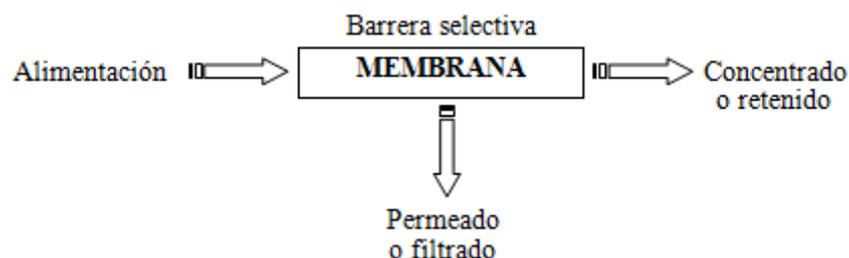


Figura 6: Esquema básico del funcionamiento de una membrana.

Las membranas actúan como barreras selectivas, permitiendo el paso de determinadas moléculas y reteniendo el resto de componentes de la mezcla. Consiguientemente, tanto el permeado como el retenido estarán enriquecidos en determinados componentes una vez finalizado el proceso. Las membranas pueden clasificarse según distintos criterios:

- Naturaleza de la membrana
- Estructura de la membrana
- Aplicación de la membrana
- Mecanismo de acción

A continuación (tabla 7) se muestra un esquema de los principales procesos de separación por membranas con las características principales de cada uno.

Tabla 7: Principales procesos de separación por membranas.

PROCESO	FUERZA IMPULSORA	PERMEADO	RETENIDO
Ósmosis	Gradiente químico	Agua	Solutos, agua
Diálisis	Gradiente de concentración	Moléculas pequeñas, agua	Moléculas grandes, agua
Microfiltración	Presión	Solutos disueltos, agua	Partículas suspendidas, agua
Ultrafiltración	Presión	Moléculas pequeñas, agua	Moléculas grandes, agua
Nanofiltración	Presión	Iones monovalentes, ácidos no disociados, agua	Moléculas pequeñas, sales divalentes, ácidos disociados, agua
Ósmosis inversa	Presión	Agua	Solutos, agua
Electrodialisis	Voltaje, corriente	Solutos ionizados, agua	Solutos no iónicos, agua
Pervaporación	Presión	Moléculas pequeñas volátiles, agua	Moléculas no volátiles, agua

Nosotros nos vamos a centrar fundamentalmente en los procesos de filtrado que emplean un gradiente de presión como fuerza impulsora para la separación. Todos ellos son variantes de un proceso común, residiendo la diferencia entre ellos en el tamaño de

las partículas que atraviesan la membrana. Así pues, la clasificación es la siguiente (figura7):

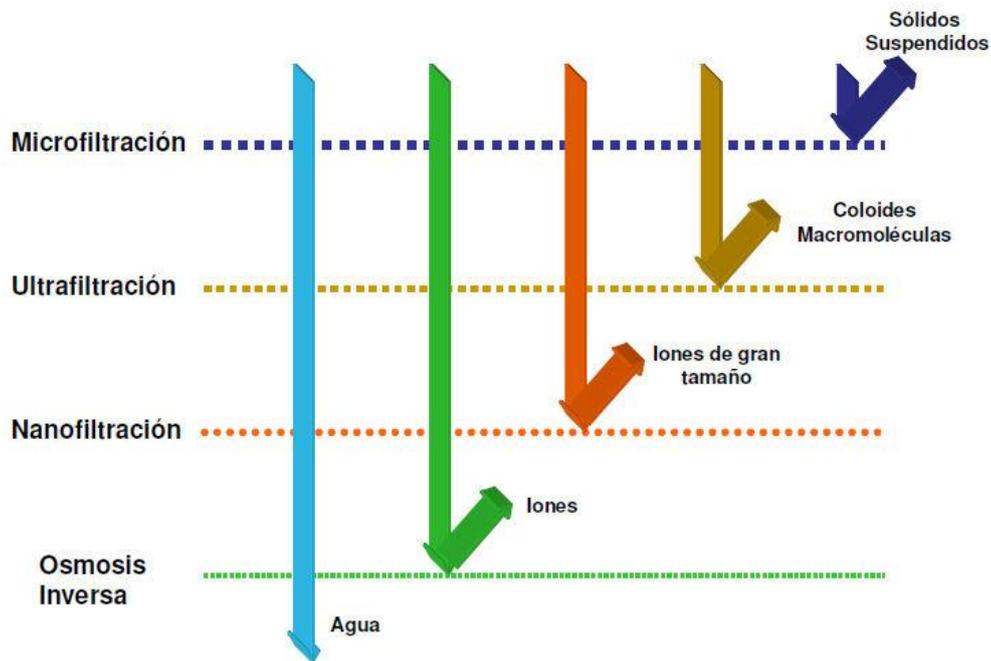


Figura 7: Esquema de los principales procesos de filtración en respuesta a un gradiente de presión.

- **Microfiltración**

Es un proceso de filtración que responde a un gradiente de presión, en el cual las partículas se mueven a través de la membrana en función de su tamaño y forma. El tamaño del poro en las membranas de microfiltración suele comprenderse entre 0.05 y 10 μm , y la presión transmembrana a la cual se realiza la operación (ΔP) está en el rango de 0.5 a 3 bar.

- **Ultrafiltración**

Similar a la microfiltración, pero aplicado a moléculas más pequeñas, como pueden ser sales o compuestos orgánicos de bajo peso molecular. El tamaño del poro en este caso varía entre los 0.1 y los 0.001 μm , y el diferencial de presión está entre 1 y 10 bar.

- **Nanofiltración**

El fundamento es el mismo que en las anteriores, y se emplea, al igual que la ultrafiltración, para la separación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, así como de iones multivalentes. Opera con un tamaño de poro que va desde los 0.005 a los 0.0005 μm , y una presión transmembrana de entre 5 y 30 bar.

- **Ósmosis inversa**

Es utilizada para la separación de sales monovalentes y ácidos no disociados. Se usan membranas con tamaños de poro inferiores a 0.0005 μm y presiones transmembranares más altas (10-50 bar).

2.3.1. Ventajas e inconvenientes en procesos de separación por membranas

Los procesos de separación por medio de membranas han experimentado un importante desarrollo en los últimos tiempos. Este desarrollo ha contribuido a que los procesos de separación por membranas presenten una serie de ventajas con respecto a otros procesos empleados en separaciones:

- Menor coste
- Procesos continuos
- Alta selectividad
- Baja generación de subproductos indeseables
- Consumo energético bajo
- Simplicidad de equipos
- Permiten operar bajo condiciones suaves, incluso a temperatura ambiente
- El paso de escala es sencillo
- Las propiedades de las membranas son variables ajustables (separaciones específicas)
- Se pueden combinar con facilidad con otros procesos de separación

Por otra parte, también presentan una serie de inconvenientes que les confieren ciertas limitaciones a la hora de ser aplicados:

- No eliminan completamente el agua
- Están limitados por las características del concentrado (límites de concentración)
- **Polarización de concentración**
- **Ensuciamiento de la membrana**
- Presentan cierta limitación en las condiciones de operación
- La vida media de las membranas es reducida
- Presentan baja selectividad o densidad de flujo del permeado
- El factor de escala es más o menos lineal (es más económico producir a gran escala por unidad de producto)

De los inconvenientes mencionados anteriormente, son la polarización de la concentración y el ensuciamiento de la membrana los más frecuentes cuando operamos con ellas, por lo que son necesarias ciertas estrategias que permitan minimizar su efecto.

2.3.1.1. Polarización de concentración

Se trata de un fenómeno reversible, es decir, que no modifica la membrana, y que no necesariamente se da en estos procesos. La polarización se basa en la acumulación de solutos sobre la superficie de la membrana, de manera que se genera un gradiente de concentración que se contrarresta parcialmente por la difusión, formándose perfiles de concentración en la interfase membrana-disolución (figura 8).

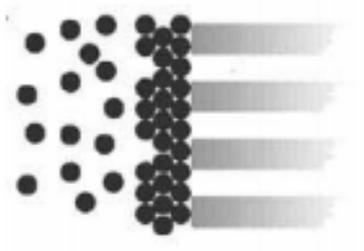


Figura 8: Polarización por concentración con formación de gel.

Esta concentración de solutos puede aumentar hasta llegar al valor límite, y que se corresponde con la concentración a la cual el soluto pasa a la forma gel, de manera que las moléculas quedan parcialmente inmovilizadas, dificultando el paso a través de la membrana. Llegados a este punto, el aumento de presión en el sistema, lejos de favorecer el paso de materia, lo que hará será aumentar el espesor de la capa de gel.

Como hemos comentado, se trata de un fenómeno reversible, que puede ser controlado siguiendo una serie de estrategias:

- **Modificando** las propiedades de la membrana.
- **Pretratando** la alimentación, para eliminar sólidos en suspensión.
- **Optimizando** las condiciones de operación, generalmente aumentando la temperatura, de manera que disminuya la viscosidad, aumentando el coeficiente de difusión y disminuyendo la pérdida de carga a través del módulo.

2.3.1.2. Ensuciamiento de la membrana

Se trata de un fenómeno irreversible, es decir, modifica las propiedades de la membrana, aumentando su resistencia al paso del fluido y disminuyendo la densidad de flujo del permeado. El ensuciamiento de la membrana puede responder a varias causas (figura 9):

1. Bloqueo de los poros total o parcialmente
2. Adsorción de solutos a la superficie de la membrana
3. Interacción entre el soluto y la membrana
4. Precipitación y depósito de partículas sobre la superficie de la membrana

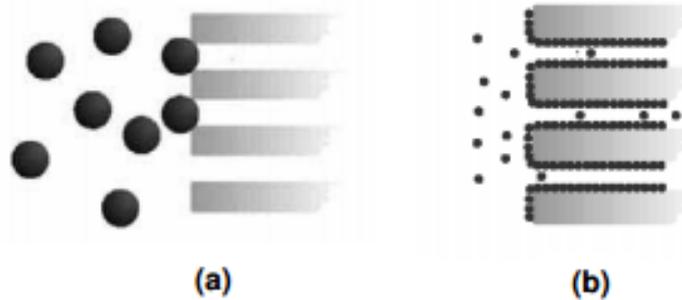


Figura 9: Ensuciamiento de la membrana; bloqueo de poros (a) y adsorción de solutos (b).

La manera de lidiar con el fenómeno del ensuciamiento es mediante una limpieza de la membrana, eliminando los solutos y partículas retenidas en la misma y que no forman parte de ésta. La finalidad de la limpieza es la recuperación de al menos el 95% de la densidad de flujo inicial. Existen 3 tipos de limpieza:

- **Limpieza física:** el más importante es el retrolavado, en el cual se envía permeado (backflushing) o aire a presión (backpulsing) a una presión concreta y en un periodo de tiempo corto, en sentido opuesto al que sigue el flujo normal.
- **Limpieza química:** el lavado se lleva a cabo con productos químicos (ácidos, bases, detergentes, tensioactivos,...).
- **Limpieza biológica:** se lleva a cabo empleando determinadas enzimas que actúan como agentes de limpieza.

2.3.2. Modos de operación

A la hora de trabajar con equipos de filtración, estos pueden operar de manera distinta, según la dirección que siga el flujo de la alimentación respecto al medio filtrante. En los procesos de filtración por membranas que emplean la presión como fuerza impulsora, se consideran dos modos de operación: "*filtración de flujo normal*" y "*filtración tangencial*" (figura 10).

2.3.2.1. Filtración de flujo normal o "Deathendfiltration"

En este modo de operación, el fluido atraviesa de manera transversal el medio filtrante bajo la aplicación de una determinada presión. Aquellas partículas de un tamaño superior al del poro van a quedar retenidas en la superficie o en el interior del medio filtrante, provocando el ensuciamiento del mismo. El resto, por contra, sí que va a ser capaz de atravesar la barrera. Se trata de un método que se aplica a procesos de clarificaciones, prefiltraciones y filtraciones estériles.

2.3.2.2. Filtración de flujo tangencial o "Cross flowfiltration"

En el caso de la filtración tangencial, la diferencia de presión obliga a que una parte del flujo de la alimentación cruce la membrana hacia el lado del permeado, mientras que el resto fluye de manera tangencial al medio filtrante (en nuestro caso la membrana) por toda la superficie, llevando a cabo un barrido de aquellas partículas que se depositan y reincorporándolas a la alimentación.

De la misma forma que en la filtración de flujo normal, las partículas que son demasiado grandes para atravesar el medio filtrante quedan retenidas. Sin embargo, no se depositan en la superficie de la membrana, sino que son barridas por el flujo tangencial, siendo arrastradas.

Esta propiedad le confiere a la filtración de flujo tangencial una gran ventaja a la hora de realizar separaciones de partículas y moléculas de pequeño tamaño, siendo por ello la técnica ideal para separaciones de proteínas y otros componentes de determinados fluidos, así como para la preparación de buffers de sales.

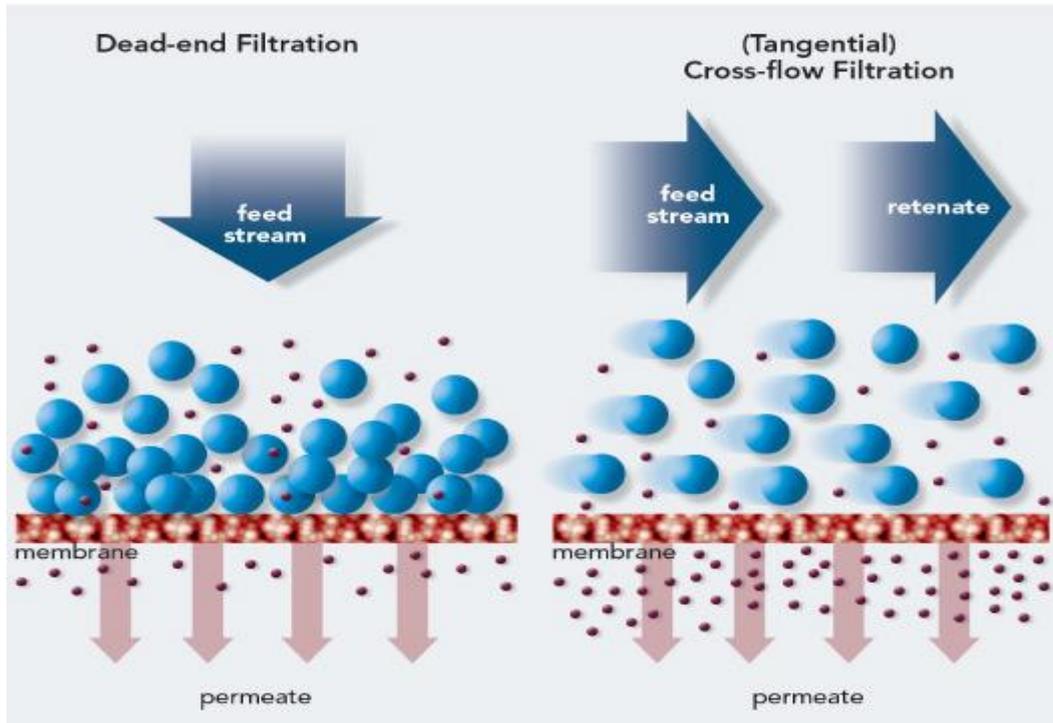


Figura 10: Dos tipos principales de filtración con membranas. A la izquierda se representa la filtración de flujo normal, y a la derecha la filtración de flujo tangencial.

