

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral,
para la obtención del Grado Académico de: Doctor en Tecnología Química

**ESTUDIO DE LA INMOVILIZACIÓN DE LA β - GALACTOSIDASA
PARA LA REUTILIZACIÓN DE LA LACTOSA DEL SUERO DE
QUESERÍA**

Silvina Andrea Regenhardt

Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL – CONICET)

Directora de Tesis: Dra. Amelia C. Rubiolo

Codirector de Tesis: Dr. Enrique J. Mammarella

Miembros del Jurado de Tesis:

Dra. Nora Bértola

Dra. Graciela Vignolo

Dr. Oscar Iribarren

Año 2010

Quiero expresar mi sincera gratitud en primer lugar a mis directores la Dra. Amelia Rubiolo y el Dr. Enrique Mammarella por sus invalorable aportes para realizar este trabajo, dedicación y permanente quía, por el aliento y empuje constante.

A todos los compañeros y amigos del Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología por su aliento y ayuda constante; y en especial, a Daniel por su invalorable ayuda en el laboratorio y por haberme “soportado” incluso en los peores momentos.

A todos los integrantes del Departamento de Ingeniería Industrial, en especial los Dres. Germán Rosetti y Oscar Quiroga. A mi compañero de cátedra, el Dr. José Espinosa, por su constante aliento y por sus interesantes sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del Jurado por el esfuerzo de evaluar este trabajo.

A la Facultad de Ingeniería Química por no solo haberme brindado el espacio para alcanzar mi formación académica sino también por hacer posible el desarrollo de mis actividades en docencia.

Al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme apoyo financiero, mediante una Beca de Formación de Posgrado.

Un agradecimiento muy especial debo hacer al Ing. Mario Sad y al Dr. Pedro Morín por haber colaborado desinteresadamente y por haberme brindado su valioso tiempo.

A los Dres. Jorge Reinheimer y Gabriel Vinderola por iniciarme en la labor científica.

A Martín, mi esposo, por su cariño, incesante apoyo y estímulo durante todo este proceso. Por estar siempre a mi lado en los tiempos difíciles y también en las alegrías. A mis padres por haberme enseñado el valor del esfuerzo, sin ellos no hubiera llegado hasta aquí.

A mi amada hija, María Pilar que con su sonrisa me da las fuerzas para seguir adelante y no bajar los brazos.

A mis queridos amigos y todos aquellos que de alguna manera estuvieron identificados en la culminación de esta etapa.

Dedico este trabajo a mis padres y a mi familia.

En el presente trabajo se estudió la reacción de hidrólisis de la lactosa en conjunto con la concentración de proteínas en suero de quesería, empleando una preparación comercial de la enzima β -galactosidasa inmovilizada sobre una membrana plana comercial de ultrafiltración. El proceso enzimático asegura una alta especificidad en la reacción buscada cuando se trabaja con productos heterogéneos, como lo es el suero, y esto, sin modificar al resto de los componentes presentes. La inmovilización de la enzima permite su reutilización en un sistema continuo.

Se seleccionó una membrana de ultrafiltración de semejantes características a las utilizadas en las industrias lácteas. Se caracterizó una membrana plana comercial de polietersulfona de 10 kDa de tamaño de corte.

En los ensayos experimentales se estudiaron distintas condiciones de inmovilización covalente y multipuntual de la enzima en la membrana, en base a: concentración del agente activante (glutaraldehído) y agregado o no de inhibidores. Se establecieron las condiciones de inmovilización que mejor resultado mostraron en términos de actividad y estabilidad del biocatalizador.

Asimismo, se estudió la estabilidad térmica del biocatalizador obtenido ya que, un parámetro muy importante en la performance del sistema es la temperatura. El proceso de concentración de proteínas de suero por ultrafiltración se lleva a cabo, en general, a 55°C. Por otra parte, la temperatura óptima de la enzima comercial se encuentra alrededor de los 37°C. Se encontró que si bien la estabilidad del biocatalizador disminuye al alejarnos de la temperatura óptima, comparando los resultados con los de la enzima libre a 55°C, la estabilidad se incrementa considerablemente. A la enzima se caracterizó cinéticamente adoptando un modelo de

reacción del tipo Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto. Se determinaron las constantes cinéticas de la enzima utilizando soluciones de lactosa y permeado de suero. Además, no se encontraron diferencias entre las constantes cinéticas cuando se utiliza suero de quesería previamente acondicionado y permeado de suero.

Se modeló la variación temporal del flujo de permeado de ultrafiltración, para esto se exploraron diferentes modelos matemáticos disponibles en la literatura a fin de encontrar el que mejor representa nuestro sistema. También se estudió la variación del flujo de permeado con la temperatura a diferentes presiones de trabajo.

A partir del balance de materia en el reactor, se elaboró un modelo matemático que considera la variación temporal del flujo y la desactivación térmica de la enzima. El modelo incluye la estimación de las condiciones de reacción y el ensuciamiento de la membrana. Finalmente, el modelo completo fue corroborado con datos experimentales.

Los estudios realizados permitieron obtener un biocatalizador con rendimientos aceptables con la técnica de inmovilización empleada y un modelo matemático de un reactor tanque agitado continuo en estado transiente que incorpora la función que representa la disminución temporal del flujo debido a la concentración de proteínas.

1. Introducción y Objetivos.....	1
1.1. El suero de quesería.....	2
1.1.1. Obtención y caracterización del suero de quesería.....	2
1.1.2. Aprovechamiento industrial de los sueros lácteos.....	5
1.2. Obtención de jarabes edulcorantes.....	7
1.3. Enzimas para la hidrólisis de la lactosa.....	8
1.4. Inmovilización de enzimas.....	9
1.5. Reactores para la hidrólisis enzimática con la enzima inmovilizada.....	10
1.5.1. Reactores de membrana.....	12
1.6. Objetivos.....	15
1.6.1. Objetivo general.....	15
1.6.2. Objetivos particulares.....	15
2. Aspectos Generales.....	17
2.1. Caracterización del suero de quesería.....	18
2.1.1. Proteínas del suero.....	18
2.1.2. Lactosa.....	19
2.2. Recuperación de las proteínas de suero: Obtención de WPC.....	21
2.2.1. Membranas de Ultrafiltración.....	22
2.2.1.1. Membranas Sintéticas.....	24
2.2.1.1.1. Clasificación de las membranas sintéticas según su composición.....	24
2.2.1.1.2. Clasificación de las membranas sintéticas según su estructura.....	27
2.2.1.1.3. Clasificación de las membranas sintéticas según su forma.....	30
2.2.1.2. Polímeros utilizados para producir las membranas: Membranas de polietersulfona.....	32
2.2.2. Proceso de obtención del concentrado de proteínas de suero (WPC).....	34
2.2.2.1. Flujo a través de la membrana de Ultrafiltración.....	36
2.2.2.1.1. Características del ensuciamiento (fouling).....	37
2.2.2.1.2. Factores que afectan el flujo de permeado.....	38
2.2.2.1.2.1. Propiedades de la membrana.....	38
2.2.2.1.2.2. Propiedades del soluto.....	40

2.2.2.1.2.3. Parámetros operativos del proceso.....	42
2.3. Hidrólisis de la lactosa presente en el suero.....	44
2.3.1. Enzimas para la hidrólisis de la lactosa.....	44
2.4. Procesos de inmovilización de enzimas.....	48
2.4.1. Enzimas inmovilizadas como catalizadores en procesos químicos industriales.....	48
2.4.1.1. Mejora de las propiedades de las enzimas vía técnicas de inmovilización y post-inmovilización.....	51
2.4.2. Elección de los soportes.....	52
2.4.3. Métodos de inmovilización.....	54
2.4.3.1. Métodos de inmovilización reversibles.....	54
2.4.3.2. Métodos de inmovilización irreversibles.....	55
2.4.3.2.1. Entrampamiento.....	56
2.4.3.2.1. Formación de enlaces covalentes.....	56
2.4.3.2.2.1. Glutaraldehído en la inmovilización de proteínas.....	58
2.5. Reactores enzimáticos con enzimas inmovilizadas.....	59
2.5.1. Reactores de membrana.....	60
2.6. Cinética de la reacción de hidrólisis de la lactosa catalizada por la enzima β -Galactosidasa.....	63
2.6.1. Integración de la ecuación cinética en un intervalo de tiempo.....	65
2.6.2. Factores que afectan la cinética de las enzimas.....	66
2.6.2.1. Influencia del pH sobre la cinética de reacción.....	66
2.6.2.2. Influencia de la temperatura sobre la cinética de reacción... ..	67
2.6.2.3. Influencia de la presencia de efectores sobre la cinética de reacción.....	69
2.6.2.4. Efectos del proceso de inmovilización.....	70
2.6.2.4.1. Efectos en la actividad enzimática.....	70
2.6.2.4.2. Efectos sobre la estabilidad de la enzima.....	73
2.6.2.4.3. Pérdida de actividad y vida media de las enzimas inmovilizadas.....	75
3. Desarrollo del Modelo Teórico.....	78
3.1. Caracterización de la membrana de Ultrafiltración.....	79
3.1.1. Modelo de Hagen-Poiseuille.....	79

3.1.2. Modelo de transferencia de materia.....	81
3.1.3. Modelo de Resistencias.....	83
3.2. Modelos matemáticos del flujo de permeado.....	85
3.3. Hidrólisis de la lactosa presente en el suero de quesería.....	87
3.3.1. Estimación de los parámetros cinéticos.....	88
3.4. Desarrollo del modelo para el sistema estudiado.....	89
4. Materiales y Métodos Analíticos.....	95
4.1. Materiales.....	96
4.1.1. Sustrato.....	96
4.1.2. Selección de la membrana de ultrafiltración.....	96
4.1.2.1. Tamaño nominal de corte.....	96
4.1.3. Enzima.....	97
4.2. Métodos Analíticos.....	98
4.2.1. Determinación de la actividad de la enzima y grado de hidrólisis.....	98
4.2.2. Caracterización del flujo a través de la membrana.....	99
4.2.2.1. Ensuciamiento de la membrana.....	100
4.3. Reactor de membrana.....	101
4.3.1. Unidad de reacción y separación.....	101
4.4. Preparación y caracterización biocatalizador.....	102
4.4.1. Activación de la membrana.....	102
4.4.2. Inmovilización covalente de la enzima.	103
4.4.3. Efectividad del proceso de inmovilización y determinación de la cantidad de enzima ligada.....	103
4.4.4. Ensayos de permeación.	104
4.4.5. Ensayos de hidrólisis.	104
4.4.6. Ensayos de estabilidad térmica a 55 °C.....	105
4.5. Determinación de las constantes cinéticas para la enzima libre e inmovilizada en la membrana.....	106
4.5.1. Usando lactosa como sustrato.....	106
4.5.2. Usando permeado como sustrato.....	107
4.6. Estudio del comportamiento del biocatalizador en el reactor.....	107