2.3.3. Módulos de membranas

Cuando hablamos de módulos de membranas hablamos de 4 tipos: hojas planas, fibras huecas, tubulares y en espiral.

2.3.3.1. Hojas planas

El inconveniente principal de este tipo de módulo es que el recambio de las membranas suele ser complicado, y presenta problemas de fugas con frecuencia. La configuración de estos módulos es similar a las membranas planas empleadas en los laboratorios. Se colocan parejas de membranas de forma intercalada, con las caras de la alimentación encaradas entre sí. En cada compartimento entre membranas se sitúa un espaciador (figura 11).

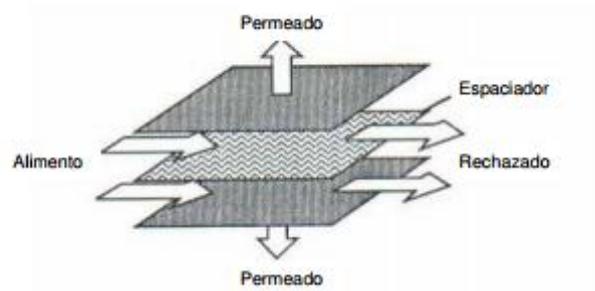


Figura 11: Módulo de hojas planas.

2.3.3.2. Fibras huecas

Este tipo de módulos están formados por tubos capilares muy finos que forman un haz dentro de un contenedor, mientras que sus extremos se insertan en un bloque de resina epoxi. El agua debe por tanto pasar obligatoriamente por la pared del capilar. Para eliminar la capa de ensuciamiento se puede invertir el sentido del flujo a en la columna (figura 12).

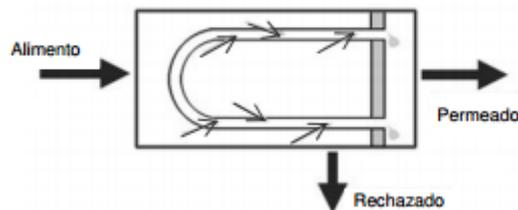


Figura 12: Módulo de fibras huecas.

2.3.3.3. Tubulares

Consisten en largos tubos porosos que llevan la membrana en el interior. No necesita una prefiltración del fluido de la alimentación y es más fácil de limpiar que las anteriores, además de posibilitar el trabajo con fluidos viscosos. Por contra, la superficie de membrana es pequeña, aumentando así los costes de instalación (figura 13).

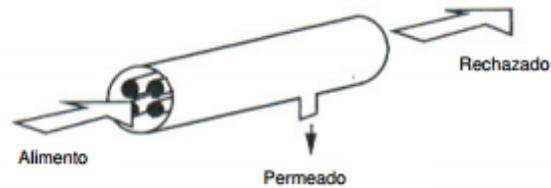


Figura 13: Módulo tubular.

Este tipo de módulos no tiene un soporte propio, de manera que las membranas están dentro de un tubo poroso que puede ser de varios materiales (acero inoxidable, cerámico, plástico,...), y el número de tubos contenidos en el módulo varía entre los 4 y los 18. Este tipo de módulo es el que se emplea con las membranas cerámicas fundamentalmente (figura 14).

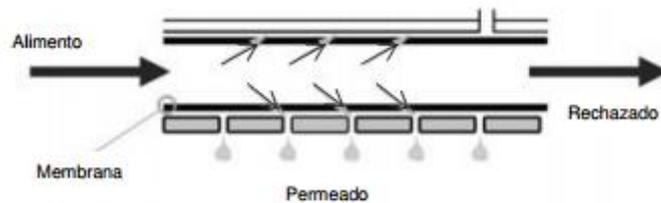


Figura 14: Configuración del túbulo.

2.3.3.4. *En espiral*

Presenta un gran área de membrana a la corriente de alimentación, permitiendo mayores flujos de permeado. Presenta espaciadores entre las membranas, de manera que promueven el flujo de rechazo turbulento, para así disminuir el ensuciamiento y aumentar su vida media.

Consiste en varios pares de membranas planas que se enrollan sobre un tubo colector del permeado (figura 15). La misión del espaciador presente entre los pares de membranas es la de provocar el régimen turbulento.

En estos módulos, el permeado fluye de forma radial hacia el tubo colector central, mientras que el flujo de la alimentación fluye de forma axial por el módulo cilíndrico, paralelamente al tubo colector central.

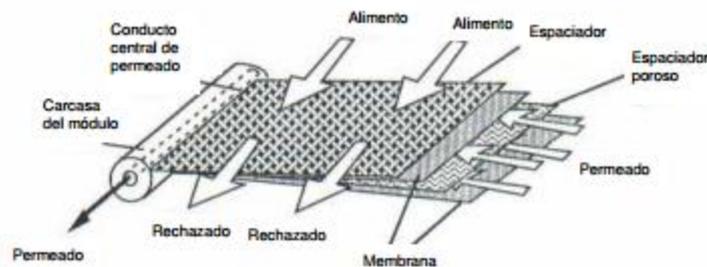


Figura 15: Módulo en espiral.

2.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

2.4.1. Introducción

La cromatografía líquida de alta eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna usada habitualmente en química y bioquímica analítica. En 1906, el botánico ruso Tswett llevó a cabo, a través de métodos cromatográficos, las primeras separaciones de pigmentos coloreados de hojas de plantas con resultados positivos. No obstante, no fue hasta 1931 cuando se consiguió el desarrollo total de estas técnicas de mano de Kuhn y Lederer. En los años 50 se produjo un descenso en el uso de la cromatografía líquida (CL) debido al desarrollo de la cromatografía de gases (CG) por Martin y James; sin embargo, ésta presentaba muchas limitaciones, hecho que produjo una reconsideración de la CL en los años 60.

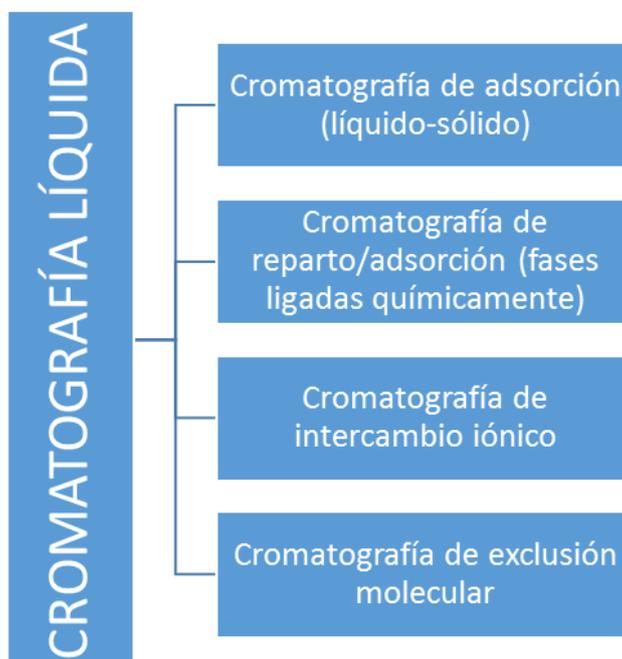
La experiencia obtenida de ambos sistemas, junto con el desarrollo de sistemas de inyección, dieron lugar a la técnica moderna de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

2.4.2. Proceso de la HPLC

La cromatografía líquida de alta eficacia se engloba dentro de la cromatografía de elución, en la que un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria). Si se introduce una mezcla de sustancias (analitos) a la fase móvil, cada una de ellas avanzará dentro del sistema con diferente velocidad dependiendo de la afinidad que posea con cada fase. Así, una vez finalizado el recorrido a través de la columna, cada sustancia introducida en el sistema eluirá con diferente tiempo, separándose.

2.4.3. Clasificación de la CL

La principal forma de clasificación se basa en la naturaleza de la fase estacionaria, ya que de ésta depende principalmente el mecanismo de separación. Así, pueden distinguirse cuatro tipos de técnicas:



2.4.4. Instrumentación

A pesar de que con ambas fases y la columna podría desarrollarse la CL, el uso de la cromatografía de líquidos de alta eficacia moderna requiere el empleo de una serie de dispositivos que conformarían el cromatógrafo (ya que las partículas que se utilizan en la fase estacionaria poseen un diámetro muy pequeño); éstos serían: el dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyente), el dispositivo de inyección, conducción y conexiones, el detector y el registrador y la columna (figura 16).

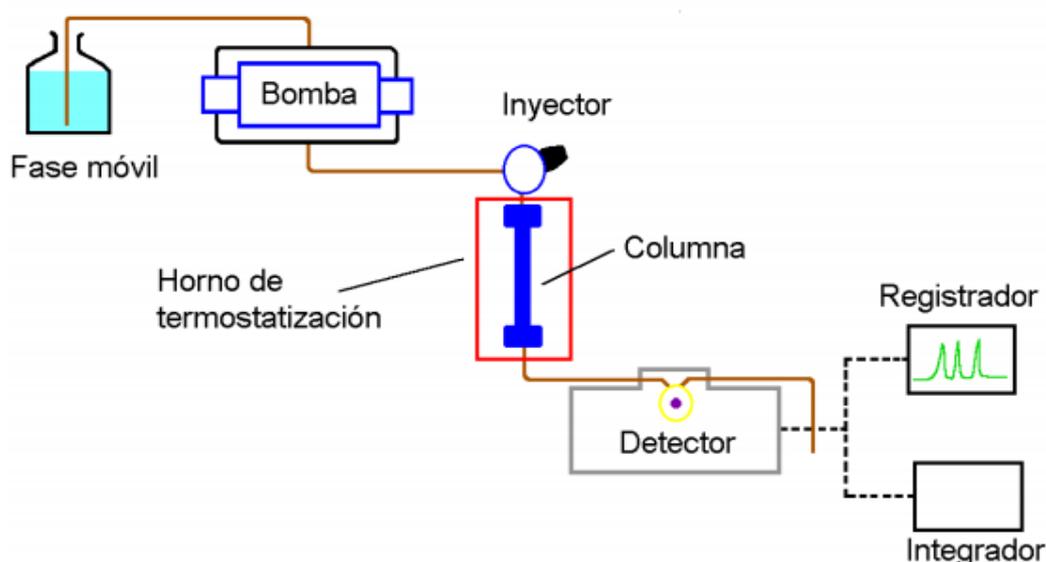


Figura 16: Esquema del equipo empleado en HPLC.

Además, se le pueden incluir otros sistemas que permiten mejorar la técnica, como son inyectores automáticos, colectores de fracciones, hornos termostatazados para las columnas y sistemas de tratamiento de datos.

- Sistema de suministro de fase móvil

La encargada del suministro de un caudal constante de la fase móvil a través de la columna es la bomba. Las más empleadas son las de tipo alternante que suministran un flujo pulsado de la fase móvil que es necesario eliminar mediante un sistema de amortiguación que permita el paso de un caudal constante a través de la columna. Esto se consigue mediante la colocación de un recipiente cerrado a la salida de la bomba.

- Sistema de mezcla de fase móvil

Hay que tener en cuenta que en la CL se puede mantener la misma composición de la fase móvil durante toda la elución (modelo isocrático) o que ésta varíe dependiendo del tiempo (modelo en gradiente).

Así se utilice uno u otro modelo, los métodos principales de mezclado de la fase móvil son el mezclado a alta presión y el mezclado a baja presión.

En el mezclado a alta presión se emplea, para cada uno de los disolventes a mezclar, una bomba, es decir, la mezcla se realiza una vez que los disolventes han atravesado dicha bomba. Por el contrario, en el mezclado a baja presión, la mezcla de los componentes se produce antes de que éstos entren en la bomba, empleándose únicamente una bomba. Éste último sistema tiene la ventaja de poseer menor coste pero unos tiempos de realización mayores.

- Sistemas de inyección

Es un paso crucial en el desarrollo de la HPLC, pues un mal sistema de inyección puede provocar el ensanchamiento de la banda, deteriorándose así la eficacia del sistema.

Existen dos tipos de inyector, los de jeringa y los de válvula. En los inyectores de jeringa, la muestra se introduce de un solo paso en la columna mediante una jeringa con aguja. Mientras que en los inyectores de válvula, la introducción de la muestra en la columna se realiza en dos etapas.

- Conducciones y conexiones

Para evitar que disminuya la eficacia del sistema, por presencia de volúmenes muertos, por ejemplo, es necesario que todas las conexiones y conducciones entre el inyector y la columna y la columna y el detector sean perfectas.

Para reducir el volumen muerto del sistema se emplean tubos capilares como sistemas de conducción en los que el diámetro interno sea lo más pequeño posible. Además, ha de ser de materiales inertes frente a la fase móvil, como acero, titanio o sintéticos.

Al igual que en el tubo (sistema de conducción), en las conexiones también hay que eliminar la presencia de volúmenes muertos.

- Detectores

Se trata de un dispositivo que mide, a la salida de la columna, una determinada propiedad física del eluyente, dependiendo de su composición.

Los detectores pueden clasificarse en dos grandes grupos: los que aportan información estructural sobre las sustancias eluidas (no son de uso frecuente) y los que no aportan información estructural sobre las sustancias eluidas (detector de índice de refracción, de UV y/o visible, de fluorescencia, de conductividad eléctrica, electroquímico...).

- La columna

Se trata del elemento fundamental del cromatógrafo de líquidos ya que es donde ocurre la separación. Su elección adecuada es imprescindible, puesto que el uso de una columna de escasa calidad hará que los resultados obtenidos no sean óptimos.

Las columnas empleadas con mayor frecuencia en CL son las de relleno, formadas por un tubo de acero, principalmente, relleno de una fase estacionaria específica al tipo de separación que se lleve a cabo. El diámetro de dicho tubo varía entre 2 y 60 mm y su longitud entre 5 y 30 cm.

Pero, además, pueden emplearse columnas de diámetros muy inferiores y longitudes superiores. Un ejemplo son las microbore, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 2 mm y su longitud entre 25 y 100 cm. La principal ventaja del uso de estas columnas de tamaño tan pequeño es que permite reducir el empleo de disolventes, lo cual facilita el

acople de la CL a otras técnicas, como por ejemplo la espectrofotometría de masas. Así, surge la cromatografía de líquidos capilar, caracterizada, principalmente, por el hecho de usar columnas de tubos (de sílice) de muy pequeño diámetro y de mayor longitud, que permite el no empleo de partículas de fase estacionaria como ocurría en los casos anteriores, ya que dicha fase estacionaria se encuentra, aquí, ligada químicamente a las paredes del tubo.

Con todo ello, podemos deducir que los factores de una columna que intervienen en su capacidad de separación son el diámetro interno, la longitud, las conexiones, el relleno y el tamaño de las partículas del relleno.

En cuanto a la elección del diámetro interno de la columna, ha de ser en función del tamaño de la muestra a separar. Si la muestra inyectada es de pocos microgramos, se usan columnas de pequeño diámetro; por el contrario, con muestras de mayor cantidad el diámetro interno supera los 10 mm. Hay que tener en cuenta que el empleo de columnas de gran diámetro presentan la desventaja de un elevado consumo de disolventes, ya que se requieren flujos altos para conseguir una velocidad continua.

En lo que a la longitud de la columna se refiere, cabe destacar que mayores longitudes de la columna permitirán obtener mayores eficacias. Pero, a pesar de presentar esta ventaja, las columnas de mayor longitud cuentan con el inconveniente de que la presión en cabeza se eleva considerablemente.

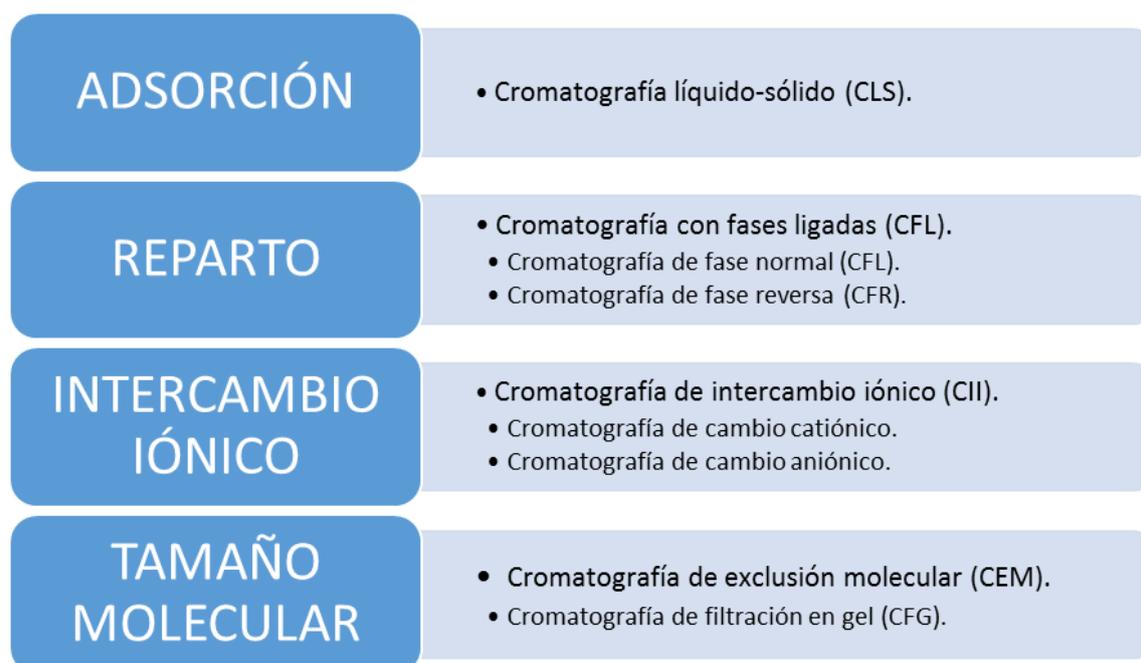
Por otro lado, las conexiones que unen la columna al detector y a los sistemas de inyección y de bombeo del eluyente, son otro factor importante a tener en cuenta para obtener una óptima separación. Como ya se mencionó anteriormente, dichas conexiones han de carecer de volumen muerto, hecho que haría disminuir su capacidad.

En lo referido al relleno de la columna, el material empleado fundamentalmente es el sílice, aunque también pueden encontrarse rellenos basados en polímeros sintéticos. Este relleno actúa como superficie adsorbente, como soporte de la fase estacionaria o como sustrato microporoso (permitiendo la selección de moléculas dependiendo de su tamaño).

Por último, otra de las características para obtener resultados óptimos en la cromatografía líquida es el tamaño de la partícula. A diámetros menores se obtendrá una mayor eficacia del sistema. En la actualidad, los tamaños de partícula habituales oscilan entre 10 y 3 μm de diámetro.

2.4.5. Mecanismos de separación

A la hora de elegir el sistema cromatográfico que se va a emplear es fundamental basarse en la naturaleza de las sustancias a separar, ello permitirá conocer qué mecanismo de separación será el más apropiado. Básicamente, estos mecanismos de separación se pueden dividir tal y como muestra el esquema siguiente:



2.4.5.1. Cromatografía de adsorción líquido-sólido (CLS)

Es el mecanismo más antiguo. Se emplea cuando la fase estacionaria es un sólido (sílice o albúmina principalmente). Y como fase móvil se emplean disolventes orgánicos de baja polaridad, como el n-hexano, el iso-octano...

2.4.5.2. Cromatografía con fases ligadas (CFL)

Actualmente, entre el 80 y el 90% de las separaciones por CL se llevan a cabo por medio de una columna con una fase unida químicamente. Al igual que en el caso anterior, la fase estacionaria son sólidos (cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos o cadenas con extremos amino) y la fase móvil eluyentes de baja polaridad.

2.4.5.3. Cromatografía de intercambio iónico (CII)

Basada en la capacidad de todos aquellos compuestos que presentan un grupo funcional cargado eléctricamente, en disolución acuosa, ya que pueden ser separados atendiendo al signo y a la carga neta que presentan. En este caso, los solutos quedarán retenidos en la fase estacionaria y serán intercambiados por contraiones de la fase móvil.

Los rellenos usados más habitualmente están compuestos por copolímeros de estireno sobre los que se ligan los grupos funcionales cambiadores.

2.4.5.4. Cromatografía de exclusión molecular (CEM)

Basada en la diferencia de tamaños de las moléculas que se van a separar. La fase estacionaria actúa como un pequeño tamiz que deja pasar a las moléculas de menor tamaño a través de los poros del relleno, mientras que las más grandes son arrastradas por la fase móvil. Por lo tanto, las moléculas de mayor tamaño serán las que primero eluirán de la columna; por el contrario, las pequeñas saldrán más tarde.

2.4.6. Aplicaciones

- Farmacológicas: antibióticos, sedantes, analgésicos...
- Bioquímicas: aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos...
- Alimentación: edulcorantes artificiales, antioxidantes, aditivos...
- Industria química: productos aromáticos, propulsores, colorantes...

- Contaminantes: fenoles, pesticidas, herbicidas...
- Química forense: drogas, venenos, narcóticos...
- Medicina clínica: ácidos biliares, metabolitos de drogas, estrógenos...

2.4.7. Ventajas

- Mayor velocidad de análisis.
- Reutilización de las columnas.
- Mayor reproducibilidad debido al mayor control de los parámetros que afectan a la eficiencia de la separación.
- Fácil automatización.

2.5. INTERCAMBIO IÓNICO

Se trata de un proceso aplicado a la purificación, separación y descontaminación de disoluciones. Se basa en reacciones reversibles producidas cuando iones presentes en una disolución se intercambian por otros de igual signo, unidos estos últimos a una partícula sólida inmóvil, también llamada intercambiador. Estos intercambiadores suelen ser resinas, aunque pueden también estar formados por zeolitas, arcilla,...

Las resinas (nos referiremos a partir de ahora así a los intercambiadores dado que en nuestro proyecto han sido los que hemos empleado), pueden ser de dos tipos (figura 17):

- **Aniónicas**: intercambian iones cargados negativamente.
- **Catiónicas**: intercambian iones cargados positivamente.

- **Anfóteras:** pueden realizar a la vez el cambio de iones de ambos signos.

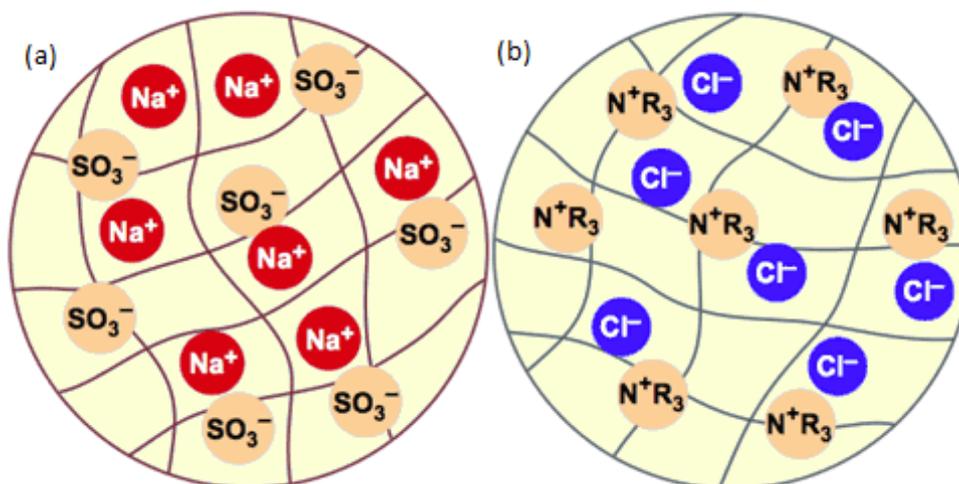


Figura 17: Resinas de intercambio catiónico (a) y aniónico (b). En naranja se muestra el ión fijo presente en el intercambiador. FUENTE: <http://dardel.info/IX/sitemap.html> (20/06/2015).

Hay ciertos parámetros característicos de las resinas, como son la capacidad **de intercambio** y la **selectividad** que presentan:

- **Capacidad de intercambio:** se define así a la cantidad de iones que una resina es capaz de intercambiar en unas condiciones experimentales dadas, y ésta va a depender directamente de la afinidad relativa del ión de intercambio por la resina utilizada. Distintos factores pueden afectar a la capacidad de intercambio, como por ejemplo la concentración y la carga de moléculas contaminantes en la muestra; el pH de la disolución; la temperatura;...
- **Selectividad:** la selectividad de una determinada resina frente a dos iones en disolución se mide por el coeficiente de selectividad, el cual varía en función de distintos factores, tales como la naturaleza del grupo funcional; la valencia del ión; la polaridad de estos; el tamaño de los contra-iones;...

El modo de operación de las resinas de intercambio iónico consta de varias etapas, en cada una de las cuales se va a modificar el equilibrio iónico de la resina, hasta volver al punto inicial. Estas etapas incluyen un acondicionamiento previo de la resina a

emplear, con el fin de conferirle una "configuración" determinada para el proceso que se va a llevar a cabo. Estas etapas son las siguientes (figura 18):

- I. **Empaquetamiento de la resina:** consiste en la preparación de la columna mediante la colocación del intercambiador. Este se introduce en la columna previamente lavada con agua destilada para evitar contaminantes, y de manera que no queden bolsas de aire. Tampoco conviene que esté sometido a alta presión, sobre todo en el caso de las resinas, ya que afectará al flujo de la muestra a través de la columna, dificultando sensiblemente el proceso.
- II. **Acondicionamiento:** consiste en cambiar el contra-ión de la resina, poniendo está en contacto con el ión deseado. Este proceso se realiza mediante el paso de una disolución ácida o básica, realizando posteriormente un lavado con agua destilada con el propósito de eliminar el sobrante de la disolución empleada, para que no afecte a los resultados una vez empieza a fluir la muestra problema por la columna.
- III. **Fase de carga:** durante la fase de carga se realizará el intercambio de iones entre la solución y el intercambiador. Los iones de una determinada carga (dependiendo de si el intercambio es de tipo aniónico o catiónico, como previamente se ha explicado), van quedando retenidos en la resina cargada. El proceso de retención se prolonga en el tiempo hasta que la resina se satura. Una vez que esto ocurre, la concentración de iones en la disolución que sale de la columna aumenta, conociéndose este aumento como *breakthrough* o curva de ruptura. Llegados a este punto, el intercambio deja de ser efectivo, y se habrá alcanzado la saturación del intercambiador.
- IV. **Fase de elución o etapa de regeneración:** una vez que ha pasado toda la solución problema a lo largo de la columna, llega el momento de extraer los iones que han quedado retenidos por la resina para regenerarla. Esta fase se denomina también "fase de recuperación". Consiste en extraer los mencionados iones de manera que la resina quede completamente restaurada y preparada para ser empleada de nuevo. La concentración de iones obtenidos durante la fase de

elución deberá ser la misma a la que quedó retenida durante la fase de carga, de manera que la cantidad final de dicho analito problema sea la misma al principio que al final del proceso, si bien ésta la obtendremos en un volumen inferior al inicial al haber sido concentrada durante el proceso. Esta elución se lleva a cabo de la misma forma que en la fase de acondicionamiento, con disoluciones ácidas o básicas, según las condiciones de trabajo, aunque normalmente se varía la concentración de éstas, con el fin de favorecer la extracción.

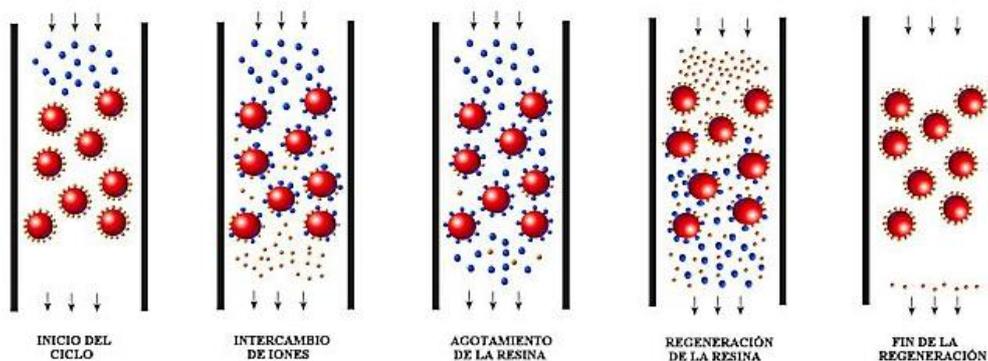


Figura 18: Etapas durante la operación con columnas de intercambio iónico.

En los últimos años, se ha venido estudiando la aplicabilidad del intercambio iónico a procesos de purificación de productos derivados del suero lácteo, concretamente al ácido láctico y al ácido lactobiónico, así como el estudio de distintas resinas y su comportamiento frente a las formas ionizadas de estos ácidos. Como ya hemos mencionado con anterioridad, se trata de dos productos de gran potencial en industrias como la alimentaria, la cosmética, la química o la biosanitaria, por lo que dicha purificación representaría un gran avance de cara a su implementación en procesos de producción.

Hasta el momento, la mayoría de estudios abordan el proceso centrándose mayoritariamente en el ácido láctico, quedando el ácido lactobiónico en un segundo plano en estos trabajos. La fuente de ácidos difiere de unos estudios a otros, si bien el objetivo es similar.

Algunas de las primeras resinas estudiadas para la purificación de ácido láctico fueron las Amberlite IRA (900, 400, 96 y 67). La fuente de ácido láctico que se empleó en estos estudios fue madera pretratada (Moldes et al., 2001). Este estudio determinó que las mejores resinas entre las mencionadas, aplicadas a la recuperación de ácido láctico eran la IRA-900 y la IRA-400. En ambos casos se estudió su capacidad, el consumo necesario para su regeneración después del uso, el porcentaje de recuperación de ácido láctico y en qué medida variaba la concentración del producto, estudiando el proceso tras 4 secuencias de carga-descarga de la columna. Se observó también que la capacidad de las resinas se mantenía inalterada tras practicar varios ciclos de carga y descarga sobre ellas, de manera que el proceso no se veía afectado con el paso del tiempo y el desgaste de la resina era mínimo.