4.6.1 Variaciones de los parámetros cinéticos.....	108
4.6.2. Estimación de la constante de desactivación de los biocatalizadores.....	109
5. Resultados y Discusión.....	110
5.1. Caracterización de las resistencias de la membrana al flujo.....	111
5.1.1. Resistencia de la membrana en función de la presión transmembrana aplicada.....	111
5.1.2. Flujo de filtrado de suero en función de la presión transmembrana.....	112
5.2. Estimación del modelo de flujo de permeado.....	114
5.3. Inmovilización de la enzima en la membrana.....	118
5.4. Estabilidad Térmica del Biocatalizador.....	120
5.4.1. Estimación de la constante de pérdida de actividad de los biocalizadores	120
5.5. Efectividad del proceso de inmovilización de la enzima a 55°C.....	123
5.6. Estimación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis-Menten.....	124
5.6.1. Determinación de las constantes cinéticas para la enzima inmovilizada en la membrana para soluciones de lactosa y permeado de suero de quesería.....	125
5.6.2. Estimación de la constante de pérdida de actividad del biocatalizador.....	127
5.7. Validación del modelo teórico.....	127
5.8. Estudio del sistema bajo diferentes condiciones de operación.....	129
5.8.1. Curvas de Productividad.....	130
5.8.1.1. Curvas de productividad en función de S_0 y la presión a distintas temperaturas.....	132
5.8.1.2. Curvas de productividad en función de S_0 y la temperatura a distintas presiones.....	133
5.8.2. Curvas de Conversión.....	134
6. Conclusiones	137
6.1. Con respecto al modelo del flujo de permeado.....	138
6.2. Con respecto a la inmovilización de la enzima en la membrana.....	138
6.2.1. Estabilidad térmica del biocatalizador.....	139
6.2.2. Con respecto a la estimación de los parámetros cinéticos.....	139
6.3. Estabilidad Térmica del biocatalizador.....	140
6.3.1. Con respecto a la producción.....	140
6.3.2. Con respecto a las conversiones.....	140

6.3.3. Conclusión final del modelo.....	141
Anexo 1.....	142
A.1.1. Datos experimentales para la determinación de las constantes cinéticas para soluciones de lactosa.....	143
A.1.2. Datos experimentales para la determinación de las constantes cinéticas para permeado de suero de quesería.....	144
Anexo 2.....	145
A.2. Algoritmo para estimar las constantes cinéticas para soluciones de lactosa y permeado de suero de quesería.....	146
Anexo 3.....	148
A.3.1. Datos experimentales de caudal de permeación usando suero de quesería a 55°C...	149
A.3.2. Caudales iniciales a distintas temperaturas.....	150
Anexo 4.....	151
A.4. Rutinas de cálculo en Matlab.....	152
A.4.1. Rutina para graficar los flujos de permeado a distintas temperaturas y presiones para el tiempo total de operación.....	152
A.4.2. Rutina para el cálculo de conversiones de lactosa.....	153
A.4.3. Subrutina para cargar la ecuación diferencial que debe ser integrada.....	155
Anexo 5.....	157
A.5. Datos para validar el modelo matemático de Reacción-Concentración.....	158
A.5.1. Condiciones experimentales.....	158
A.5.2. Datos experimentales.....	158
Anexo 6.....	159
Anexo 7.....	164
A.7.1. Rutina de MATLAB el cálculo de productividades.....	165
A.7.2. Subrutina para cargar la ecuación diferencial que debe ser integrada.....	166
Anexo 8.....	167
A.8.1. Curvas de Productividad en función de S_0 y la presión a distintas temperaturas.....	168
A.8.2. Curvas de Productividad en función de S_0 y la Temperatura a distintas presiones.....	168
Nomenclatura.....	170
Referencias Bibliográficas.....	174



Capítulo 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. El suero de quesería

1.1.1. Obtención y caracterización del suero de quesería

La producción lechera en Argentina es muy importante y se encuentra en permanente crecimiento. Datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA) muestran que la misma se ha incrementado desde los 5 mil millones de litros en 1983 hasta aproximadamente 10 mil millones de litros en 2008.

Actualmente el 43% de la producción de leche se destina a la actividad quesera, el 14% se destina a leche en polvo, el 29% a leche fluida, pasteurizada y esterilizada, y el 14% restante a otros productos.

Las principales provincias productoras de leche, según la SAGPyA (2007), en Argentina son Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y La Pampa como se informa en la Figura 1.1. Allí se encuentran las principales cuencas lecheras y casi la totalidad de los tambos e industrias del sector.

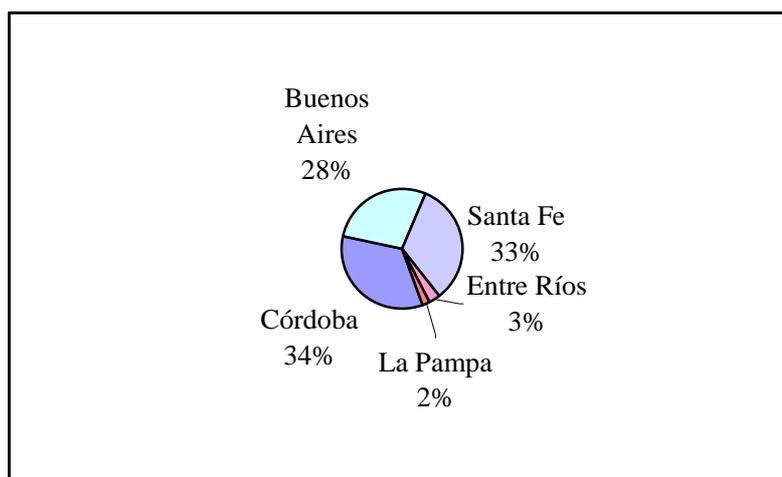


Figura 1.1. Producción por provincias (% del total de litros, año 2007).

A diferencia de otras actividades industriales mucho más concentradas, la lechería argentina está muy distribuida espacialmente, tanto en el nivel primario como secundario, en especial en las provincias de Santa Fe y Córdoba, donde las plantas de elaboración de productos lácteos y las empresas agropecuarias lecheras constituyen el soporte laboral y el generador de recursos económicos claves para el desarrollo zonal y regional.

En relación con la actividad industrial, existe una diferencia significativa en cuanto a capacidad instalada entre las tres provincias más importantes y el resto. Al respecto, la provincia de Santa Fe presenta un claro liderazgo, no sólo por su mayor capacidad de procesamiento, sino también por el mayor tamaño de las plantas promedio.

En términos de fracciones relativas del consumo nacional de leche, se caracteriza por ocupar el primer lugar la cantidad empleada para la obtención de quesos, con alta participación especialmente de variedades como pategrás, barra o dambo, cuartirolo/cremoso y algunos tipos de quesos de pasta dura (SAGPyA, 2008)

La leche fluida ocupa el segundo lugar en el consumo nacional y se destaca por el crecimiento que ha presentado la participación de la leche del tipo “larga vida”.

La leche en polvo (entera y descremada), aunque se produce en cantidades significativas, tiene como principal destino la exportación.

Como antes se mencionó, la elaboración de quesos ocupa un lugar sumamente importante en la producción argentina de lácteos y por lo tanto grandes volúmenes de suero son generados. El suero de quesería es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración de quesos. Se obtiene tras la separación de la caseína y

grasas, además constituye casi el 90% del volumen de la leche y contiene los compuestos hidrosolubles de la misma. Se ha estimado que por cada kilogramo de queso producido se obtienen entre 9 y 10 litros de suero. El mismo está compuesto por: agua, vitaminas hidrosolubles, proteínas y principalmente por lactosa.

Los sueros lácteos, procedentes de quesería, se dividen en dos categorías:

- Sueros ácidos, que se producen en su mayor parte en la fabricación de caseína por la incorporación de un ácido que produce su coagulación. Presentan una acidez muy elevada que puede llegar a 120° Dornic. La concentración de lactosa es de 60%, expresado en 100 g de sustancia seca.

- Sueros dulces, obtenidos por la elaboración de quesos de pasta prensada, utilizando para la coagulación, cuajo, quimosina, u otros tipos como pueden ser los cuajos de hongos o vegetales. Presentan una acidez no muy elevada, comprendida entre 5 a 26° Dornic. La concentración de lactosa es del 70-75%, expresado en 100 g de sustancia seca y la presencia del ácido láctico es menor que en los sueros ácidos (Fox, 1987).

En nuestro país se producen anualmente alrededor de 500 mil toneladas de quesos, según lo informado por la SAGPyA en estadísticas del 2007. De lo anterior se deduce que la cantidad de suero producido se encuentra cerca de los 5 millones de litros. El mismo posee una demanda biológica de oxígeno (DBO) de aproximadamente 35 g O₂/lt (Hobman, 1984). Más del 90% de esta DBO se debe a la lactosa.

La mitad del suero producido mundialmente es utilizado para nutrición animal y humana, mientras que el resto se la considera como un desperdicio de difícil recuperación (Novalin y otros, 2005).

La eliminación de los sueros lácteos en los ríos está prohibida legalmente (verter un litro de suero supone la muerte por asfixia de los peces contenidos en 10 toneladas de agua), por lo tanto hay que seguir dos caminos:

- aprovechamiento integral del suero
- depuración: tratamiento como efluente

La depuración es muy cara y las industrias queseras pequeñas no pueden soportar esta carga existiendo una elevada cantidad de industrias queseras de pequeño tamaño. Por otra parte, el agua residual depurada biológica y mecánicamente, siempre aporta sustancias residuales como lo son las sales minerales que contaminan los ríos.

1.1.2. Aprovechamiento industrial de los sueros lácteos

El suero lácteo, tiene un constituyente mayoritario, el agua: 94-95%, todos los procesos industriales actuales se limitan a la eliminación del agua, recoger las sales minerales, cristalizar la lactosa y recuperar en su total valor biológico las proteínas de los sueros sin alterar sus cualidades.

Para este fin se debe proceder a una precipitación de las proteínas o la separación de las mismas a través de membranas (ultrafiltración, ósmosis inversa), obteniéndose en ambos casos dos fracciones importantes:

- 1) Concentrado proteico.
- 2) Permeado

La fracción proteica está compuesta por β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, inmunoglobulinas, seroalbúmina, enzimas nativas, aminoácidos, urea, creatina, ácidos

nucleicos y amoníaco. Su utilización abarca a la industria farmacéutica y alimenticia. El permeado es el subproducto resultante del proceso de concentración de proteínas para obtener un producto de alto valor agregado conocido como WPC (Whey Protein Concentrate). El permeado residual es rico en agua, lactosa y minerales; y aún representa un problema ambiental.

En la actualidad se trabaja en una gran variedad de experiencias, que proponen distintas opciones para utilizar el permeado, entre ellas se pueden citar:

- Obtención de proteínas unicelulares.
- Producción de fermentos.
- Utilización del suero como fertilizante.
- Producción de ácido láctico.
- Recuperación de la lactosa
- Hidrólisis de la lactosa para obtención de jarabes edulcorantes.

El estudio de bioprocesos para el aprovechamiento de la lactosa como recurso, con la generación de productos de mayor valor agregado, ha constituido un objetivo de muchos investigadores en las últimas décadas.

Una interesante posibilidad para el aprovechamiento del permeado es la producción de jarabes de lactosa hidrolizada, obteniéndose glucosa y galactosa, dos monosacáridos con mayor poder edulcorante y más solubles que la lactosa (Zhou y Dong-Chen, 2001). Este cambio en las propiedades permite el uso de los jarabes de glucosa–galactosa en un gran número de aplicaciones.

1.2. Obtención de jarabes edulcorantes

La lactosa al hidrolizarse forma glucosa y galactosa. Este hidrolizado presenta ciertas características que lo hacen más interesante: el poder edulcorante combinado es aproximadamente el 80% del de la sacarosa, es unas 3 ó 4 veces mas soluble que la lactosa y además los monosacáridos son absorbidos fácilmente en forma directa por la mucosa digestiva (Zadow, 1984).

Por lo antes mencionado, se puede decir que la hidrólisis de la lactosa resulta un proceso atractivo ya que: un porcentaje significativo de la población mundial es intolerante a la lactosa, por lo que no pueden beber leche sin sufrir problemas gastrointestinales (Barnes, 1994; Walter y Smith, 1988; Lloyd-Still, 1979; Greene, 1982); por otra parte, la lactosa es un azúcar relativamente insoluble (aproximadamente 10 veces menos que la sacarosa) y cristaliza durante su almacenamiento, especialmente si está concentrada; y por último, la producción de quesos deja como principal subproducto, como ya se mencionó, grandes cantidades de suero con alta concentración de lactosa. La hidrólisis de la lactosa contenida en el suero de quesería brinda la posibilidad de aprovechar una importante fuente de carbono.