Ese mismo año, se estudió también el pH óptimo al cual la resina IRA-400 presentaba su máxima capacidad de adsorción para el ácido láctico (Cao et al., 2001). Para ello se estudió su funcionamiento trabajando a pHs superiores e inferiores al pK_a del ácido. Se llegó a la conclusión de que la capacidad de adsorción a pH-5 era mucho mayor que a pH-2. Además establecieron que a ese pH-5 el H_2SO_4 actuaba como eluyente con alto porcentaje de recuperación a una concentración 1.0 M

Ya en el año 2006, Riera et al. desarrollaron un nuevo procedimiento para la purificación del ácido láctico, basado en dos etapas: una primera etapa de retención catiónica para la cual se empleó la resina Lewatit S2568H, y una segunda etapa aniónica, donde la resina empleada fue la Lewatit S3428, que retenía los aniones presentes en la muestra, generando una solución acuosa de ácido láctico. La pureza final del láctico obtenido por este método superaba el 99%.

Otro estudio llevado a cabo en el año 2008 de nuevo empleando la resina Amberlite IRA-400 estableció un nuevo pH óptimo de retención del ácido láctico, situándolo en 6.1 (Ataei et al., 2008)

Por último, en el año 2012 se realizó un nuevo estudio para la purificación de ácido láctico mediante la resina IRA-400 e IR-120. En él, se evaluó la respuesta de la resina IRA-400 activada con HCl, H₂O y H₂SO₄. La activación mediante HCl se

evaluó a pH-5, mientras que cuando la activación era por H₂O, los pH de evaluación fueron 3.5 y 6.3. Como resultado se obtuvieron porcentajes de recuperación de entre el 73 y el 77% (Quintero et al., 2012).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SEPARACIÓN POR MEMBRANAS

La separación por membranas o microfiltración por membranas, como es nuestro caso, nos va a permitir eliminar la biomasa presente en la muestra de fermento, de manera que no haya ningún tipo de contaminante que pueda interferir en el posterior proceso de obtención y purificación de los ácidos.

3.1.1. Disoluciones empleadas

Para realizar nuestro proyecto, partimos de fermentados de suero, variables en su composición tanto en ácido láctico como en ácido lactobiónico (tabla 8), obtenidos mediante co-cultivos bacterianos, trabajando con dos bacterias en fermentaciones competitivas. Estas bacterias fueron:

- *Lactobacillus casei*: genera ácido láctico como producto de fermentación.
- *Pseudomonas taetrolens*: genera ácido lactobiónico como producto del proceso fermentativo.

Tabla 8: Muestras de fermentados empleadas en el trabajo y concentraciones iniciales de ácidos láctico y lactobiónico de las mismas antes de diluir.

MUESTRA	COMPONENTES	V. SUERO INICIAL (ml)	V. SUERO FINAL (ml)	[láctico] inicial (g/L)	[lactobiónico] inicial (g/L)
1	Ácido láctico	930	4000	6.798	(-)
2	Ácido láctico + lactobiónico	1650	4000	4.290	1.100
3	Ácido láctico + lactobiónico	1800	4000	2.162	0.522
4	Ácido láctico + lactobiónico	1450	4000	4.039	4.792
5*	Ácido láctico + lactobiónico	3210	3210	9.666	1.290

3.1.2. Equipo empleado

El equipo de membranas (figura19) empleado para separar la biomasa de nuestra muestra fue desarrollado por ADEPRO INGENIERÍA, S. L. Consta de una carcasa de acero inoxidable en cuyo interior se colocan las membranas seleccionadas para la separación.

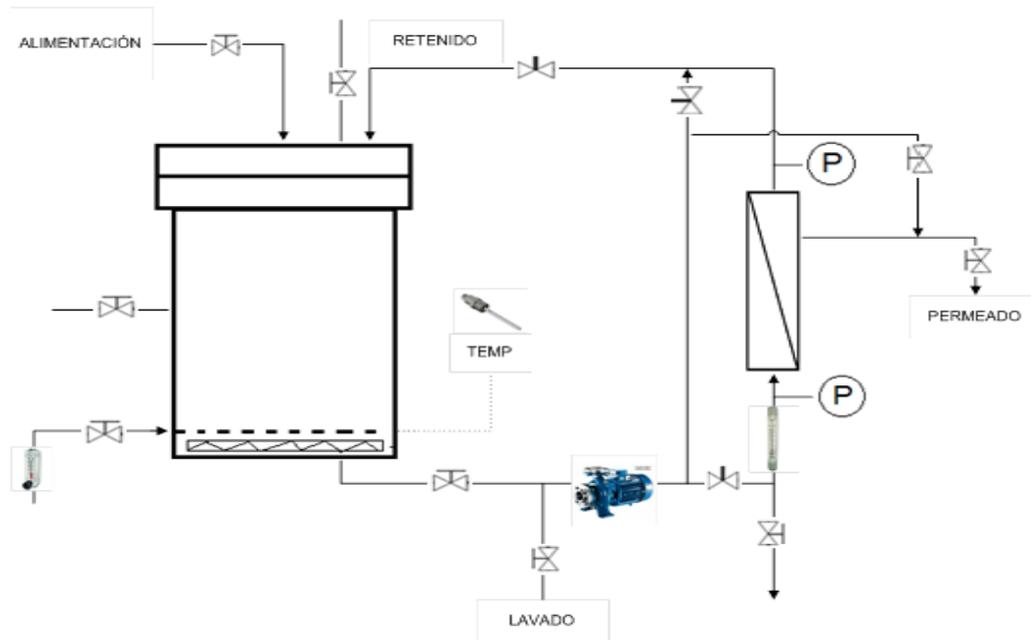


Figura 19: Esquema del equipo de microfiltración empleado.

La alimentación se realiza a través de un tanque cilíndrico de metacrilato de 20 litros de capacidad, que consta de un difusor de aire con un rotámetro, que nos permite medir la presión de entrada al circuito, y una resistencia de calentamiento, así como de una sonda de temperatura y el controlador digital pertinente, que nos dará información acerca de las condiciones a las cuales estamos trabajando. La alimentación es bombeada por medio de una bomba EBARA que garantiza un caudal máximo de unos 4 m³/h y una presión máxima de unos 6 bares. También dispone de dos sensores de presión a la entrada y a la salida de la membrana, con sus controladores digitales, situados en el armario eléctrico.

El flujo y la circulación del líquido están regulados por una serie de válvulas manuales, que permiten la extracción del permeado, así como del retenido, o la recirculación de ambos en los casos pertinentes.

En el armario eléctrico (figura 20), como hemos mencionado previamente, se encuentran el interruptor general, la seta de parada de emergencia y los interruptores para la activación de los distintos componentes eléctricos de los que consta la planta. En su interior están los elementos de control de la planta así como las protecciones necesarias contra posibles fallos eléctricos (sobrecargas de la bomba, cortocircuitos,...). Todos los elementos constituyentes anteriormente mencionados se montan sobre una estructura de acero inoxidable 304 con ruedas, que facilitan su movilidad.



Figura 20: Equipo de membranas. A la izquierda, el tanque de alimentación; a la derecha, el armario eléctrico con los controladores.

3.1.3. Membrana empleada

La membrana empleada en el proceso de microfiltración fue una membrana CéRAM (Tami Industries, Nyons, Francia), con un diámetro interno de 10 mm; un diámetro de poro de 150 kDa y una longitud de 600 mm, que consta de un soporte de óxido de titanio y una capa activa de ZrO_2 / TiO_2 .

3.1.4. Procedimiento

Partimos inicialmente de distintas muestras de suero, variables en su composición en cuanto al contenido de ácido láctico, ácido lactobiónico, lactosa y biomasa. Antes de proceder a realizar la separación en el equipo, es necesario el acondicionamiento de la muestra para aumentar la eficacia del proceso. Como la planta tiene una estructura preparada para trabajar con volúmenes sensiblemente superiores a los volúmenes de lactosuero de partida, empezamos diluyendo las muestras de suero (1-4), llevándolas a un volumen de trabajo de 4 litros con agua destilada. En la tabla 8 se indican las disoluciones empleadas, así como la composición inicial de las muestras. Como de la muestra 5 disponemos de un volumen mayor, prescindimos de la dilución*.

El modo de operación en la planta consiste en la toma de muestras de 12 ml del permeado en intervalos de 5 minutos, comenzando en el minuto 0 o muestra diluida, y prolongando el proceso hasta el agotamiento del volumen en el equipo, asegurándose de que no haya fugas en el sistema. Al acabar, tomamos también dos muestras del concentrado final retenido en el tanque, con el fin de evaluar la eficacia del proceso. A lo largo del mismo, la membrana sufrirá un progresivo ensuciamiento, el cual provocará una disminución del flujo de la muestra por la membrana, disminuyendo el volumen de permeado conforme avanza la filtración.

Cabe destacar que durante la operación, y a medida que disminuye la presión transmembrana como consecuencia tanto del ensuciamiento de la membrana con la que operamos como del descenso de volumen de muestra en el tanque de alimentación, se produce un progresivo aumento de la temperatura en el sistema, debido al continuo bombeo de muestra y a las fuerzas de rozamiento que ejercen los distintos componentes del circuito. Esto va a ocasionar la aparición de espumas en el tanque de alimentación.

Una vez finalizado el proceso de filtración, es necesario llevar a cabo el lavado de la membrana con el fin de eliminar cualquier residuo, partícula o ion que haya podido quedar retenido en ella. El lavado se lleva a cabo en 3 etapas:

1. Lavado alcalino: con 5 litros de una disolución de hidróxido de sodio 0.1M, a una temperatura de 85°C durante 30 minutos.
2. Lavado ácido: con 5 litros de una disolución de ácido nítrico 0.1M, a 50°C durante 15 minutos.
3. Neutralización: se lleva a cabo con agua, y tiene la función de neutralizar la carga de la membrana tras los dos pasos anteriores.

Concluido el proceso de limpieza, la membrana se encuentra en condiciones de volver a ser empleada, toda vez que en ocasiones sucesivas será necesario un acondicionamiento inicial con agua para optimizar el proceso.

3.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

Tras etiquetar los distintos tubos tanto de la muestra inicial, como de los permeados y los concentrados finales, se lleva a cabo un estudio de su composición tanto en ácido láctico como en ácido lactobiónico por medio de un equipo de HPLC. Este proceso lo emplearemos nuevamente tras realizar el intercambio iónico, del cual hablaremos a continuación.

Para llevar a cabo un análisis por HPLC, en primer lugar es necesario preparar las muestras, ya que pueden contener materiales contaminantes del medio que hayan entrado en contacto con la muestra a la hora de su recogida. Para ello se emplearán tubos de HPLC de 2ml, en los cuales añadiremos entre 0.5 y 1 ml de la muestra a analizar, por medio de una jeringa acoplada a un filtro Minisart® que va a eliminar cualquier impureza presente en los tubos.

En ocasiones puede darse la circunstancia de que las concentraciones de la muestra se salgan de las rectas de calibrado establecidas en el equipo de cromatografía,

por lo que es necesario diluirlas previamente con el fin de disminuir esa concentración fuera de escala. Las diluciones que se han realizado en este trabajo han sido 1:1, así pues añadiendo 0.5 ml de muestra y 0.5 de agua destilada. En caso de no ser suficiente, aumentaríamos la relación, si bien en este trabajo no se ha hecho necesario.

3.2.1. Equipo empleado

A continuación se muestra una fotografía del equipo empleado:



Figura 21: Equipo de HPLC.

La fase móvil que se emplea en el proceso es una disolución de H_2SO_4 0,450 mM en agua MiliQ, que ha sido anteriormente filtrada mediante vacío con un tamaño de poro de 0,22 μm , y a la cual le han sido aplicados ultrasonidos durante 30 minutos.

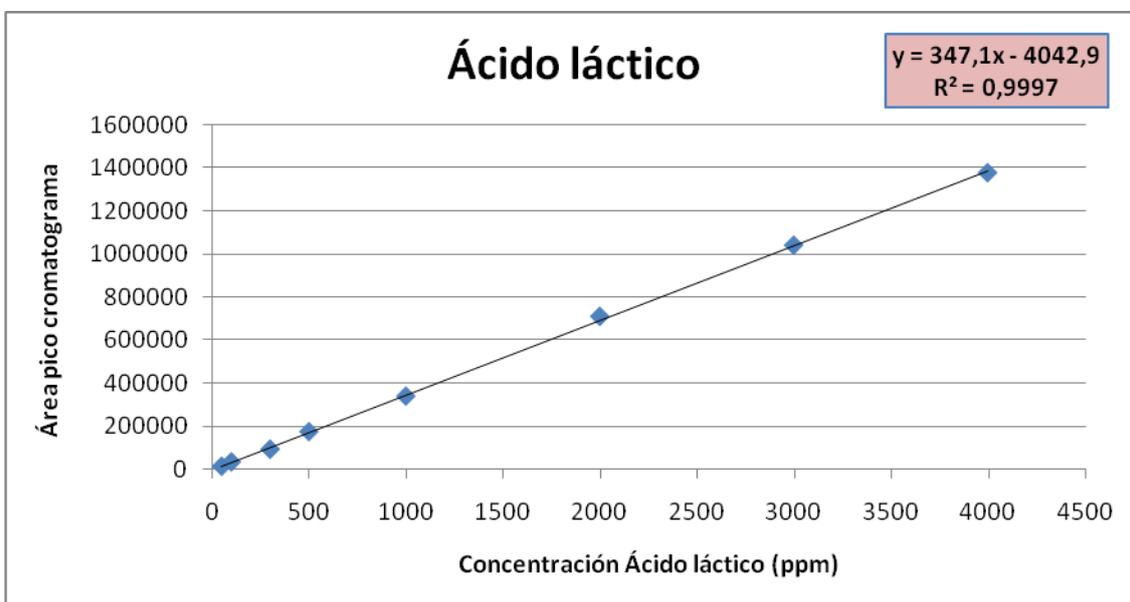
La columna del cromatógrafo es un modelo ICSep ICE-ION-300 (Transgenomic Inc., San José, California). Esta columna trabaja a una temperatura de 75 °C, siendo el flujo de la fase móvil de 0,3 ml/min y bajo presión aproximada de 40 bar.

El detector empleado es el índice de refracción (RID) del cromatógrafo Agilent (modelo Serie 1200, California) y el software utilizado para la adquisición de datos es el Agilent ChemStation.

3.2.2. Rectas de calibrado del ácido láctico y el ácido lactobiónico

Para poder interpretar los resultados obtenidos mediante la cromatografía, es necesario convertir las áreas que nos da el software en concentraciones en g/L de la sustancia en cuestión. Es por ello que recurrimos a las rectas de calibrado, que nos permiten obtener dicha concentración a partir del área mediante sencillos cálculos matemáticos.

- **Ácido láctico**



Gráfica 3: Recta de calibrado del ácido láctico.

La ecuación de la recta patrón para obtener la concentración en g/L de ácido láctico es la siguiente:

$$y = 347.1x - 4042.9$$

siendo x la concentración de ácido láctico en ppm, e y el área del pico en el cromatograma. Despejando x :

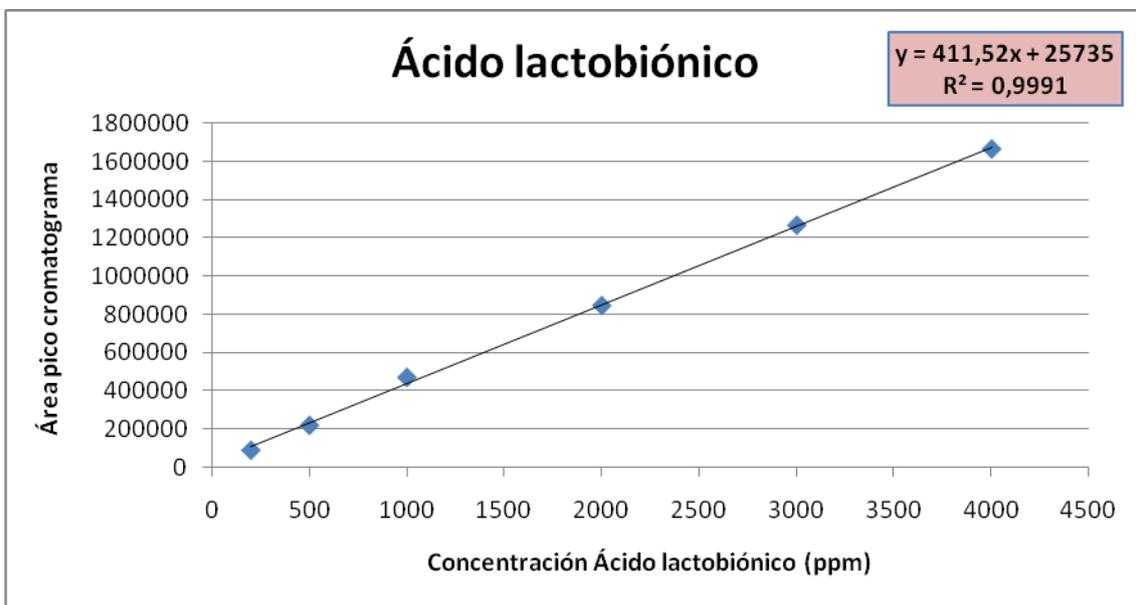
$$x = \frac{y + 4042.9}{347.1}$$

Para expresar el resultado según nuestros intereses, es decir, en g/L, y teniendo en cuenta que 1ppm = 1mg/L:

$$x = \frac{y + 4042.9}{347.1 * 1000}$$

Así obtenemos la concentración de ácido láctico presente en la muestra mediante el área del pico que nos da el cromatograma del HPLC.

- **Ácido lactobiónico**



Gráfica 4: Recta de calibrado del ácido lactobiónico.

La ecuación de la recta patrón para el ácido lactobiónico es la siguiente:

$$y = 411.52x + 25735$$

Despejando como en el caso anterior, tenemos que la concentración en g/L de ácido lactobiónico sería:

$$x = \frac{y - 25735}{411.52 * 1000}$$

3.3. INTERCAMBIO IÓNICO

Tras realizar la microfiltración, en la cual hemos eliminado la biomasa contenida en el fermentado, es el turno de concentrar y purificar los ácidos de interés. Para ello, sometemos las muestras a un proceso de intercambio iónico, que ya hemos explicado previamente.

3.3.1. Muestras empleadas

Una vez analizados los permeados procedentes de microfiltración por HPLC, trabajamos solamente con dos muestras, como se indica a continuación:

- Mezcla de muestras 1, 2 3 y 4
- Muestra 5

3.3.2. Resinas empleadas

En primer lugar se someten las muestras a un intercambio empleando una resina aniónica (Lewatit 4428), proceso que nos va a permitir concentrar los ácidos. Seguidamente, repetiremos el mismo proceso, empleando esta vez una resina catiónica (Lewatit 2528), cuya misión será eliminar iones indeseados con el fin de purificar la muestra.

3.3.3. Equipo empleado

El equipo empleado para realizar el intercambio iónico está formado por una bomba peristáltica, unida a una columna, dentro de la cual se deposita la resina a utilizar, como podemos observar a continuación:



Figura 22: Equipo empleado para el intercambio iónico.

Antes de introducir la muestra en el sistema es necesario acondicionar tanto los permeados de suero como la resina a emplear, de manera que le suministremos los iones de interés para llevar a cabo el intercambio.

3.3.4. Acondicionamiento de la resina

- Primera etapa: se emplea una disolución de ácido clorhídrico 0.1 M durante 15 minutos a través de la columna.
- Segunda etapa: se realiza con agua destilada también durante 15 minutos aproximadamente, con el fin de eliminar iones libres y restos de la disolución de clorhídrico que no hayan quedado unidos a la resina.

Este proceso se lleva a cabo antes de operar con ambos tipos de resina (aniónica y catiónica).

3.3.5. Acondicionamiento de la muestra

De la misma manera que es necesario realizar un pretratamiento de la resina para optimizar el proceso, lo mismo sucede con las muestras de suero. En nuestro caso los experimentos los hemos llevado a cabo a unos pH de 5 y 6 en el caso del intercambio aniónico, y a pH=5.6 en el caso del intercambio catiónico. El problema reside en que el pH al que se encuentra el suero es distinto, de manera que debemos ajustarlo.

El ajuste del pH de las muestras de suero se lleva a cabo mediante dos disoluciones, según necesitemos aumentarlo (basificarlo) o disminuirlo (acidificarlo) hasta optimizar las condiciones. Las disoluciones empleadas son las siguientes:

- Disolución ácida: HCl 0.1 M
- Disolución básica: NaOH 0.1 M

3.3.6. Lavado de la resina

Una vez realizado el intercambio, hay que lavar la resina, por un lado para recuperar los iones retenidos en la misma, y por otro, para dejarla preparada para posteriores usos. Este lavado se ha llevado a cabo con disoluciones de ácido clorhídrico, cuya concentración depende del caso:

- Intercambio aniónico: la disolución de HCl empleada es la misma que la utilizada para el acondicionamiento de la membrana, esto es, 0.1 M.
- Intercambio catiónico: en este caso, la disolución de ácido clorhídrico empleada para el lavado es más concentrada que la que se utiliza para el acondicionamiento de la resina, siendo en este caso de una concentración 0.5 M.

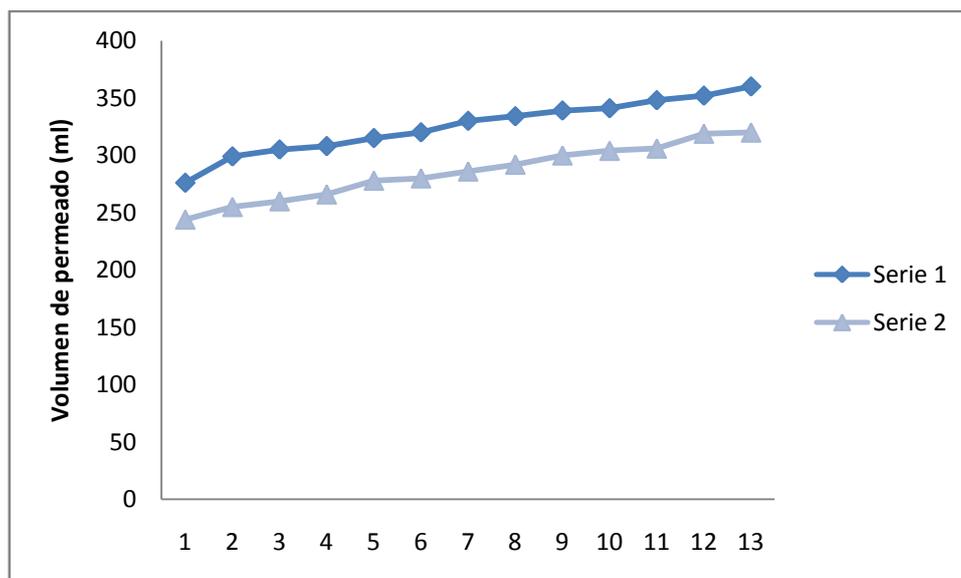
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MICROFILTRACIÓN POR MEMBRANAS

4.1.1. Caracterización de la membrana

4.1.1.1. Comportamiento de la membrana con agua

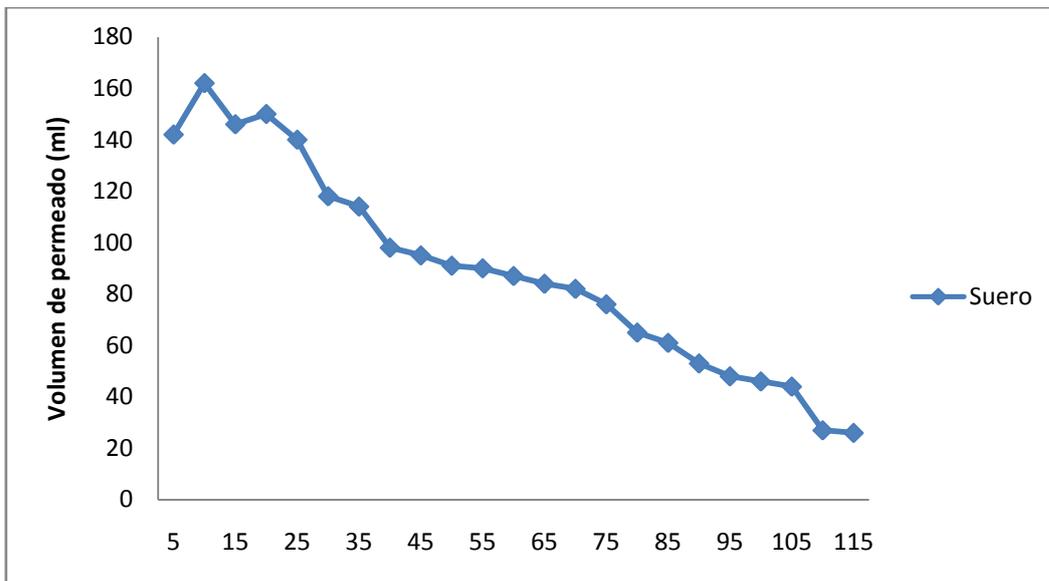
A la hora de trabajar con la membrana de microfiltración es necesario realizar un acondicionamiento con agua, previo al lavado químico de la misma, para eliminar posibles incrustaciones de material empleado con anterioridad, dado el tiempo que estuvo la planta inactiva, y evitar la disminución de flujo ocasionada por esta suciedad. Así, realizamos dos series de prelavado de la membrana. Como podemos observar en la gráfica 5, al principio del proceso el flujo es menor debido a la presencia de ensuciamiento, y conforme va pasando el tiempo éste aumenta progresivamente como consecuencia de la eliminación de suciedad.



Gráfica 5: Comportamiento de la membrana de microfiltración al paso de agua (volumen de permeado en ml por minuto). Las diferencias existentes entre ambas gráficas pueden deberse a diferencias en el volumen inicial de agua empleado y por tanto a diferencias en la presión del fluido en el sistema.

4.1.1.2. Comportamiento de la membrana con suero

De la misma forma que operamos con agua, lo hacemos con suero para ver cómo se comporta la membrana ante disoluciones con altos niveles de biomasa y ácidos. La gráfica obtenida es la siguiente:

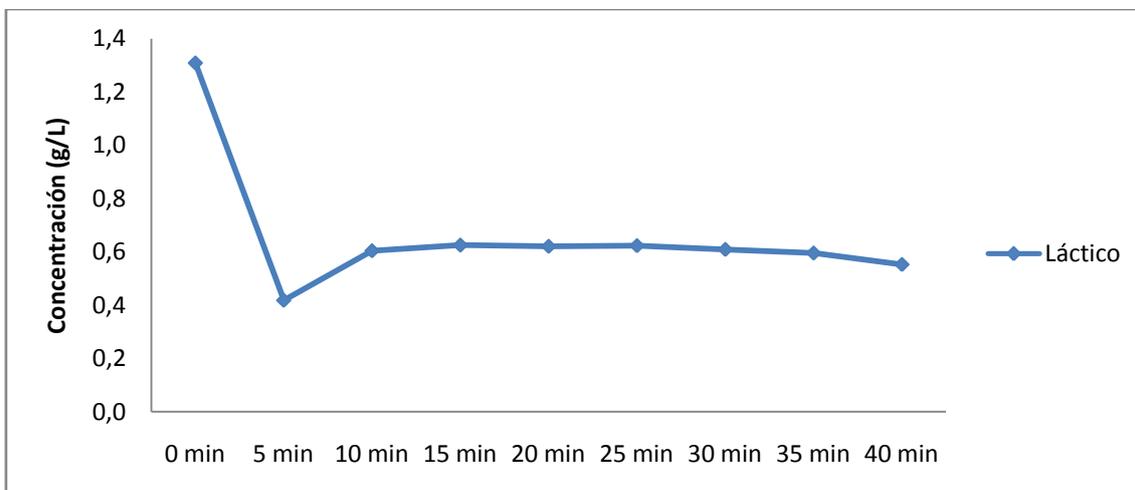


Gráfica 6: Comportamiento de la membrana de microfiltración al paso de suero.

Como observamos en la gráfica 6, conforme el tiempo de circulación del suero por la membrana aumenta, el volumen de permeado disminuye. Esto se debe a una acumulación de residuos en la misma, de manera que el flujo disminuye notablemente a medida que aumenta el ensuciamiento.

4.1.2. Microfiltración de muestras

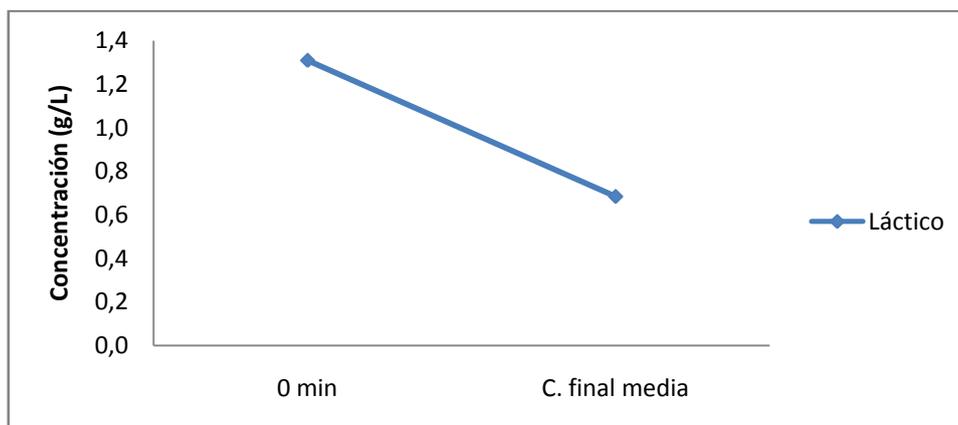
4.1.2.1. Muestra 1



Gráfica 7: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 1 tras someterla a microfiltración.

La muestra 1, como se mencionó previamente, solamente presenta concentración de ácido láctico. En la gráfica 7 podemos observar cómo se comporta con el tiempo. El punto *0 min* se corresponde con la muestra diluida inicial, mientras que observamos cómo en el paso por membrana la concentración se hace constante con el tiempo una vez se ha alcanzado el equilibrio entre la disolución y la membrana, que se correspondería con el punto *5 min*.