La hidrólisis de la lactosa se puede realizar mediante ácidos fuertes, resinas de intercambio iónico o empleado enzimas, siendo este último método el que asegura un proceso de hidrólisis sin afectar los otros componentes presentes. Teniendo en cuenta estas características en la literatura se indica al método enzimático como el más conveniente para la industria alimenticia (Ladero y otros, 2000). La enzima utilizada para la hidrólisis de lactosa se denomina β -galactosidasa o más comúnmente lactasa.

1.3. Enzimas para la hidrólisis de la lactosa

Las principales fuentes comerciales de la enzima β -galactosidasa son los microorganismos: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Escherichia coli*. Las preparaciones de lactasa pura se obtienen a partir de *Escherichia coli*, *Candida pseudotropicalis*, *Zymomonas mobilis*, *Sacharomyces anemesis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* y hongos. Las lactasas obtenidas de *Escherichia coli*, *Candida pseudotropicalis* y *Zymomonas mobilis* se utilizan mayoritariamente en química analítica. Entre las lactasas obtenidas de *Kluyveromyces*, la lactasa de la levadura *Kluyveromyces lactis* es por el momento la más utilizada a escala comercial. Las condiciones óptimas de acción de las lactasas de *Kluyveromyces* (35-40 °C, pH 6.6-7.3) son similares a las condiciones de la leche, por lo que son muy útiles en el tratamiento de ésta y de sueros no ácidos (Mahoney y Adamchuk, 1980).

Bajo ciertas condiciones, la β -galactosidasa cataliza la formación de oligosacáridos, llegando en algunos casos hasta el 40% del contenido total de azúcar en solución, dependiendo de la fuente de la enzima y de las condiciones de reacción, resultando importante lograr disminuir este efecto para aprovechar al máximo el poder edulcorante del producto resultante.

Las enzimas pueden catalizar reacciones en diferentes estados: como moléculas individuales en solución, en agregados con otras sustancias e inmovilizadas sobre superficies.

1.4. Inmovilización de enzimas

El estado “inmovilizado” resulta de gran interés para explotar el uso de las enzimas para propósitos industriales. El término “enzimas inmovilizadas” se refiere a “enzimas que han sido físicamente confinadas o localizadas en cierta región definida en el espacio reteniendo su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidas veces y/o en sistemas de operación continua”. La incorporación de catalizadores inmovilizados, en ciertos casos ha mejorado tanto el desempeño técnico de los procesos industriales así como también su rendimiento (Brena y Batista-Viera, 2006).

El principal objetivo de la inmovilización de enzimas es su reutilización en los procesos industriales para que dichos procesos sean económicamente factibles. A pesar de sus excelentes propiedades catalíticas, las enzimas presentan otras características que las hacen no apropiadas para su uso en la industria: baja estabilidad, inhibición a altas concentraciones de sustrato o producto, baja actividad y selectividad. La posibilidad de mejorar estas características indeseables a través del diseño de protocolos de inmovilización es un gran desafío. Existen gran cantidad de protocolos de inmovilización de enzimas, pero pocos de ellos son muy simples y/o capaces de mejorar las características de las enzimas (Guisan, 2006).

Respecto del método de inmovilización, resulta muy difícil a priori, definir la conveniencia de uno u otro en una aplicación específica. Por lo tanto, para cada aplicación se debe encontrar un procedimiento de inmovilización sencillo y económico con el que se obtenga un producto que conserve la actividad y que tenga elevada estabilidad operacional (Wiseman, 1991).

La enzima β -galactosidasa obtenida de distintas fuentes, ha sido inmovilizada con relativo éxito en una gran variedad de soportes a escala de laboratorio: en soportes inorgánicos, colágeno, agarosa, así como en geles de poliacrilamida y fibras de acetato de celulosa (Okos y otros, 1978; Hannibal-Friedrich y otros, 1980; Bernal y Pavel, 1985; Siso, 1993; Wang y Ruckenstein, 1993; Carrara y Rubiolo, 1994). El soporte a utilizar, el método de inmovilización escogido y la aplicación que se le dé a la preparación influyen en la elección de la fuente enzimática (Roberts, 1977).

1.5. Reactores para la hidrólisis enzimática con la enzima inmovilizada

La forma más común para llevar a cabo una reacción enzimática es usando un reactor discontinuo agitado.

A continuación se resumen los principales trabajos publicados sobre procesos con enzimas inmovilizadas en reactores enzimáticos:

- ~ Bódalo y otros (2005) formularon un modelo matemático que puede ser aplicado para el diseño y simulación de un proceso enzimático homogéneo en un reactor de membrana de ultrafiltración; para su validación se utilizó N-acetil-DL-butilina catalizada por L-aminoacilasa.
- ~ López y otros (2002) realizaron una revisión de los reactores enzimáticos aplicados al tratamiento de aguas residuales.
- ~ Gan y otros (2002) diseñaron un reactor con membrana para la hidrólisis de la celulosa. Estos trabajos sirven de base para fijar algunos lineamientos de los futuros estudios.

- ~ Jurado y otros (2006) han estudiado el modelo cinético para la hidrólisis de la lactosa con β -galactosidasa en un reactor tanque agitado continuo (RTAC) y en un biorreactor con recirculación con membrana de fibra hueca (RHFR). La actividad enzimática fue menor en el RHFR que en el RTAC probablemente debido a la adsorción de la enzima en la membrana y/o por cambios estructurales de la enzima.

- ~ Calabró y otros (2002) estudiaron el comportamiento de un biorreactor con membrana de fibra hueca desde el punto de vista teórico. El modelo obtenido se basa en la obtención de una solución numérica de las ecuaciones de balance de transferencia de masa que gobiernan el sistema. La reacción cinética fue modelada con la ecuación de Michaelis-Menten modificada por una posible inhibición por sustrato y producto.

- ~ Roy y otros (2003) inmovilizaron la β -galactosidasa en esferas de celulosa utilizando epíclorhidrina como agente ligante. Obtuvieron la preparación óptima caracterizando los parámetros cinéticos. En el reactor de lecho fluidizado la lactosa fue hidrolizada en 5 horas en comparación a las 48 horas que fueron necesarias por la misma enzima en un reactor continuo batch. Además, se observó que la enzima puede ser reutilizada tres veces más sin modificar su eficacia en el reactor de lecho fluidizado.

- ~ Giorno y Drioli (2000) indican que el uso de reactores de membrana continuos para la hidrólisis de la lactosa (presente tanto en leche como en suero de quesería) es una técnica de muy buen desempeño. La conversión de la lactosa y la recuperación de las proteínas de alto peso molecular pueden realizarse en un solo paso utilizando la β -galactosidasa inmovilizada en un reactor de membrana. También señalan la falta de información al respecto, significando esto un tema de gran interés para su estudio.

~ Hatzinikolaou y otros (2005) desarrollaron un modelo para la hidrólisis y ultrafiltración simultáneas de permeado de suero de quesería utilizando la enzima β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus niger*. El método se ajustó satisfactoriamente para predecir el comportamiento del sistema a escala de laboratorio. Para plantear las ecuaciones matemáticas se supuso: el volumen muerto en las cañerías y en la unidad de ultrafiltración (UF) se considera despreciable frente al volumen del reactor; el pasaje de la mezcla reaccionante por la unidad de UF no modifica la concentración de los compuestos de bajo peso molecular (lactosa, glucosa y galactosa); no se pierde enzima en la unidad de UF; la desactivación de la enzima en el sistema sigue una cinética de primer orden y la constante de desactivación es función de la temperatura de proceso; la hidrólisis de la lactosa catalizada por β -galactosidasa sigue una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa. El modelo fue finalmente utilizado en numerosas simulaciones en computadora para investigar el efecto de los parámetros involucrados.

Por lo antes expuesto se puede concluir que ha habido algunos intentos de usar enzimas inmovilizadas para el desarrollo de procesos continuos de hidrólisis y que simultáneamente al desarrollo de la tecnología de ultrafiltración por membranas, han surgido dos nuevos tipos de reactores continuos: el reactor enzimático de fibra hueca de flujo pistón y el reactor continuo agitado de membrana.

1.5.1. Reactores de membrana

Esta configuración, que utiliza la diferencia de peso molecular entre la enzima y el producto, solventa muchos de los problemas del proceso discontinuo y de la técnica

de enzimas inmovilizadas e implica el uso de la tecnología de membranas. La enzima, en forma soluble, queda retenida a un lado de la membrana, donde es puesta en contacto con el sustrato, mientras que el producto debe ser lo suficientemente pequeño para permear a través de la membrana (Cheryan y Mehaia, 1986)

Los biorreactores de membrana se clasifican normalmente de acuerdo a las condiciones de mezcla y del método de retención de la enzima, así tenemos:

- ~ Reactores de flujo pistón o de fibra hueca, donde el biocatalizador es inmovilizado o atrapado en un lado de la membrana, normalmente el lado de la carcasa.
- ~ Reactores continuos de membrana agitados, donde el biocatalizador y el sustrato se encuentran mezclados en el recipiente de reacción y el producto se recoge a través de la membrana. Este tipo de biorreactor puede convertir sustratos de alto peso molecular (como carbohidratos y proteínas).

Esta clasificación puede ser subdividida a su vez en los sistemas de celda o de recirculación. En la configuración en celda, la celda se carga con la enzima y el sustrato es continuamente alimentado bajo presión mientras que el permeado es continuamente retirado a través de la membrana. La agitación, para eliminar concentración por polarización, es suministrada mediante agitación magnética.

El reactor continuo de membrana agitado se diferencia del de celda en el hecho de que el módulo de membrana está físicamente separado del recipiente de reacción. Un reactor de este tipo está acoplado en un lazo semicerrado mediante una bomba con el módulo de ultrafiltración. El contenido del recipiente de reacción es continuamente bombeado a través de la membrana y reciclado al recipiente. El corte molecular de la membrana debe ser lo suficientemente bajo para retener la enzima pero lo

suficientemente grande para permitir al producto permear a través de los poros y salir del sistema. El volumen total del sistema se mantiene constante igualando el caudal de entrada de sustrato con el flujo de permeado. Puesto que la mayoría de las enzimas están en el rango entre 10 y 100 kDa, se usan membranas de estos cortes de peso molecular.

Las mayores ventajas en el uso de este reactor son:

- ~ Permite el uso de enzimas solubles en contacto total con el sustrato, evitando problemas típicos de los reactores de enzimas inmovilizadas como pérdida de actividad y problemas de difusión.
- ~ Facilita el control sobre el peso molecular del producto mediante la elección de la membrana con un corte adecuado.
- ~ Alta conversión de sustrato, atribuida a la continua retirada de productos terminales inhibidores.
- ~ Flexibilidad operacional debida a la separación entre el recipiente de reacción y la membrana.
- ~ El sistema puede ser a menudo modelado como un reactor continuo mezcla completa. Así la concentración del producto a la salida del reactor será igual a la concentración de producto en el reactor.
- ~ Alta productividad y capacidad debido a la operación continua y a la reutilización de la enzima.