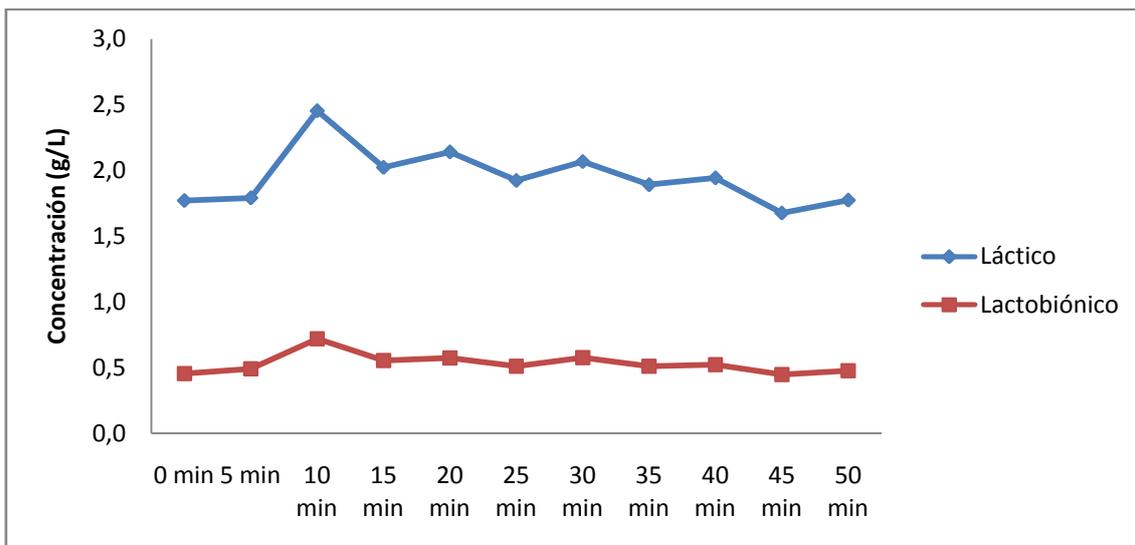
A continuación, podemos ver la comparativa de la concentración de ácido en el concentrado final respecto a la muestra inicial diluida o muestra a tiempo 0, que es de la que partimos en el proceso de microfiltración. Como podemos observar, la concentración final en el concentrado es inferior a la que teníamos en la muestra de partida a tiempo 0, por lo que el proceso ha resultado efectivo en su misión de eliminar la biomasa presente en la mezcla, respetando la concentración de los ácidos de interés (gráfica 8).



Gráfica 8: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 1 durante el proceso de microfiltración.

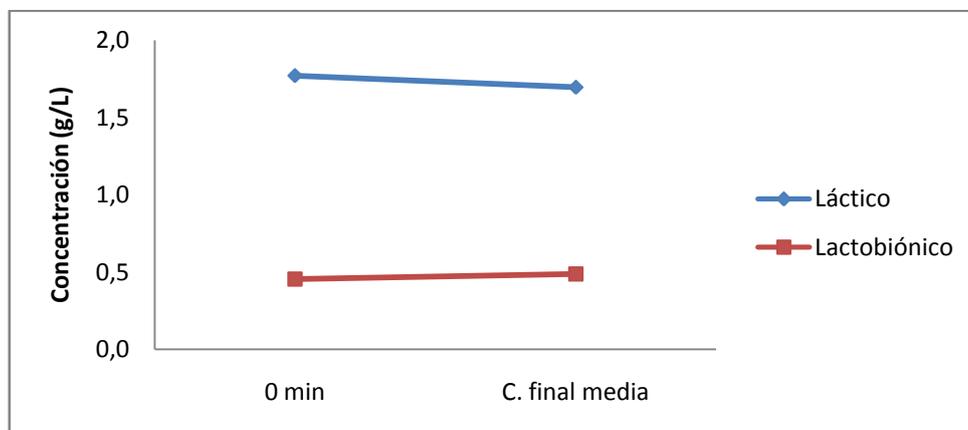
4.1.2.2. Muestra 2

En la muestra 2 ya se incluyen concentraciones tanto de ácido láctico como de ácido lactobiónico. A continuación podemos ver la cinética del proceso de microfiltrado (gráfica 9).



Gráfica 9: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 2 tras someterla a microfiltración.

Como podemos ver en la gráfica 9, la concentración de lactobiónico en la muestra es sensiblemente inferior a la concentración de ácido láctico. Al igual que en la muestra anterior, podemos ver que tras alcanzar el equilibrio, la concentración de los ácidos aparece relativamente constante.

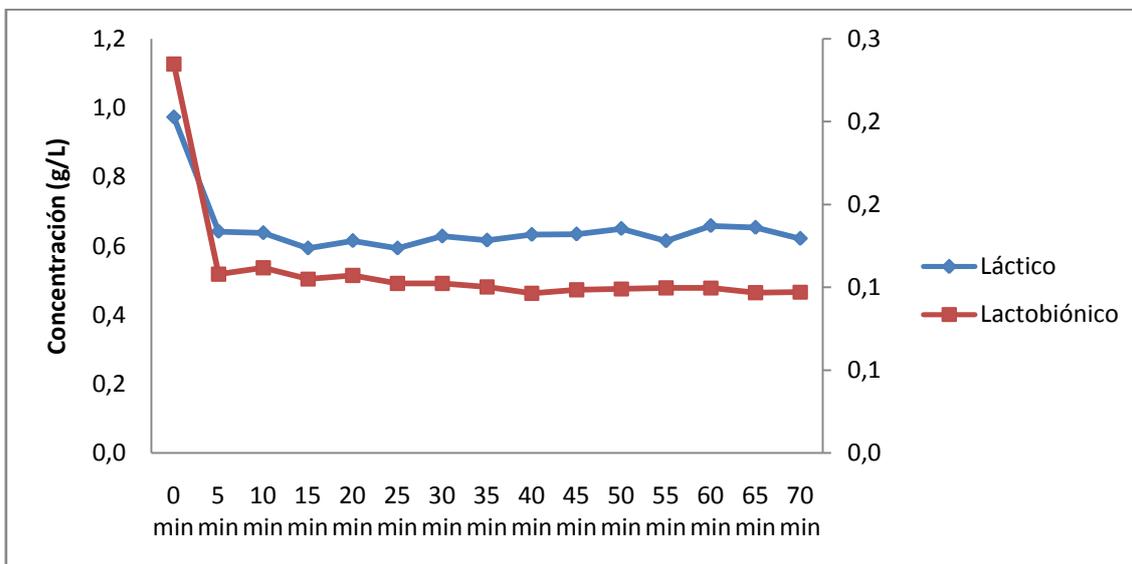


Gráfica 10: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 2 durante el proceso de microfiltración.

De la misma forma que en el caso anterior, observamos que la concentración final del retenido es menor que en la muestra de partida para el ácido láctico (gráfica 10), y un poco mayor en el caso del ácido lactobiónico, lo cual puede deberse a que hay cierta pérdida del ácido de interés junto con la biomasa eliminada.

4.1.2.3. Muestra 3

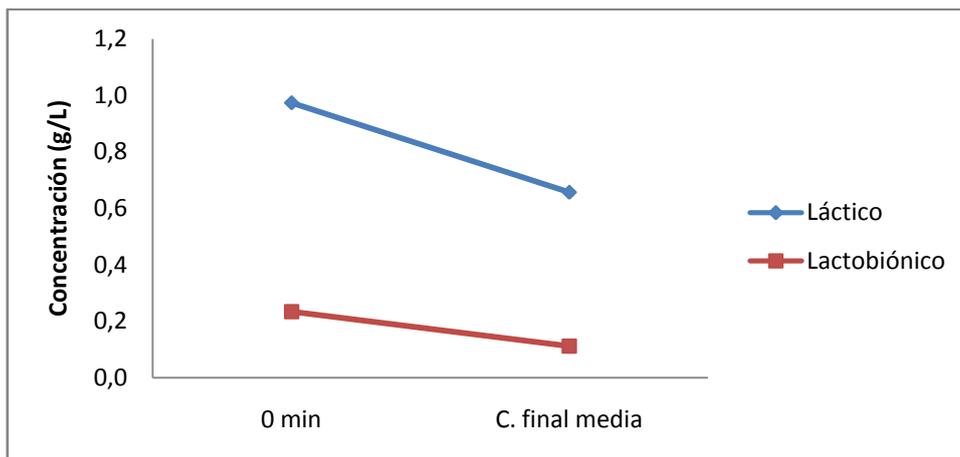
Se trata de otra muestra con concentración tanto de ácido láctico como lactobiónico.



Gráfica 11: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 3 tras someterla a microfiltración.

Podemos observar que de la misma forma que en los casos anteriores, tras alcanzar el equilibrio la concentración a lo largo del tiempo en los permeados se mantiene constante (gráfica 11), siendo en este caso también mayor la concentración de ácido láctico que de ácido lactobiónico en la muestra. El eje secundario (derecha) corresponde a la escala del ácido lactobiónico, dado que la proporción en que se encuentra es bastante inferior a la del ácido láctico, por lo que aplicamos otra escala para poder apreciar los cambios con el tiempo de manera más nítida.

A continuación vemos la relación de las concentraciones de ambos ácidos en la muestra inicial, la muestra diluida y el retenido final del proceso (gráfica 12).

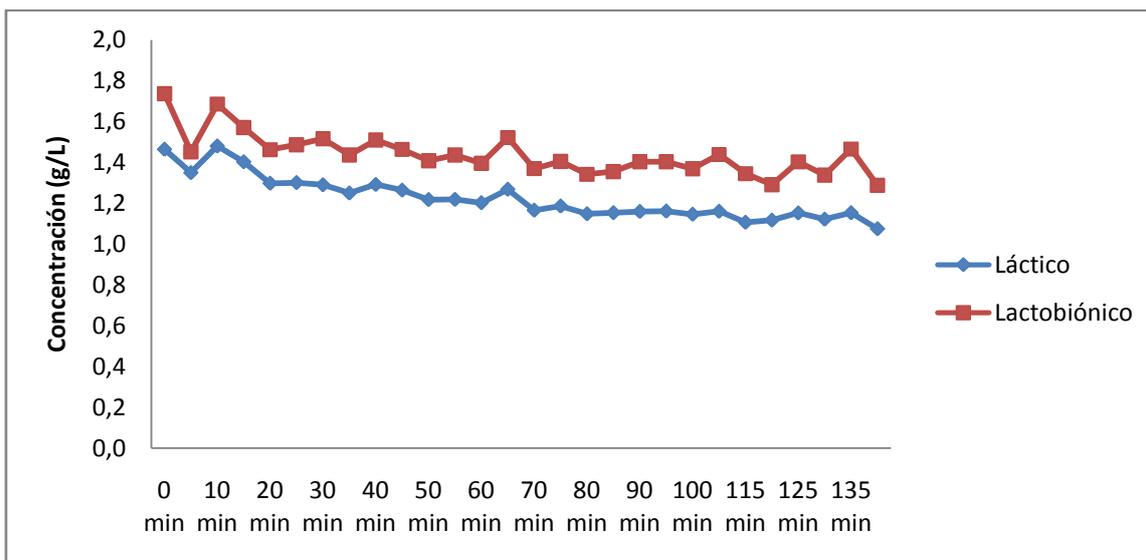


Gráfica 12: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 3 durante el proceso de microfiltración.

Se observa que la concentración de ácidos tanto láctico como lactobiónico presente en el retenido al finalizar el proceso es menor que en la muestra de partida diluida, por lo que el proceso cumplió su objetivo de eliminar biomasa minimizando la pérdida de ácidos de interés.

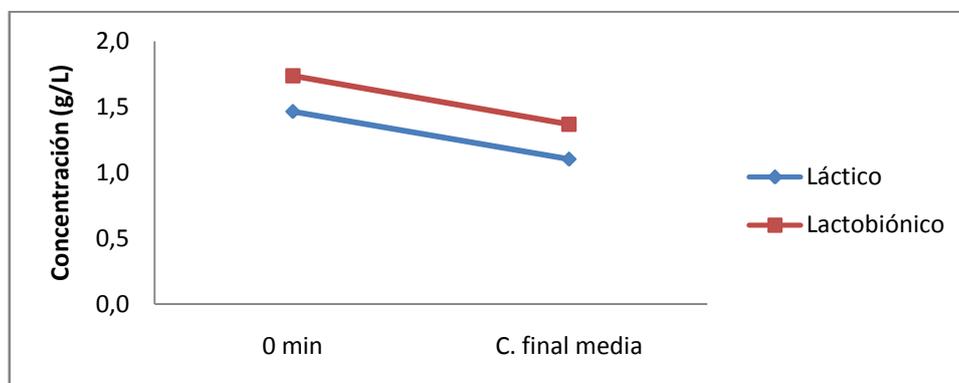
4.1.2.4. Muestra 4

De nuevo se trata de una muestra con mezcla de ácido láctico y ácido lactobiónico.



Gráfica 13: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 4 tras someterla a microfiltración.

Nuevamente, tras alcanzarse el equilibrio entre la muestra y la membrana, observamos que la concentración de ácidos en los permeados tomados a lo largo del tiempo permanece prácticamente constante (gráfica 13).

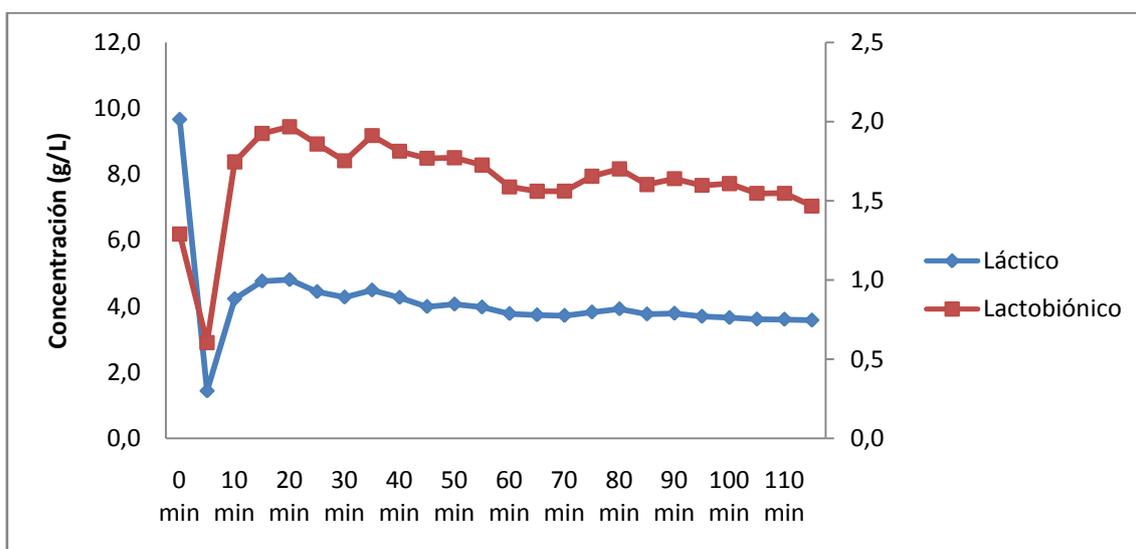


Gráfica 14: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 4 durante el proceso de microfiltración.

También en este caso se observa una disminución en la concentración de ácidos entre el retenido final del proceso y la muestra diluida inicial, dando como consecuencia lugar a una separación de biomasa exitosa (gráfica 14).