Sin embargo, el reactor de membrana tiene las siguientes limitaciones:

- ~ Pérdida de actividad enzimática debido a inactivación térmica, autodigestión, fuga de enzima y efectos de corte debido a altos caudales de recirculación de la mezcla de reacción (Cheryan y Deeslie, 1980).
- ~ Reducción del flujo de permeado debido a concentración por polarización o a colmatación de la membrana.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Como objetivo general de este trabajo de tesis, se plantea obtener un biocatalizador con actividad β -galactosidasa inmovilizada sobre membranas a partir de preparaciones comerciales de la enzima de *Kluyveromyces fragilis* para la hidrólisis de lactosa en suero dulce y modelar la reacción enzimática en el proceso de un módulo de ultrafiltración.

1.6.1. Objetivos particulares

Entre los objetivos particulares se busca:

- ~ Encontrar las condiciones óptimas de inmovilización de la enzima en la membrana en términos de mejor rendimiento en el proceso de hidrólisis de la lactosa.
- ~ Determinación de los parámetros cinéticos específicos del biocatalizador utilizando como sustrato soluciones de lactosa y de permeado de suero de quesería.
- ~ Encontrar un modelo matemático que represente la variación temporal del flujo de permeado y por lo tanto el ensuciamiento de la membrana como resultado de la concentración de las proteínas presentes en el suero.

- ~ Desarrollar de un modelo matemático del reactor, a partir de las ecuaciones de balance del mismo que contemple la pérdida de actividad del catalizador en este sistema y el ensuciamiento de la membrana.

- ~ Validar el modelo propuesto con datos experimentales.

- ~ Estimar las mejores condiciones de operación a partir de simulaciones del modelo.



Capítulo 2

ASPECTOS GENERALES

2.1. Caracterización del suero de quesería

Existen dos tipos de sueros de queso: el suero dulce (proveniente de la elaboración de quesos por adición de cuajo con pH por encima de 5.6) y el suero ácido (producto de los quesos obtenidos por acidificación con pH alrededor de 4.6). En la Tabla 2.1 se muestran las composiciones porcentuales características de cada uno de estos sueros.

Tabla 2.1 Composición porcentual característica del suero

Compuesto	Suero Dulce	Suero Ácido
Agua	93 – 94%	94 – 95%
Extracto Seco	6 – 7%	5 – 6%
Lactosa	4.5 – 5.0%	3.8 – 4.2%
Ácido Láctico	Vestigios	0.8%
Proteínas	0.8 – 1.0%	0.8 – 1.0%
Ácido Cítrico	0.1%	0.1%
Cenizas	0.5 – 0.7%	0.5 – 0.7%

Como puede observarse en la tabla anterior, los sueros contienen dos compuestos con alto valor nutricional: lactosa y proteínas de suero.

2.1.1. Proteínas del suero

Alrededor del 20% de las proteínas presentes en la leche bovina corresponden al grupo de las proteínas llamadas “proteínas del suero” (McSweeney, 1998). Las **proteínas del suero de leche** (conocida del inglés como **whey proteins**) es una

colección de proteínas globulares. Desde el punto de vista químico es una mezcla de proteínas como la β -lactoglobulina (~65%), la α -lactoalbúmina (~25%), y la seroalbúmina (~8%), todas ellas solubles en agua en sus formas nativas independientemente del pH de la solución. El suero de leche posee las proteínas de mayor valor biológico (VB) conocido, es decir que las proteínas contenidas se transforman en un alto porcentaje en proteína muscular durante las actividades metabólicas (McDonough y otros 1974).

Varios estudios han demostrado de forma consistente que productos formulados con proteínas y que contienen una proporción más elevada de proteínas del suero / caseína son más tolerados por el organismo debido a su capacidad de pasar más rápidamente por el estómago. Esta propiedad tiene implicancias significativas para situaciones de cuidados intensivos, en que la disponibilidad de nutrientes en el intestino es de importancia vital para auxiliar en el proceso de recuperación. Fórmulas que contienen proteína del suero reducen el tiempo de vaciamiento gástrico y, en consecuencia, el riesgo potencial de reflujo gastro-esofágico.

Diversos estudios también han comprobado la capacidad que tienen las fórmulas a base de proteína del suero de ayudar a modular los patrones de movimiento intestinal y regular la consistencia de las heces (diarrea o estreñimiento) en situaciones críticas que exigen cuidados intensivos.

2.1.2. Lactosa

La lactosa es el único glúcido libre que existe en cantidades importantes y en proporción constante en todas las leches (aproximadamente 40% de los sólidos de la

leche de vaca). Posee una estructura química simple, es menos dulce y soluble que la sacarosa y no siempre es posible ser digerida por el organismo humano.

La lactosa, 4-O-(β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa), es una hexobiosa de fórmula condensada $C_{12}H_{22}O_{11}$, con un peso molecular de 342 g/g-mol. Existe bajo dos formas isómeras: α y β , que se diferencian únicamente en la posición de un grupo -OH en el carbono C_1 de la glucosa (isomería ciclánica) (Figura 2.1).

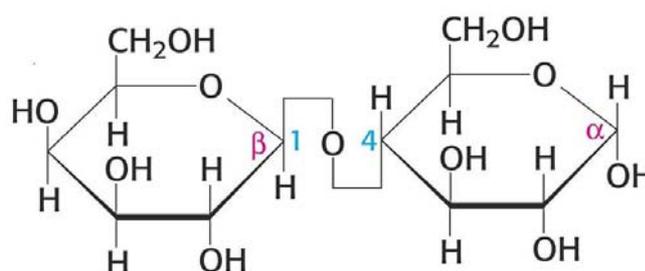


Figura 2.1 Estructura molecular de la lactosa

Además, se conoce la forma hidratada $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$. La lactosa está, por lo tanto formada por la unión de una molécula de β -galactosa y una molécula de glucosa α o β . Debe destacarse que la lactosa es un azúcar relativamente poco soluble: unas 10 veces menos que el azúcar ordinario. La solubilidad de la lactosa aumenta con la temperatura (Figura 2.2). Por tanto, cristaliza al enfriar sus soluciones concentradas. Con la lactosa no se pueden obtener jarabes espesos ni confituras estables a la temperatura ordinaria. Las soluciones concentradas de lactosa quedan en estado de sobresaturación durante la refrigeración; a 25°C la solubilidad límite de la lactosa es de 22 g por 100 ml de agua, por lo que una solución de lactosa con 50 g por 100 ml de agua, enfriada a esa temperatura, comienza a cristalizar naturalmente.

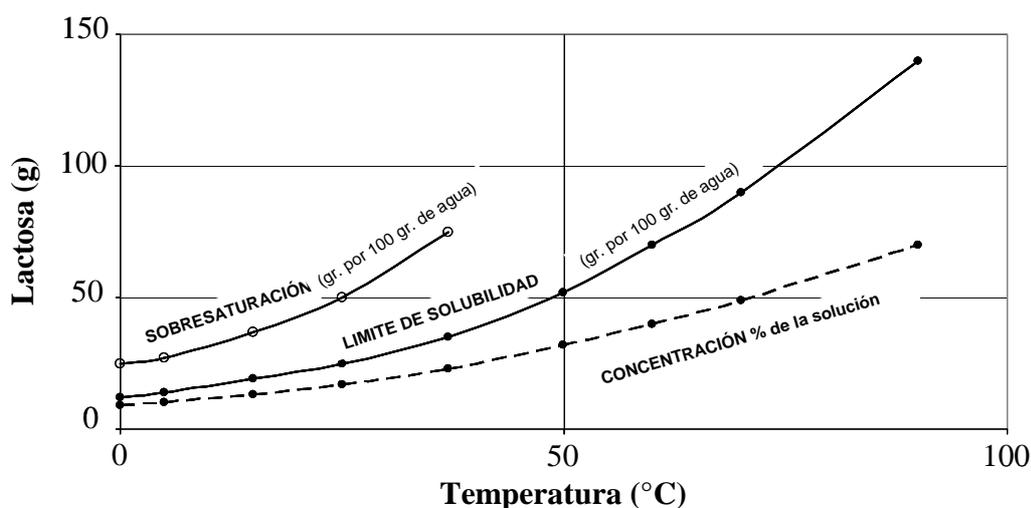


Figura 2.2 Solubilidad de la lactosa

2.2. Recuperación de las proteínas de suero: Obtención de WPC

Un buen ejemplo de la aplicación de la tecnología de membranas, y de la ultrafiltración en particular, es el proceso de recuperación de las proteínas del suero de quesería. Existe una gran variedad de membranas comerciales disponibles. De acuerdo al tamaño de las moléculas que se desean separar tenemos diferentes aplicaciones. En la Figura 2.3 se muestran los diferentes procesos de separación de acuerdo a los tamaños moleculares.

Las proteínas de suero de interés presentan los siguientes tamaños moleculares:

- β -lactoglobulina: 18 kDa
- α -lactoalbúmina: 14 kDa

Si miramos estos valores podemos concluir que nos encontramos en rango de tamaños que corresponde al proceso de Ultrafiltración (UF) teniendo en cuenta que para

separar a estas proteínas nos interesa hacerlo por tamaño y utilizar un proceso que pueda realizarse a escala industrial.

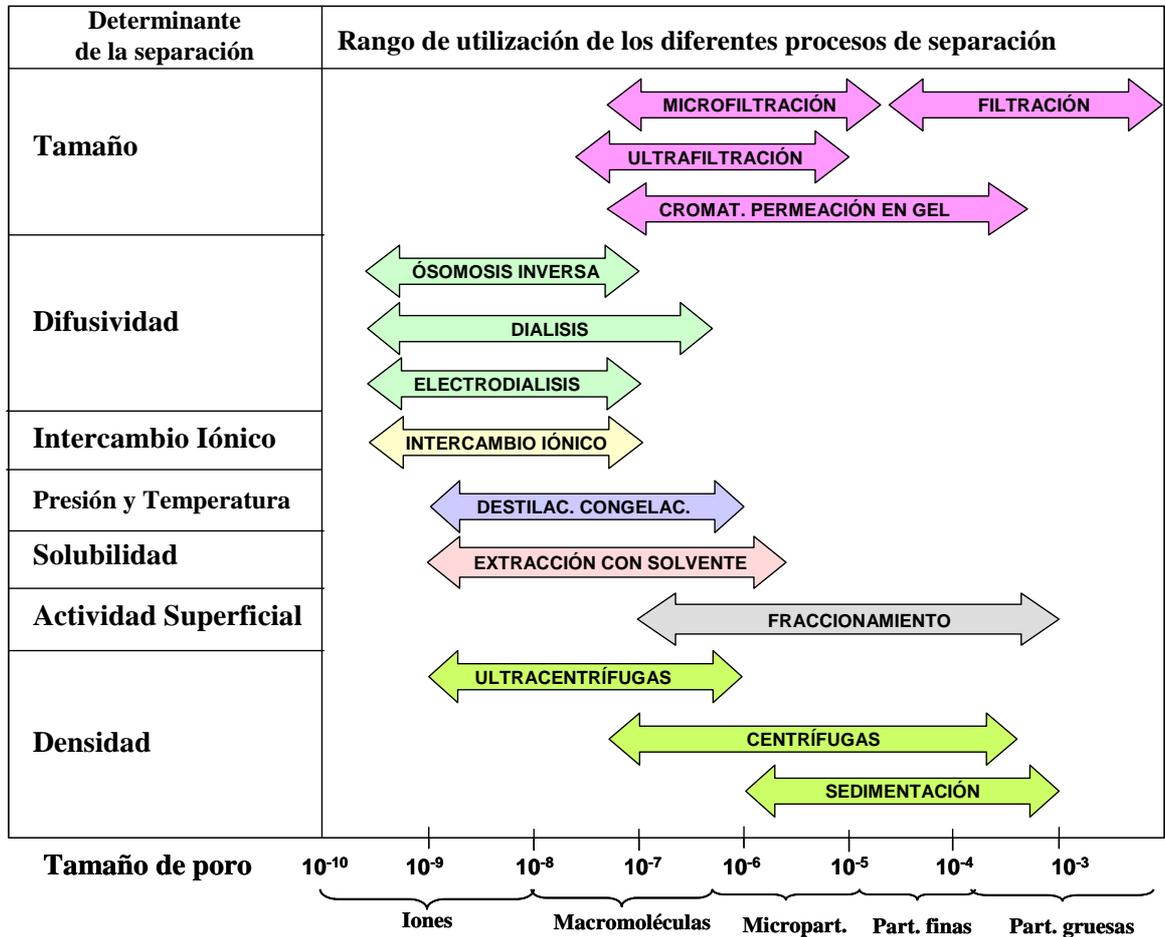


Figura 2.3. Procesos de separación de acuerdo con los tamaños moleculares

2.2.1. Membranas de Ultrafiltración

Una vez definido el proceso que se utilizará para la separación de las proteínas, debemos elegir el tipo de membrana que mejor se adapte a las condiciones deseadas. Existen en el mercado una gran variedad de membranas de ultrafiltración. A continuación se muestran las diferentes clasificaciones de las membranas.

Una clasificación posible toma como punto de partida cuatro enfoques distintos: su naturaleza, su estructura, su mecanismo de transferencia de materia y sus posibilidades de aplicación (Tabla 2.2). Esta clasificación es general para todas las membranas independientemente de cuál sea el proceso en estudio. En el caso particular de la UF, sabemos que la fuerza impulsora es la diferencia de presión, teniendo también en común que el proceso de selección viene determinado sólo por el tamaño de poro de la membrana (tamaños de poros diferentes y por tanto rangos de presiones distintas). En la *ultrafiltración* se trabaja con diferencias de presión entre 2 y 10 bares, y los materiales que atraviesan la membrana son los disolventes, los iones y las moléculas de bajo peso molecular.

Tabla 2.2. Clasificación de las membranas utilizadas en ultrafiltración

NATURALEZA	Biológicas		
	Sintéticas	Inorgánicas	Metales De vidrio Cerámicas
		Orgánicas	Porosas Densas
		Mixtas	
ESTRUCTURA	Estructura Microscópica	Porosidad	Densas Porosas (homo y heteroporosas)
		Configuración	Simétricas Asimétricas
		Líquidas	Soportadas No soportadas
	Estructura Macroscópica	Laminares Tubulares Fibras huecas	
	Densas		

2.2.1.1. Membranas Sintéticas

En la actualidad, existe una gran variedad de membranas sintéticas que han ido evolucionando en función de los materiales y las técnicas utilizados en su fabricación, con el fin de ir mejorando su comportamiento para una determinada operación de separación. Las membranas sintéticas a su vez se clasifican en varias categorías, de acuerdo a su composición (material utilizado para su fabricación), función, estructura y forma:

Composición: inorgánica, orgánica o polimérica y mixta.

Función: separación de gases, destilación de agua, diálisis, ultrafiltración, microfiltración, electrodiálisis, etc.

Estructura (referido a la microestructura en su corte transversal): homogénea, asimétrica o compuesta.

Forma: plana, fibra hueca, tubular o un revestimiento.

2.2.1.1.1. Clasificación de las membranas sintéticas según su composición

a) Membranas Inorgánicas:

Se caracterizan por poseer una gran estabilidad química, mecánica y térmica sensiblemente mayor que las poliméricas.

Se pueden distinguir tres tipos diferentes de membranas inorgánicas: membranas metálicas, de vidrio y cerámicas.

Las principales características de las membranas inorgánicas son su alta estabilidad térmica, mecánica y química. Son capaces de soportar temperaturas de hasta

800 °C, límite muy por encima del de las membranas orgánicas, las cuales, como mucho, pueden llegar a 300 °C. Esta resistencia térmica aumenta las posibilidades de trabajo con estas membranas, de esta manera el lavado a altas temperaturas es mucho más eficaz, pudiéndose esterilizar con el paso de vapor de agua.

b) Membranas Orgánicas o Poliméricas:

Constituyen el campo más amplio y desarrollado de las membranas, tanto desde el punto de vista de volumen de fabricación como desde el campo de posibles aplicaciones. Las propiedades de una membrana polimérica van a depender fundamentalmente de dos factores, que a su vez van a influir en su comportamiento: la naturaleza física y química del polímero, la cual determinará su interacción con las componentes a separar, y el método de preparación de la membrana, que determinará su estructura.

Típicamente se dividen en dos tipos de membranas de acuerdo con su estructura: porosas y densas. Según se trate de un tipo o de otro, en la fabricación se va a dar más importancia a unas propiedades del polímero que a otras (McCaffrey, 1987; Scott, 1995 y Bhave, 1991)

En el caso de membranas porosas, su selectividad está determinada principalmente por el tamaño y la dispersión de tamaños de los poros, la cual está determinada casi exclusivamente por el método de fabricación de la membrana. Sin embargo, la naturaleza del polímero en estas membranas microporosas sólo afectará a propiedades como la adsorción física o química y a la estabilidad (química, mecánica y térmica).

Las propiedades de transferencia de masa, para las membranas no porosas están fuertemente influenciadas por algunas de las propiedades intrínsecas del polímero, como el grado de cristalinidad, la estructura, el estado vítreo o de goma, etc. La elección de un polímero para una aplicación determinada depende de forma significativa de la aplicación para la cual esté destinada la membrana. Esto se debe a que las propiedades de transporte en las membranas densas (solubilidad y difusividad) dependen del material de la membrana y de la naturaleza del permeado, y sobre todo de la interacción entre ellos.

Las membranas poliméricas pueden ser fabricadas a partir de uno o varios polímeros; en función de esto las podemos dividir en membranas homogéneas y compuestas.

Las primeras son fabricadas a partir de un único polímero, mientras que las segundas surgen de la superposición de capas de distintos materiales.

Estas membranas compuestas, generalmente están formadas por dos capas con distinta porosidad, denominadas capa porosa y capa fina. La capa porosa tiene como finalidad dar consistencia mecánica a la membrana, afectando lo menos posible a sus propiedades de permeabilidad y retención. Para ello, su permeabilidad debe ser muy alta y el tamaño de sus poros muy superior al de la capa fina.

La capa fina es la que determina las propiedades de selectividad y permeabilidad de una membrana compuesta. Esta capa está soportada sobre la capa porosa, permitiendo así reducir mucho su espesor con lo que aumenta la permeabilidad de la membrana, al ser ésta inversamente proporcional al espesor de la misma.

La aplicación de esta técnica en la fabricación de membranas es válida, tanto para las membranas porosas, como para las densas. Además, es posible aumentar el número de capas de la membrana con el fin de aumentar su selectividad.

c) Membranas Mixtas:

Con este nombre vamos a designar a aquellas membranas compuestas en las que una de las dos capas está formada por un polímero mientras que la otra es un material inorgánico, generalmente cerámico. La razón de emplear este último son sus características de resistencia térmica, mecánica y química. Por otra parte, al tener los materiales cerámicos porosidades elevadas y pocos problemas de adsorción y ensuciamiento, contribuirán poco al valor total de la resistencia de la membrana. La capa fina será un material polimérico, que se elegirá en función de la aplicación que se quiera dar a la membrana (Lonsdale, 1987 y 1989)

2.2.1.1.2. Clasificación de las membranas sintéticas según su estructura

La estructura de la membrana es uno de los factores fundamentales que más va a influir en el comportamiento de la misma. Esta estructura difiere mucho de un tipo de membranas a otro.

Al hablar de la estructura de la membrana hay que aclarar a que nivel estamos trabajando, macroscópico o microscópico, ya que dentro de cada uno de ellos podemos distinguir hechos diferentes. A nivel macroscópico se observan propiedades como el espesor, la estructura porosa y la posible asimetría de la membrana, factores que influyen en la velocidad de transporte así como en la selectividad. A nivel microscópico son más relevantes otras propiedades: la naturaleza cristalina o amorfa, la naturaleza

química, la existencia de cargas eléctricas, dipolos, etc. También a este nivel es esencial el conocimiento del tamaño de poro, de la distribución en tamaños o del tipo de huecos que hay.

Pero el primer elemento determinante de la estructura de las membranas es el proceso empleado en su fabricación. Teniendo en cuenta este hecho, veamos primero una breve descripción de los procesos comúnmente utilizados.

a) Microestructura de la membrana:

Las membranas sintéticas orgánicas pueden dividirse en dos grandes grupos: porosas y densas;

i) Membranas Densas:

Su mecanismo de transporte depende de la solubilidad y la difusividad de la molécula transportada a través del material. Su permeabilidad está controlada por el espesor de la membrana y por las propiedades físicas y químicas del polímero: cristalinidad, estructura de la cadena, humedad, etc.

Aunque no tienen poros propiamente dichos, en ellas se puede hablar de un diámetro de poro equivalente (por ej. dando el tamaño de la mayor molécula que es capaz de atravesarla, aunque esto sólo se puede decir de una forma aproximada pues hay otros factores, que pueden hacer que para moléculas iguales la facilidad de paso a través de la membrana sea distinta).

ii) Membranas Porosas:

Son aquellas en las que su estructura microporosa se puede asemejar a una barrera perforada, pudiendo ser atravesada por aquellas partículas cuyo tamaño sea inferior al tamaño de poro.

Estas membranas se dividen en homoporosas y heteroporosas, aunque esta división es un tanto arbitraria ya que nunca se pueden encontrar filtros totalmente homoporosas. Se habla de membranas homoporosas cuando al hacer su distribución de tamaños de poro, la dispersión es pequeña, por ejemplo, la distribución (muchas veces de tipo gaussiano) no es muy ancha. Si esa dispersión es grande entonces se habla de membranas heteroporosas. Esto suele ocurrir en las membranas poliméricas donde no existen poros propiamente dichos sino que son los huecos en el entramado del polímero lo que permite el paso a través de la membrana.

b) Configuración de la membrana:

Desde el punto de vista de la configuración las membranas pueden clasificarse en: membranas simétricas y asimétricas.

i) Membranas Simétricas:

Son aquellas en las que sus propiedades morfológicas (diámetro de poro, porosidad, tortuosidad, etc.) y sus propiedades funcionales (permeabilidad, retención, etc.) no dependen de la cara de la membrana que se elija para realizar el análisis.

ii) Membranas Asimétricas:

Éstas tienen propiedades morfológicas y/o funcionales distintas por ambas caras de la membrana. Se fabrican, bien sean homogéneas o compuestas con una estructura aparentemente de doble capa: capa fina y capa porosa (Figura 2.4). La primera capa es la que proporciona las características de funcionalidad a la membrana y su espesor suele ser muy pequeño comparado con el de la otra capa. La capa porosa posee poros de diámetro mucho mayor por lo que no suele influir en las características de funcionalidad pero proporciona una mayor resistencia mecánica.