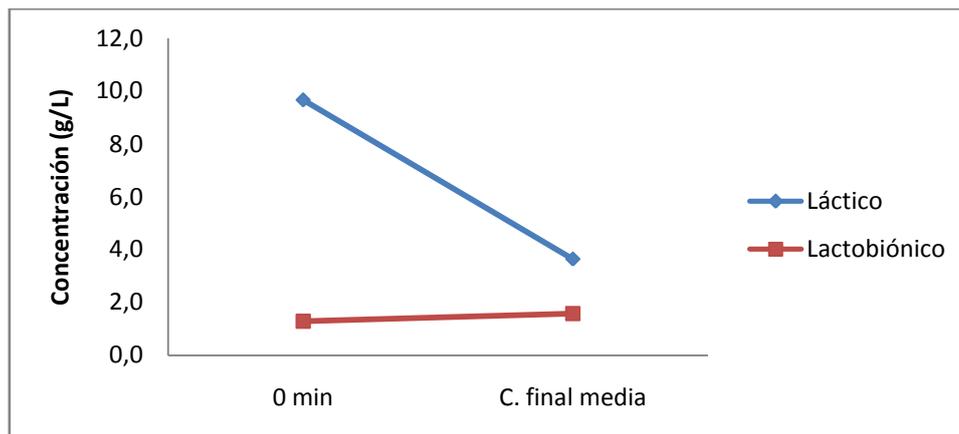
4.1.2.5. Muestra 5

En este caso ya no trabajamos con muestra diluida, sino con un concentrado de ácidos sin adición de agua.



Gráfica 15: Concentración (g/L) de ácidos en los permeados de la MUESTRA 5 tras someterla a microfiltración.

El eje secundario se corresponde con la escala aplicada al ácido lactobiónico, dado que se encuentra en una concentración muy inferior al láctico, y por tanto la aplicamos para poder observar mejor las diferencias con el tiempo. Nuevamente vemos que tras alcanzar el equilibrio, la concentración en los permeados es constante hasta el agotamiento de la muestra en el sistema (gráfica 15).



Gráfica 16: Comparativa de la concentración de ácidos en la MUESTRA 5 durante el proceso de microfiltración.

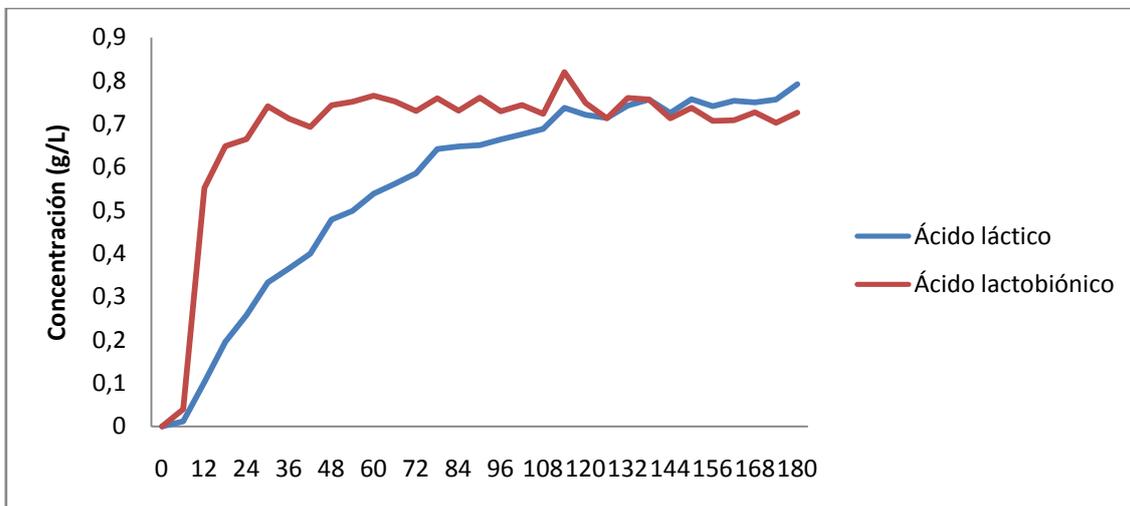
En este caso y como ya hemos mencionado, no diluimos la muestra (gráfica 16), por lo que la comparativa se establece entre la concentración inicial de la muestra y la del retenido final. En el caso del ácido láctico vemos un claro descenso, fruto de una separación correcta, mientras que en el caso del lactobiónico vemos que se mantiene prácticamente igual, probablemente por la pérdida parcial del ácido junto a la biomasa.

4.2. INTERCAMBIO IÓNICO

Como se mencionó en su momento en el apartado de "Material y Métodos", para realizar la concentración y la purificación por medio del intercambio iónico, juntamos los permeados de las muestras **1**, **2**, **3** y **4**, con el fin de obtener un volumen y una concentración de ácidos suficientes como para poder apreciar la efectividad del proceso.

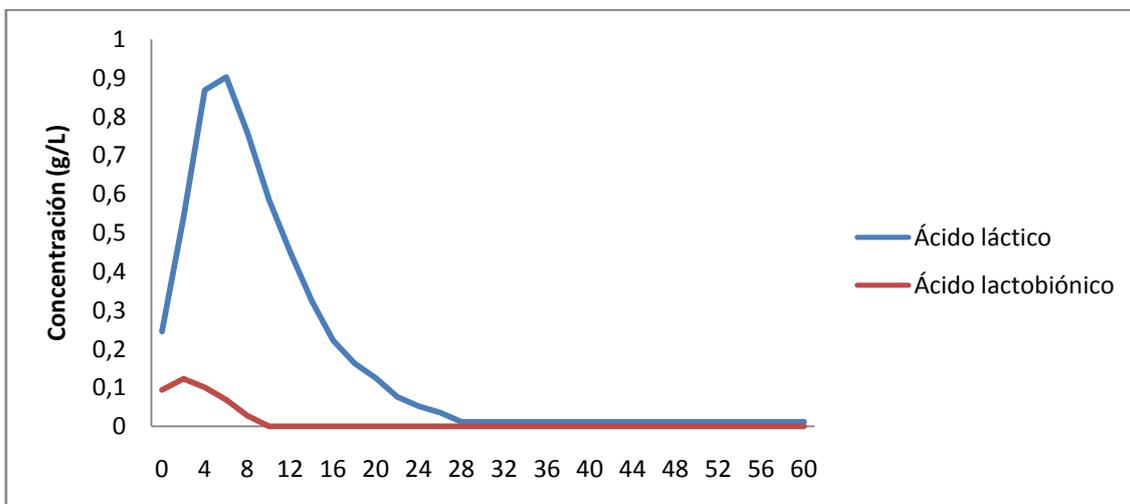
4.2.1. Resina aniónica

4.2.1.1. Mezcla muestras 1, 2, 3 y 4 (pH=5)



Gráfica 17: Concentraciones de ácido láctico y lactobiónico (g/L) en la carga de la mezcla de muestras a pH=5 (aniónico).

Como observamos en la gráfica 17, operando con la muestra a pH=5 se produce retención de ácido láctico en la resina, mientras que el ácido lactobiónico no queda prácticamente retenido, por lo que solamente estamos concentrando láctico, de manera que trabajar a este pH no es útil a la hora de buscar la concentración conjunta de los ácidos.



Gráfica 18: Concentraciones de ácido láctico y lactobiónico (g/L) en la elución de la mezcla de muestras a pH=5 (aniónico).

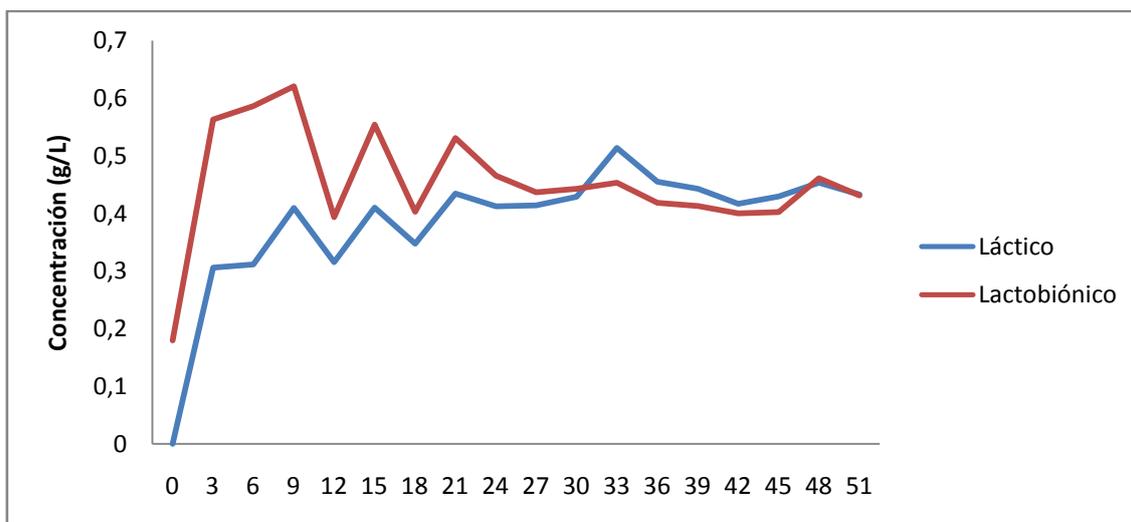
Al realizar el lavado de la resina con HCl 0.1 M recuperamos una parte del ácido láctico que quedó retenido en la resina (gráfica 18). El rendimiento del proceso se corresponde con los gramos de ácido recuperados al final del intercambio (carga + elución) respecto a los gramos iniciales tanto de láctico como de lactobiónico. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Resultados del intercambio aniónico de la mezcla de muestras a pH=5.

g láctico INICIALES	0,341
g lactobiónico INICIALES	0,363
g de láctico muestra	0,202
g de lactobiónico muestra	0,239
g de láctico elución	0,018
g de lactobiónico elución	0
g láctico recuperados	0,220
g lactobiónico recuperados	0,239
RENDIMIENTO LÁCTICO (%)	65
RENDIMIENTO LACTOBIÓNICO (%)	66

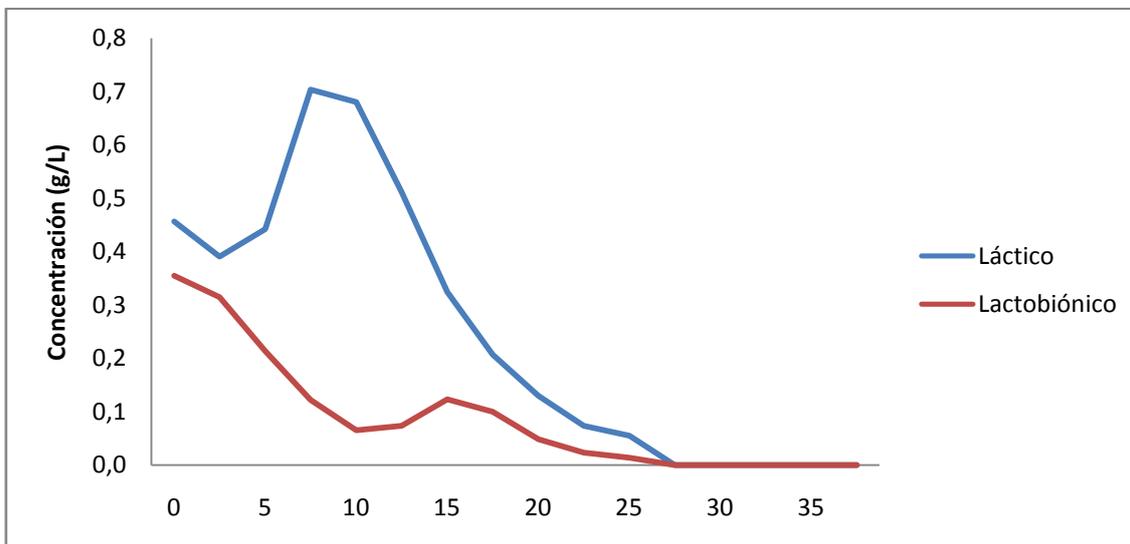
Como observamos, en el rendimiento del proceso es de un 65% para el ácido láctico y de un 66% para el lactobiónico.

4.2.1.2. Mezcla muestras 1, 2, 3 y 4 (pH=6)



Gráfica 19: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la carga de la mezcla de muestras a pH=6 (aniónico).

Al realizar la operación ajustando la disolución a pH=6, observamos que concentramos mejor ambos ácidos conjuntamente (gráfica 19), sobre todo el ácido lactobiónico, con una retención mucho mayor que al trabajar a pH=5.



Gráfica 20: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la elución de la mezcla de muestras a pH=6 (aniónico).

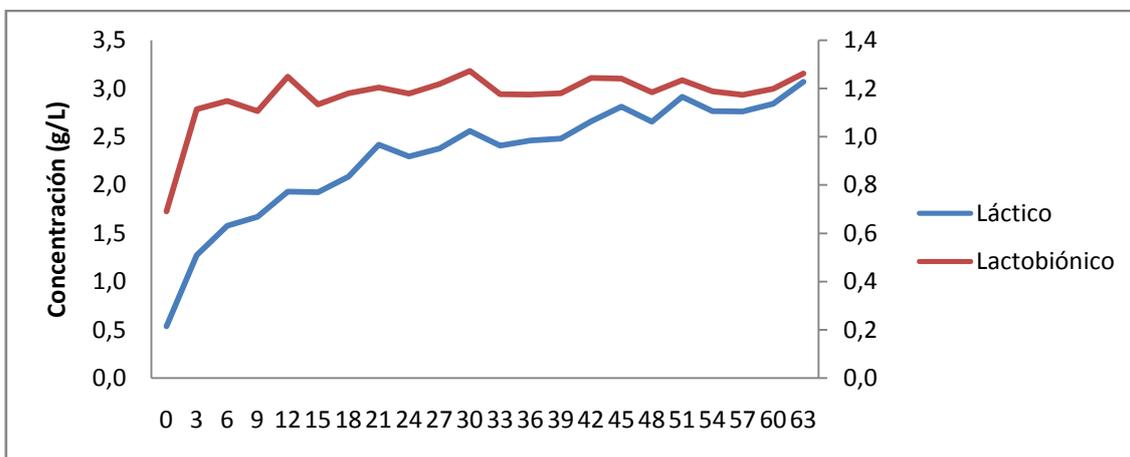
Al realizar el lavado de la resina (gráfica 20) vemos que eluye más rápidamente el ácido lactobiónico que el ácido láctico. Los rendimientos del proceso se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 10: Resultados del intercambio aniónico de la mezcla de muestras a pH=6.

g láctico INICIALES	0,174
g lactobiónico INICIALES	0,126
g de láctico muestra	0,074
g de lactobiónico muestra	0,094
g de láctico elución	0,037
g de lactobiónico elución	0,012
g láctico recuperados	0,111
g lactobiónico recuperados	0,106
RENDIMIENTO LÁCTICO (%)	64
RENDIMIENTO LACTOBIÓNICO (%)	84

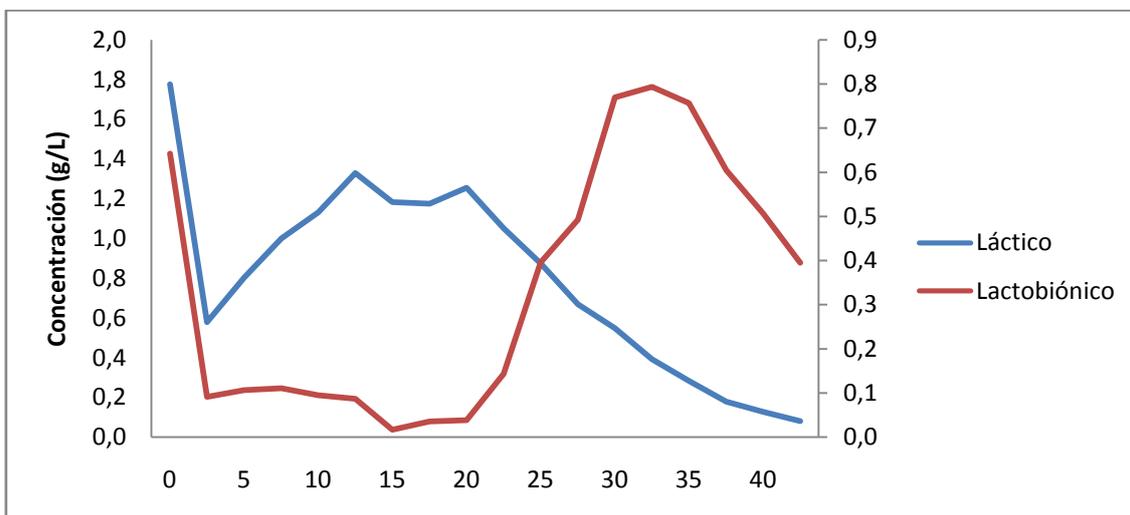
El rendimiento de recuperación de ácido láctico es similar al operar a pH=5, mientras que aumenta mucho el rendimiento de recuperación hasta el 84%.