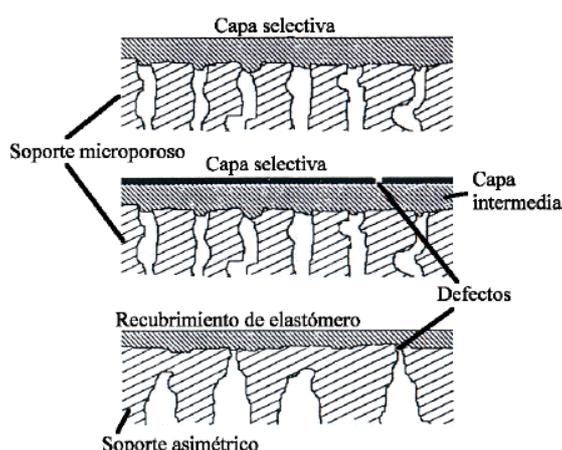


Figura 2.4. Esquema de un corte transversal de membranas compuestas

2.2.1.1.3. Clasificación de las membranas sintéticas según su forma

Hasta ahora se había hablado de la estructura microscópica de las membranas. A continuación nos referirnos a la estructura macroscópica, derivada de su propio proceso de fabricación. Desde este punto de vista, podemos dividir las membranas en tres tipos:

i) Laminares:

Son láminas planas, las cuales se podrán manipular para formar otro tipo de módulos dependiendo de su propia flexibilidad.

ii) Tubulares:

Son tubos porosos con diámetros entre 5-25 mm y longitud típica en el rango de 600- 6000 mm, pudiendo ser de un solo canal o multicanales. Este tipo es uno de los más usados a nivel industrial sobre todo por su facilidad de limpieza.

iii) Fibras Huecas:

Son microtubos porosos de diámetros comprendidos entre 0.2 y 1.25 mm. Se suelen suministrar en paquetes constituidos por un gran número de fibras, y su principal ventaja es que su relación entre el área de membrana efectiva y el volumen del módulo es muy alta.

En la Tabla 2.3 se recogen algunas de las aplicaciones más importantes a nivel industrial de las membranas en los procesos de separación.

Tabla 2.3. Aplicaciones industriales de los procesos de ultrafiltración

Área de aplicación	Ultrafiltración
Producción de agua potable y agua industrial	Producción de agua ultra-pura para la industria electrónica. Producción de agua estéril y libre de pirógenos para la industria química y farmacéutica.
Tratamiento de las aguas residuales de la industria y los municipios	Separación de aceite y agua. Recuperación de pinturas electroforéticas de aguas de aclarado (enjuague). Recuperación de proteínas a partir de los efluentes de la industria láctea y cárnica. Recuperación de polivinil en la industria textil. Recuperación de lanolina del agua de lavado de madera. Tratamiento de efluentes de la industria del papel y derivados.
Separación de masas en la industria alimentaria, química y farmacéutica.	Concentración de leche y productos lácteos. Filtración estéril, clarificación y desproteínización de vino, vinagre, etc. Concentración y purificación de enzimas, hormonas, opiáceos, etc. Separación de pirógenos, virus, bacterias, etc., de disoluciones farmacéuticas.

2.2.1.2. Polímeros utilizados para producir las membranas: Membranas de polietersulfona

La polietersulfona (PES) es un termoplástico amorfo, transparente y de color ámbar.

La estructura química de la PES se muestra en la Figura 2.5. De acuerdo con Cheryan (1998), los módulos de PES se caracterizan por:

- Baja adsorción/deposición de proteína sobre la superficie activa
- Temperaturas de trabajo relativamente altas (hasta 75 °C)

- Rango de pH de trabajo amplio (1-13)
- Buena resistencia a los cloruros (hasta 200 ppm en limpiezas y 50 ppm en condiciones de operación)
- Facilidad de fabricación en diferentes configuraciones
- Amplio rango de tamaños de corte disponibles (entre 1000 Da y 0.2 μm)
- Buena resistencia química frente a hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos halogenados, alcoholes y ácidos (aunque la resistencia frente a aromáticos, cetonas, ésteres y éteres es menor).
- Presiones de trabajo moderadas (aptos para microfiltración y ultrafiltración)

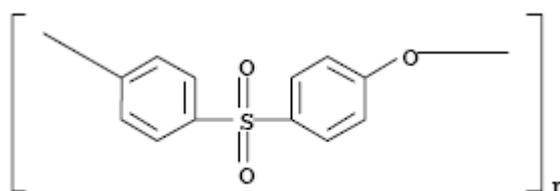


Figura 2.5. Estructura química del monómero de poliétersulfona

El grupo $-\text{SO}_2$ presente en la familia de las polisulfonas es muy estable gracias a la estructura resonante de los grupos aromáticos adyacentes. Esta estructura resonante confiere a la PES un alto grado de rigidez, resistencia mecánica, resistencia a la fatiga y estabilidad molecular. Además, los grupos fenil-éter y fénil-sulfona presentan una gran estabilidad a largo plazo frente a la oxidación y la temperatura (Cheryan, 1998).

Desde un punto de vista físico, los módulos de membrana de PES (Figura 2.6) presentan una microestructura de capa fina microporosa parecida a una barrera perforada, pudiendo ser atravesada por aquellos solutos cuyo tamaño sea inferior al tamaño de poro. Por otra parte, las membranas de PES son asimétricas, es decir,

presentan propiedades morfológicas y funcionales distintas por ambas caras de la membrana (Palacios, 1999).

Gracias a estas características físico-químicas de la PES es posible aplicar tratamientos de limpieza más efectivos que en el caso de otras membranas orgánicas tradicionales (celulosa regenerada o poliamida).

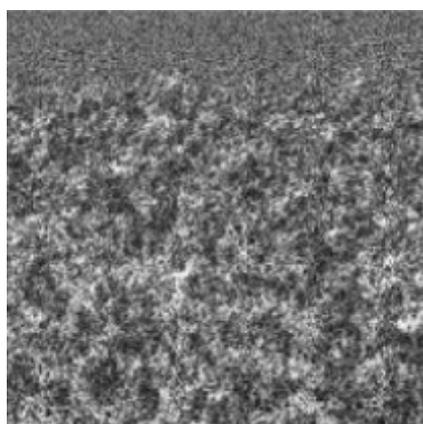


Figura 2.6. Estructura física de la membrana de poliétersulfona

Por otra parte, las membranas empleadas se caracterizan por un rango de tamaños de corte muy estrecho, por lo que son altamente selectivas, siendo total el rechazo para especies de peso molecular superior al nominal y permitiendo la permeación de las especies menores a dicho tamaño.

2.2.2. Proceso de obtención del concentrado de proteínas de suero (WPC)

Como ya se mencionó anteriormente, la obtención del WPC se logra mediante la ultrafiltración del suero. La UF se caracteriza por tener un rango de corte de peso molecular (MWCO) de 3 a 100 kDa. El corte más común es la norma para productos lácteos de un peso molecular de 10 kDa. Este es el tamaño tradicional usado en la

industria para producir concentrados de proteína de suero (WPC) del 35% al 80% de WPC.

Para procesar el suero se deben ajustar correctamente los parámetros operativos, teniendo en cuenta que:

- El pH se debe encontrar alejado del punto isoeléctrico de las proteínas.
- La temperatura deberá ser superior a 30°C (a menores temperaturas pueden existir problemas con el calcio presente)
- Existe una combinación óptima entre la presión y la velocidad de flujo que minimiza el ensuciamiento de la membrana.
- Un pretratamiento del suero es importante para obtener flujos de permeación mayores, por ejemplo precalentar el suero a 55°C durante 30 – 90 minutos; bajar el pH para mantener a las sales en solución; remover el calcio; pretratar con ácido cítrico y EDTA a pH 2.5 para secuestrar el calcio; centrifugar; etc.
- En lo posible, utilizar métodos físicos para pretratar el suero, los efectos sobre el producto son menos agresivos e incluso pueden mejorar las propiedades funcionales del concentrado de proteínas de suero (WPC) (Kuo y Cheryan, 1983)

Hoy en día el proceso de UF de suero para recuperar las proteínas es bien conocido, ya que su aplicación está ampliamente difundida en las industrias lácteas. El proceso típico se muestra en la Figura 2.7.

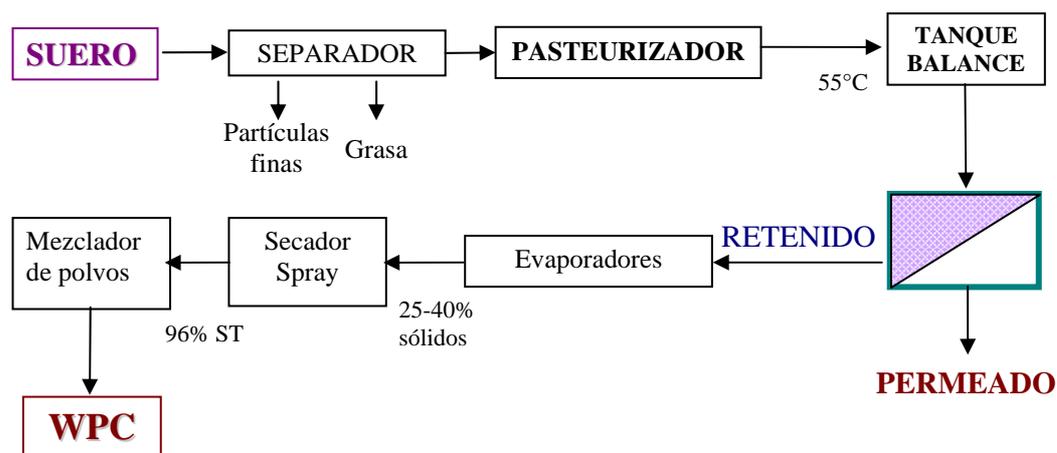


Figura 2.7. Proceso de UF de suero de quesería (Cheryan, 1998)

El contenido inicial de proteínas de 10-12% (base seca) puede incrementarse por UF obteniendo productos que van de 35% a 80% de proteínas. A continuación se muestran las composiciones de los WPC obtenidos industrialmente (Tabla 2.4)

Tabla 2.4. Composiciones típicas de los WPC (Phillips y Williams, 2000)

	WPC - 35	WPC - 80
Proteínas (mín)	34	80
Lactosa (máx)	50,5	0 (por diferencia)
Materia Grasa (máx)	4	7
Humedad (máx)	4.5	6
Cenizas (máx)	6.5	7

2.2.2.1. Flujo a través de la membrana de Ultrafiltración

Una de las mayores limitaciones que presenta la tecnología de membranas es la disminución del flujo debido al ensuciamiento de la membrana. Es por este motivo que existe cierto rechazo a adoptar esta tecnología en procesos industriales.

Afortunadamente, ha habido sustanciales progresos en las pasadas décadas para comprender el mecanismo de ensuciamiento y minimizar sus efectos.

2.2.2.1.1. Características del ensuciamiento (fouling)

El flujo suele ser mucho menor al flujo del solvente puro (por ej. agua) si se dan alguna de las siguientes condiciones:

- Cambios en las propiedades de las membranas: Esto puede suceder como resultado del deterioro químico y físico de la membrana. A pesar de que el proceso de membranas es dependiente de la presión aplicada, a altas presiones pueden aparecer otros fenómenos, como ser la compactación, que en general produce cambios sustanciales en la permeabilidad de la membrana. Por otro lado, el deterioro químico puede ocurrir si el pH, la temperatura u otro factor ambiental son incompatibles con una membrana en particular. Los sucesivos lavados de la membrana también afectan sus propiedades.

- Cambios en las propiedades de la alimentación: El transporte a través de una membrana porosa de ultrafiltración es en general considerado como un fenómeno de flujo viscoso gobernado por la ecuación de Hagen-Poiseuille o por las ecuaciones de transferencia de masa. Cuando la viscosidad y la densidad de la alimentación aumentan el flujo será inferior al del agua pura.

- Polarización de la concentración: El flujo puede verse afectado por un fenómeno denominado: polarización de la concentración, que ocurre en la superficie de la membrana, ya que a medida que el solvente es removido a través de ella, la especies rechazadas tienden a acumularse en la interfase membrana-solución. Estos compuestos

son rechazados en forma axial y, cuando se alcanza la estabilidad del flujo de alimentación, se forma un gradiente de concentración en la interfase donde el transporte de la especie hacia la membrana por el flujo de la solución, es balanceado por el efecto combinado de la filtración a través de la membrana y la difusión inversa de los solutos. El efecto de la polarización se puede revertir, ya sea disminuyendo la presión transmembrana o la concentración de la alimentación. También puede evitarse aumentando la velocidad de flujo o la turbulencia.

El ensuciamiento o fouling de la membrana se caracteriza por una disminución *irreversible* del flujo. Dependiendo del sistema, el flujo puede disminuir en una o varias etapas, frecuentemente muy rápido durante los primeros minutos seguido de una disminución mas gradual mientras transcurre el tiempo.

2.2.2.1.2. Factores que afectan el flujo de permeado

2.2.2.1.2.1. Propiedades de la membrana

- ~ Hidrofilicidad: En alimentaciones acuosas, la membrana ideal debe ser hidrofílica. Si el material es hidrofóbico, puede adsorber componentes que son también hidrofóbicos, resultando en una considerable disminución del caudal de permeación. Una medida del poder hidrofílico de la membrana es el ángulo de contacto. Si una gota de agua es colocada sobre un material completamente hidrofílico, el agua se esparcirá por completo sobre la superficie, siendo entonces, el ángulo de contacto cercano a cero (Figura 2.8).
- ~ Topografía de la superficie: Se han observado grandes depósitos de proteínas sobre superficies que son más rugosas (Suki y otros 1984)

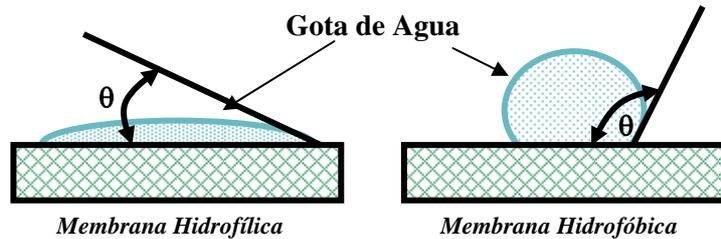


Figura 2.8. Ángulo de contacto en las membranas de diferentes características

- ~ Carga en la membrana: La mayoría de las membranas poseen una carga neta negativa bajo condiciones de operación usual. La carga de la membrana cobra importancia cuando las partículas que son procesadas están cargadas.
- ~ Diámetro de poro: Las membranas con gran tamaño de poro pueden presentar flujos iniciales mucho más grandes que membranas con poros más pequeños pero luego (en general rápido) el flujo disminuye en mayor medida. Esto puede deberse a que si el tamaño de las partículas que deben ser separadas es similar al de los poros de la membrana, algunas partículas pueden alojarse en los poros. El bloqueo de los poros produce una drástica disminución del flujo de permeado durante los primeros minutos de la operación. Aumentar la presión solo empeora la situación comprimiendo aún más las partículas. Por otro lado, si los poros son muy pequeños, las partículas no son retenidas en los mismos sino que se desplazan sobre la superficie por las fuerzas de corte producidas por el flujo. En efecto, si la velocidad del flujo transversal no tiene efecto sobre el flujo con una corriente de alimentación que muestra efectos de polarización indica que el fenómeno (de obstrucción) ha ocurrido y es necesario limpiar de inmediato ya que las técnicas de ajuste del flujo no serán efectivas. A pesar de que resultaría lógico utilizar membranas que posean poros del mismo tamaño o un poco más pequeños que las partículas que desean ser

retenidas, las ventajas de un flujo inicial alto resultan en un problema mayor cuando transcurre el tiempo y el flujo decae de manera drástica asociado a un gran ensuciamiento de la membrana. Como una primera aproximación a la hora de elegir el tamaño de corte la membrana a utilizar, podría ser que la relación tamaño de partícula – tamaño de poro sea de 10. Luego se deberá buscar empíricamente el tamaño más adecuado según el proceso que se trate. (Merin y Cheryan, 1980).

~ Modificaciones de la superficie: Algunas membranas pueden ser más hidrofílicas si se agregan a su superficie grupos funcionales hidrofílicos, como por ejemplo aquellos que son capaces de ligar moléculas de agua o formar puentes de hidrógeno, tales como los grupos hidroxilos (-OH)

2.2.2.1.2.2. Propiedades del soluto

Ya que el ensuciamiento de la membrana es el resultado de las interacciones entre la misma y los distintos solutos presentes en la corriente de alimentación, es importante entender las características fisicoquímicas de cada uno de estos componentes para establecer el desempeño de la membrana.

~ Proteínas: No es extraño que sean las proteínas las principales responsables de la caída del flujo durante el proceso de UF. Esto se debe a la multiplicidad de grupos funcionales, la densidad de carga, la variedad de grados de hidrofobicidad y las complejas estructuras secundarias y terciarias que permiten que la proteína interactúe con otros componentes presentes y con la misma membrana. Y, para mayor complejidad del fenómeno, todas estas propiedades son a su vez afectadas por el pH, la fuerza iónica, esfuerzos de corte, tratamientos térmicos, y otros factores ambientales (Marshall y otros, 1993; Nilsson 1990).

- ~ Sales: Las sales minerales tienen un notable efecto sobre la disminución del flujo. Por un lado, suelen precipitar sobre la membrana debido a su baja solubilidad o bien pueden ligarse a la misma debido a interacciones iónicas. Se ha encontrado que el calcio (30 mM en leche bovina) es la mayor causa de disminución del flujo en los procesos en los que puede estar presente, no solo por precipitar en forma de tricalcio fosfato sino por su forma iónica que puede formar puentes calcio con otras proteínas o con la misma membrana. El flujo puede ser mejorado si se remueve el calcio presente, por ejemplo por centrifugación, electrodiálisis o intercambio iónico.
- ~ pH: En general, el flujo es menor cuando se trabaja en el punto isoeléctrico de las proteínas y aumenta cuando el pH se aleja del mismo. Cambios en el pH aumentan la solubilidad y configuración de los componentes de la alimentación. La solubilidad de las proteínas es generalmente inferior en el punto isoeléctrico; aumenta cuando el pH se aleja del mismo. Cuando se ajusta el pH se debe tener en cuenta que si hay sales presentes, las mismas pueden precipitar sobre la membrana. Si antes de realizar la UF del suero se remueven las sales insolubles de calcio a pH 6.4 – 7 por filtración (Daufin y otros, 1992) o por centrifugación (Kuo y Cheryan, 1983), el flujo se mejora significativamente.
- ~ Lípidos, grasas y aceites: Existe evidencia que indica que el hecho de remover los lípidos del suero de quesería por centrifugación o microfiltración tiene un efecto beneficioso sobre el flujo de UF. En mezclas aceite en agua (oil-in-water), se debe tener en cuenta que, “similares atraen similares”; si se utilizan membranas hidrofóbicas, los aceites libres pueden recubrir la membrana produciendo una consecuente disminución del flujo.

Otros agentes que afectan el flujo de permeado son: los antiespumantes, sustancias húmicas (Jucker y Clark 1994), polihidroxi aromáticos, y polisacáridos (Defrise and Gekas 1988; Matthiasson and Sivik 1980)

2.2.2.1.2.3. Parámetros operativos del proceso

Además de las complicadas interacciones fisicoquímicas entre los compuestos presentes en la alimentación, los parámetros del proceso tales como temperatura, velocidad de flujo, presión y concentración de la corriente de alimentación, presentan una gran influencia sobre el ensuciamiento de la membrana, por lo que deben ser tenidos en cuenta para el diseño del proceso.

~ Temperatura: El efecto de la temperatura no está del todo claro. El aumento de la temperatura trae como resultado un aumento del flujo, esto es verificado en la práctica. De todos modos, puede también provocar una disminución del flujo en ciertos productos tales como el suero de quesería. Por debajo de los 30°C, un aumento en la temperatura hace disminuir el flujo de permeado debido a que aumenta la solubilidad del fosfato de calcio. De todos modos, si la temperatura se incrementa aún más, sus efectos son más beneficiosos (disminuye la viscosidad, hay mayor difusividad) y compensan, en cierta medida los problemas que trae el calcio dando como resultado final un aumento en el flujo, Figura 2.9 (Cheryan, 1998). En los sistemas biológicos, temperaturas muy altas pueden desnaturalizar a las proteínas o provocar otros efectos por calentamiento. La adsorción de las proteínas en el rango de temperatura de interés en las aplicaciones de UF (30-60°C) generalmente aumenta con la temperatura.

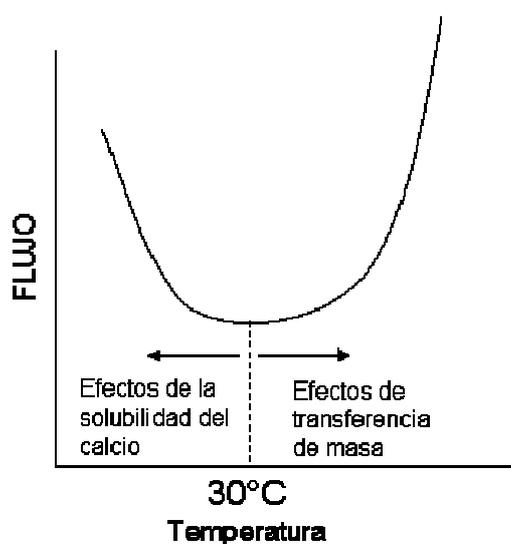


Figura 2.9. Efecto de la Temperatura sobre el flujo en UF de suero de quesería

- ~ Velocidad de flujo y turbulencia: Grandes esfuerzos de corte remueven el material que se deposita sobre la membrana, y esto reduce la resistencia hidráulica de la capa de ensuciamiento. De todos modos esto no siempre ocurre si la presión transmembrana es alta en relación a la velocidad de permeación. A bajas presiones (por ej., baja velocidad de permeación), las fuerzas de corte son lo suficientemente grandes para minimizar el depósito de proteínas sobre la superficie membrana. A altas presiones (o gran velocidad de flujo), las partículas se mueven sobre la superficie de la membrana más rápidamente de lo que son removidas, por lo que se obtiene un gran ensuciamiento.
- ~ Presión: En el caso particular de la UF de suero de quesería, se ha encontrado que existe un punto crítico, que deberá ser determinado experimentalmente para cada caso en particular, por encima del cual no resulta conveniente incrementar la presión de trabajo ya que el flujo comienza a caer drásticamente. En esta situación, si se aumenta

la presión aparecen otros efectos que son indeseados como ser la compactación de los solutos sobre la superficie de la membrana (Kuo y Cheryan, 1983).

2.3. Hidrólisis de la lactosa presente en el suero

El costo de los concentrados de proteína de suero se incrementa con la cantidad de proteína presente en el mismo. En algunas aplicaciones resulta muy costoso agregar WPC con alto porcentaje de proteínas, es por esto que se opta por el uso de concentrados con menor cantidad de proteínas; el costo de estos es menor no solo porque poseen una menor proporción proteínas sino también porque se producen en mayor cantidad.

El problema que presentan estos concentrados con menor proporción de proteínas es la gran cantidad de lactosa presente en su composición. Para ciertas aplicaciones esto no reviste importancia, pero existen aplicaciones industriales donde la presencia de altas concentraciones de lactosa produce problemas tecnológicos debido a la baja solubilidad de este azúcar.

La solución a este inconveniente podría ser hidrolizar a la lactosa presente en el suero de quesería por vía enzimática utilizando a la enzima β -galactosidasa.

2.3.1. Enzimas para la hidrólisis de la lactosa

Las enzimas en términos generales, son catalizadores biológicos que promueven la transformación de especies químicas en sistemas vivos. Estas moléculas son capaces de catalizar una gran cantidad de reacciones químicas diferentes que ocurren en las células biológicas.