4.2.1.3. Muestra 5 (pH=6)



Gráfica 21: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la carga de muestra 5 a pH=6 (aniónico).

En el eje secundario de la gráfica 21 se muestra la escala para el ácido lactobiónico, al ser sus niveles de retención mucho menores que los del láctico.



Gráfica 22: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la elución de la muestra 5 a pH=6 (aniónico).

En la gráfica 22, vemos que la elución de ambos ácidos se hace a distinto tiempo, no eluyen conjuntamente como en los casos anteriores. Esto se debe al valor del pKa del ácido láctico (3.86), que es mayor que el del ácido lactobiónico (3.6).

Así, al pasar por la columna la disolución de ácido clorhídrico, el pH va bajando, alcanzando primero el pKa del ácido láctico, de manera que eluye antes que el ácido lactobiónico, dándose esta situación. Se observa en esta muestra dado que las mezclas de los experimentos previamente comentados se encuentran diluidas, por lo que la presencia de agua hace que estas diferencias no se aprecien.

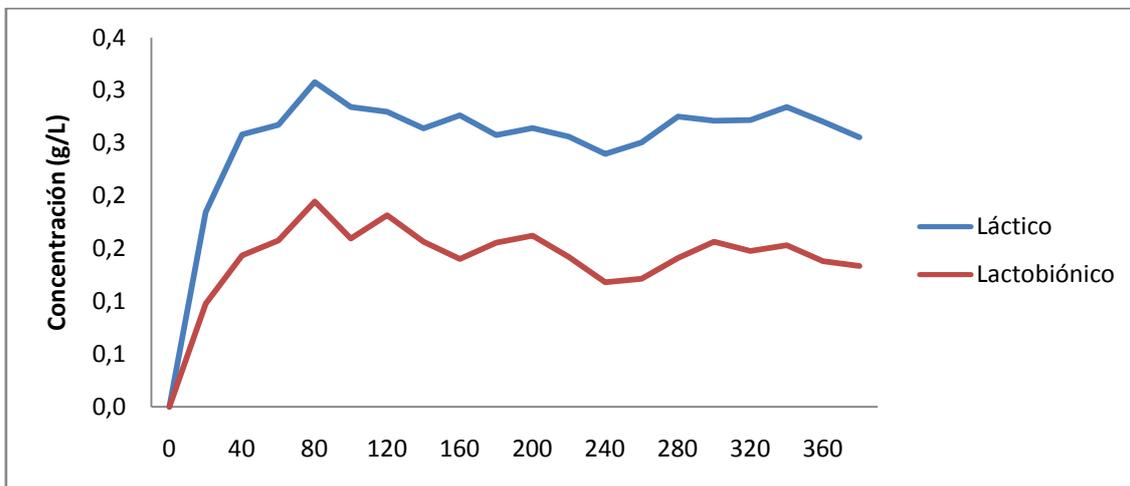
Tabla 11: Resultados del intercambio aniónico de la muestra 5 a pH=6.

g láctico INICIALES	0,979
g lactobiónico INICIALES	0,411
g de láctico muestra	0,583
g de lactobiónico muestra	0,297
g de láctico elución	0,162
g de lactobiónico elución	0,066
g láctico recuperados	0,745
g lactobiónico recuperados	0,363
RENDIMIENTO LÁCTICO (%)	76
RENDIMIENTO LACTOBIÓNICO (%)	88

En este caso los rendimientos son mucho más elevados, lo cual puede deberse a que estamos tratando con muestra no diluída, con una concentración de ácidos mucho más elevada que en los casos anteriores, siendo del 76% para el ácido láctico y del 88% para el ácido lactobiónico.

4.2.2. Resina catiónica

4.2.2.1. Mezcla muestras 1, 2, 3 y 4 (pH=5.6)



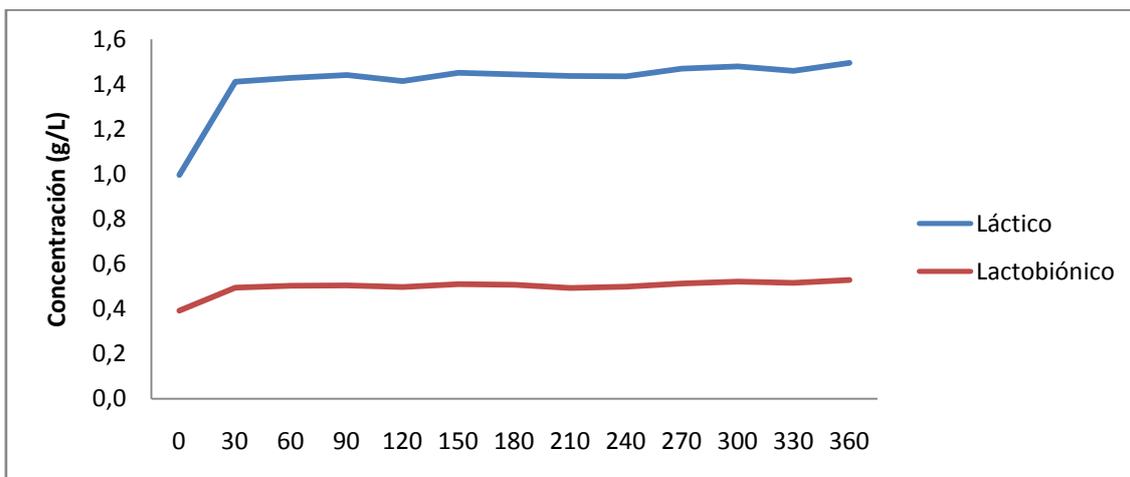
Gráfica 23: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la carga de la mezcla de muestras a pH=5.6 (catiónico).

Como podemos comprobar en la gráfica 23, la retención de la resina catiónica para ambos ácidos es muy baja, ya que la misión de esta resina es la purificación de la muestra, esto es, la eliminación de iones no deseados que puedan estar contenidos en la misma, tales como potasio, magnesio, cloro,... Debido a esta baja capacidad de retención, no obtenemos concentración de los ácidos de interés en la elución, y las pérdidas de los mismos son inherentes a la columna de intercambio sobre la que operamos.

Tabla 12: Resultados del intercambio catiónico de la mezcla de muestras a pH=5.6.

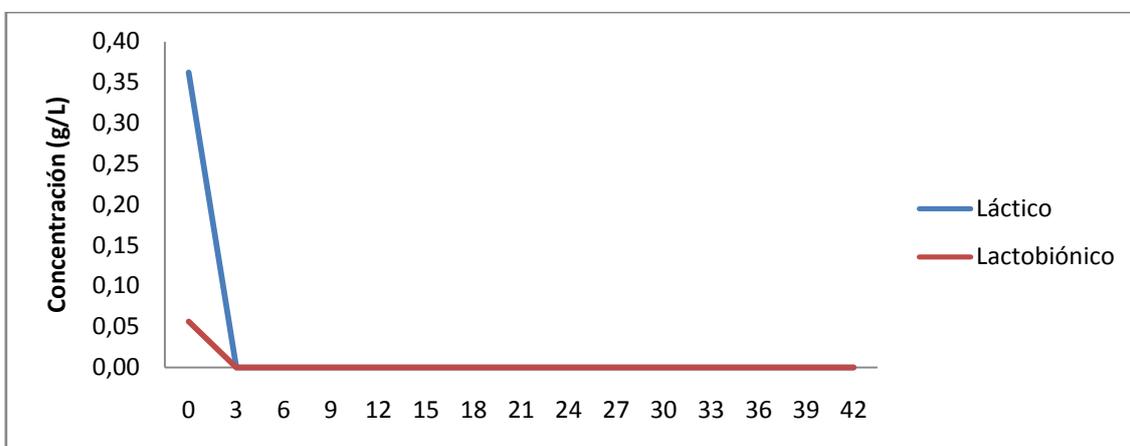
g láctico INICIALES	0,077
g lactobiónico INICIALES	0,047
<hr/>	
g de láctico muestra	0,058
g de lactobiónico muestra	0,032
g de láctico elución	0
g de lactobiónico elución	0
g láctico recuperados	0,058
g lactobiónico recuperados	0,032
RENDIMIENTO LÁCTICO (%)	75
RENDIMIENTO LACTOBIÓNICO (%)	68

4.2.2.2. Muestra 5 (pH=5.6)



Gráfica 24: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la carga de la muestra 5 a pH=5.6 (catiónico).

De nuevo se repite en esta ocasión (gráfica 24) lo mencionado en el caso anterior, con una retención prácticamente nula de los ácidos por la resina catiónica, aunque en esta ocasión si que obtuvimos niveles medibles de ellos tras el lavado con ácido clorhídrico (gráfica 25).



Gráfica 25: Concentraciones (g/L) de ácido láctico y lactobiónico en la elución de la muestra 5 a pH=6 (catiónico).

Tabla 13: Resultados del intercambio catiónico de la muestra 5 a pH=5.6.

g láctico INICIALES	0,372
g lactobiónico INICIALES	0,181
g de láctico muestra	0,205
g de lactobiónico muestra	0,07
g de láctico elución	0,002
g de lactobiónico elución	0
g láctico recuperados	0,207
g lactobiónico recuperados	0,07
RENDIMIENTO LÁCTICO (%)	56
RENDIMIENTO LACTOBIÓNICO (%)	39

En este caso los rendimientos tras realizar el intercambio iónico con la membrana catiónica son mucho más bajos que en los casos anteriores, por lo que no estaríamos hablando de un proceso exitoso de purificación.

5. CONCLUSIONES

Una vez finalizado el proyecto y en vista a los resultados obtenidos, se extraen las siguientes conclusiones:

- El proceso de microfiltración es efectivo para la eliminación de biomasa de las muestras, si bien parte de los ácidos de interés quedan ligados a ésta, generando ligeras pérdidas.
- A la hora de operar con el equipo de microfiltración, es necesario realizar un completo drenaje entre muestras, para evitar interferencias en los resultados por existencia de restos anteriores.
- Es importante prolongar el proceso en el tiempo, para eliminar toda el agua posible de la muestra, y optimizar el proceso de filtrado, para evitar volúmenes muertos que consecuentemente acarrearán pérdidas de los ácidos.
- En el proceso de intercambio iónico con resina aniónica, se observa una mejora en el rendimiento para ambos ácidos en conjunto al operar a un pH=6, ya que a pH=5 el rendimiento del proceso o recuperación de ácidos es menor.
- El intercambio aniónico nos permite concentrar ácidos en menor volumen de muestra, lo cual es fundamental a la hora de buscar una posterior purificación y aislamiento.
- El intercambio catiónico se emplea para eliminar iones no deseados de la muestra, si bien también hay cierta pérdida de los ácidos de interés, ya que los rendimientos del proceso no son favorables.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. ADEPRO INGENIERÍA. Equipo de membranas (manual de utilización).
2. Alonso, S., Rendueles, M. & Díaz, M. Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. *Biotechnology Advances*, 31: 1275-1291.
3. Ataei, S. & Farahani, E. (2008). In situ separation of lactic acid from fermentation broth using ion exchange resins. *J. ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 1229-1233.
4. Baker, R.W. Encyclopaedia of Chemical Technology (1995). *Membrane Technology*.
5. Cao, X., Yun, H. & Koo, Y. (2002). Recovery of L-(+)-lactic acid by anion Exchange resin Amberlite IRA-400. *Biochemical Engineering Journal*, 11: 189-196.
6. Cheryan, M. (1998). Ultrafiltration and Microfiltration Handbook.
7. Coca, J. & Luque, S. (Eds.). (1999). Membrane Applications in the Food & Dairy Industry. Servicio de Publicaciones, Universidad de Oviedo.
8. González, I., Álvarez, S., Riera, F. & Álvarez, R. (2006). Purification of Lactic Acid from Fermentation Broths by Ion-Exchange Resins. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45: 3243-3247.
9. Gutiérrez, L., Hamoudi, S. & Belkacemi, K. (2012). Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. *International Dairy Journal*, 26: 103-111.
10. Gustalli, A.R. (2006). Estudio sobre la Aplicación de la Tecnología de Membranas para la Recuperación del Ácido Fosfórico de las Aguas de Lavado en el Proceso de Anodizado del Aluminio. Departamento de Ingeniería Química, Universitat de Barcelona.

11. López, A. (2014). Ion exchange with commercial and synthesized resins for sulfamides and thiocyanate retention in individual and multicomponent systems. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad de Oviedo.
12. McCabe, W., Smith, J. & Harriott, P. (2014). Operaciones unitarias en ingeniería química, 7ª Edición, McGraw-Hill.
13. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2005). Guía de Mejores Técnicas Disponibles en España del Sector Lácteo.
14. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2014). El sector lácteo español más allá de 2015.
15. Moldes, A., Alonso, J. & Parajó, J. (2001). Resin Selection and Single-Step Production and Recovery of Lactic Acid from Pretreated Wood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95: 69-81.
16. Nunes, S. & Peinemann, K. (2001). Membrane Technology in the Chemical Industry.
17. Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105: 1-14.
18. Parra, R.A. (2009). Lactosuero: Importancia en la industria de Alimentos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 62 (1): 4967-4982.
19. Quintero, J., Acosta, A., Mejía, C., Ríos, R. and Torres, A. (2012). Purification of lactic acid obtained from a fermentative process of cassava syrup using ion exchange resins.
20. López, S. (2009). Aplicación de la filtración tangencial en procesos de purificación (over view). FARMAESPAÑA INDUSTRIAL.

21. Tong, Y., Hirata, M., Takanashi, H., Hano, T., Kubota, F., Goto, M., Nakashio, F., & Matsumoto, M. (1998). Extraction of lactic acid from fermented broth with microporus hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, 143: 81-91.