Algunas de las ventajas de utilizar enzimas son:

- ~ Las enzimas son catalizadores muy eficientes, aceleran la velocidad de reacción en 8 a 20 órdenes de magnitud. Se usan en concentraciones mucho menores a las de catalizadores químicos.
- ~ Poseen un alto grado de precisión, esto es selectividad de sustrato, selectividad de grupo funcional, regioselectividad, estereoselectividad. Es decir, cada enzima degrada o sintetiza un compuesto químico en particular.
- ~ No producen contaminación ambiental, las enzimas son biodegradables. Si se usan soportes inertes, el derivado inmovilizado sigue siendo inocuo para el medio ambiente.
- ~ En general trabajan a temperatura ambiente, presión atmosférica y pH neutro o cercano a la neutralidad.
- ~ Se minimiza la generación de subproductos por reacciones colaterales, que conlleva un aumento de la conversión y facilita los procesos de recuperación de productos.
- ~ No están limitadas a su papel natural, presentan alta tolerancia por distintos sustratos y en muchos casos pueden trabajar en medios orgánicos.

Sin embargo, las enzimas han sido modificadas durante la evolución biológica para mejorar su comportamiento. Obviamente las enzimas no han sido optimizadas para trabajar dentro de reactores industriales. Es por esto que a pesar de sus excelentes propiedades catalíticas, presentan otras características que no las hacen muy apropiadas para trabajar en reactores industriales: son catalizadores solubles, generalmente son muy inestables, pueden ser fuertemente inhibidas por sustratos y productos, y solo trabajan

bien con sustratos naturales y bajo condiciones fisiológicas. En la mayoría de los casos las enzimas deben ser modificadas antes de ser usadas en los procesos industriales.

La implementación de enzimas en procesos industriales de gran escala requiere de una multidisciplinaria utilización de diferentes técnicas:

- 1) Búsqueda de enzimas con propiedades que mejor se adapten las necesidades (Robertson y Steer, 2004)
- 2) la mejora de las propiedades de las enzimas mediante técnicas de biología molecular (Van den Burg y Eijnsink, 2002)
- 3) la mejora de las propiedades de las enzimas mediante técnicas de inmovilización y post inmovilización (Betancor y otros 2003)
- 4) la mejora de las propiedades de las enzimas mediante ingeniería de reactores y reacciones (Guisan, 2006)

Para la hidrólisis de la lactosa se utiliza la enzima β -galactosidasa (E.C. 3.4.2.1.23), produciendo una mezcla equimolar de glucosa y galactosa. Los azúcares obtenidos presentan dos propiedades de interés: mayor solubilidad y dulzura. Este cambio en las propiedades ha dado origen a una gran cantidad de aplicaciones industriales permitiendo el uso de los jarabes de glucosa-galactosa.

Como ya se ha mencionado, la β -galactosidasa puede obtenerse de diferentes fuentes, pero su producción a escala industrial para aplicaciones en procesos alimenticios solo se realiza mediante el cultivo de microorganismos considerados seguros por organismos internacionales. Se utilizan las levaduras *Kluyveromyces fragilis* y *lactis* y los hongos *Aspergillus niger* y *oryzae* (Office of Premarket Approval,

1998). También existe la lactasa proveniente de *E. Coli*; su uso está prohibido en la industria de alimentos debido a los posibles problemas de toxicidad que presentan los extractos crudos.

Las propiedades de las enzimas dependen tanto de su fuente de origen, como de la preparación. En la Tabla 2.5 se presentan las propiedades de las enzimas utilizadas en el tratamiento de leche y suero dulce (Carrara, 1994).

Tabla 2.5. Propiedades de las β -galactosidasas empleadas en suero dulce y leche

PROPIEDADES	FUENTE		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
pH óptimo	7.2	6.7 – 7.3	6.6
pH estabilidad	6.0 – 8.0	6.0 – 8.5	6.5 – 7.5
Temperatura óptima	40°C	35°C	37°C
Iones activantes	Na ⁺ , K ⁺	Mn ²⁺ , K ⁺	Mn ²⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺
Iones inhibidores	Ca ²⁺	Na ⁺	Na ⁺ , K ⁺
Peso molecular (kDa)	5.4 – 8.5	1.35	2.01

Existen diferentes técnicas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de la lactosa. La tecnología más simple, se basa en el uso de la enzima purificada, empleada una única vez en procesos de tipo batch. Cuando se alcanza la conversión deseada se detiene la reacción por calentamiento o pH, lo que produce la desnaturalización de la enzima y una consecuente pérdida de la actividad. El costo de la enzima restringe su uso

masivo. Esto es particularmente crítico para el aprovechamiento de grandes volúmenes de suero y permeado (Novalin y otros, 2005).

Si bien se cuenta con importante información a nivel de la composición de la enzima, resulta indispensable estudiar primeramente su actividad y estabilidad en el medio de trabajo debido a que estos parámetros pueden modificarse no solo con el pH y la temperatura, sino también con el agregado de ciertos cationes en determinadas concentraciones.

Se ha estudiado extensivamente la cinética de la reacción de hidrólisis de la lactosa (Papayannakos y Markas, 1993; Carrara y Rubiolo, 1996; Santos y otros, 1998; Ladero y otros, 2000; Jurado y otros, 2002). Se puede concluir que, cualquiera sea el origen de la enzima, el modelo que mejor describe su comportamiento es la ecuación de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto. En este mecanismo se considera la formación de un complejo [enzima-sustrato] a través de la interacción de la galactosa con el sitio activo de la enzima. A partir de éste, se libera primero la glucosa y luego puede separarse la galactosa o la reacción del complejo [enzima-galactosa] con un mono o disacárido para producir un di u oligosacárido. La galactosa puede interactuar nuevamente con el sitio activo de la enzima, compitiendo con la lactosa.

2.4. Procesos de inmovilización de enzimas

2.4.1. Enzimas inmovilizadas como catalizadores en procesos químicos industriales

Por razones técnicas y económicas, la mayoría de los procesos químicos catalizados por enzimas requieren la reutilización o el uso continuo del biocatalizador por un largo período de tiempo. Desde esta perspectiva, la inmovilización de enzimas

puede ser definida como una técnica que permite la reutilización o el uso continuo de los biocatalizadores. Desde el punto de vista industrial, simplicidad y costo efectivo son las propiedades clave de las técnicas de inmovilización. A primera vista, el desarrollo de los protocolos para la inmovilización de las enzimas está íntimamente relacionado con la simplicidad, costo efectivo y la estabilización de las enzimas (Guisan, 2006).

Tabla 2.6. Propiedades tecnológicas de los sistemas de enzimas inmovilizadas

Ventajas	Desventajas
Reutilización del catalizador	Pérdida o reducción de actividad
Mayor facilidad de operación del reactor	Limitación difusional
Mayor facilidad para separar el producto	Costo adicional
Elección más amplia del reactor	

El uso de enzimas inmovilizadas en procesos industriales incluye la producción de azúcares, aminoácidos y fármacos.

Tabla 2.7. Productos obtenidos mediante el uso de enzimas inmovilizadas
(Katchalski-Katzir, 1993)

Enzima	Producto
Glucosa isomerasa	Jarabe de maíz de alta fructosa
Aminoácido acilasa	Producción de aminoácidos
Penicilina acilasa	Penicilina semi sintética
Nitrilo hidratasa	Acrilamida
β -galactosidasa	Lactosa hidrolizada (suero o permeado de suero)

En las pasadas tres o cuatro décadas, la investigación de los procesos de inmovilización tuvo un desarrollo amplio e inmediato; pero todavía es necesario seguir trabajado para mejorar las técnicas. Extender el uso de enzimas inmovilizadas en lugar de otros procesos va a requerir de nuevas metodologías y una mejor comprensión de las técnicas actuales. En la Figura 2.10. se resumen los factores que se deben tener en cuenta para el diseño del biocatalizador.



Figura 2.10. Factores a ser considerados para el diseño del biocatalizador

Teniendo en cuenta los parámetros antes mencionados, los miles de protocolos de inmovilización de enzimas que se encuentran en la literatura debieron evaluarse de acuerdo con los siguientes criterios:

1. No utilizar, en lo posible, reactivos tóxicos o peligrosos durante y después del proceso de inmovilización
2. Utilizar, en lo posible, soportes preactivados que hayan sido preparados por otras compañías.
3. La posibilidad de asociar la inmovilización de las enzimas y la mejora de las propiedades funcionales (actividad, estabilidad y selectividad). Los preparados de enzimas inmovilizadas que resulten muy activos y estables son la clave para su utilización industrial. Los que resulten menos activos y no tan estables

pueden ser útiles en pruebas de laboratorio pero no son apropiados para utilizarlos en procesos industriales. Desde el punto de vista práctico, enzimas muy estables pueden ser inmovilizadas o bien la estabilidad debe ser mejorada como consecuencia de su inmovilización.

4. La preparación de derivados inmovilizados útiles en diferentes reacciones (ej. los que incluyen sustratos solubles e insolubles, la necesidad de regeneración del cofactor o la presencia de oxígeno como sustrato de la enzima), en diferentes medios de reacción (ej. agua, solventes orgánicos, fluidos supercríticos), y diferentes reactores (ej. tanque agitado, lecho fluidizado).

2.4.1.1. Mejora de las propiedades de las enzimas vía técnicas de inmovilización y post-inmovilización

Usando adecuados protocolos de inmovilización de enzimas se pueden mejorar considerablemente las propiedades de las enzimas industriales. A continuación se enumeran las propiedades que pueden ser mejoradas aplicando adecuadas técnicas de inmovilización:

- Estabilización por inmovilización al azar
- Rigidificación de la estructura 3D
- Estabilización de enzimas multiméricas
- Modificación química de enzimas inmovilizadas
- Generación de microambientes hiper-hidrofílicos
- Hiper-activación de lipasas
- Modulación de la enantio-selectividad de las lipasas
- Reducción de inhibidores

De esta manera, resulta que la inmovilización es una técnica necesaria para reutilizar las enzimas y se convierte en una poderosa herramienta para mejorar las propiedades de las enzimas. Mejor aún, las propiedades de las enzimas pueden ser mejoradas a través de modificaciones físicas o químicas de los derivados inmovilizados.

2.4.2. Elección de los soportes

Las características de la matriz sobre la que se realizará la inmovilización, son de suma importancia para determinar el desempeño de los sistemas con enzimas inmovilizadas. Un soporte ideal incluye las siguientes propiedades: resistencia física a la compresión, hidrofiliidad, inerte a las enzimas, biocompatibilidad, resistencia al ataque de microorganismos, disponibilidad y bajo costo.

Los soportes pueden ser clasificados en inorgánicos y orgánicos según su composición química (Tabla 2.8).

Las características físicas de las matrices, tales como: diámetro de partícula, hinchamiento (swelling), comportamiento frente a las condiciones de operación (T, pH, presión, etc), resistencia mecánica y comportamiento frente a la compresión, serán de gran importancia para el desempeño de los sistemas inmovilizados y determinarán el tipo de reactor a utilizar bajo ciertas condiciones operativas (ej. tanque agitado, lecho fluidizado, lecho fijo). En particular, el tamaño de poro y de partícula determinan el área total superficial y esto afecta directamente la capacidad de carga de la enzima en el soporte.

Los soportes no porosos presentan pocas limitaciones difusionales, pero es menor la carga enzimática que se obtiene. Por lo tanto, los soportes porosos son los

preferidos ya que su gran área superficial permite obtener una carga de enzima considerable, además la enzima inmovilizada recibe mayor protección del medioambiente. Los soportes porosos deberán tener una distribución de poro controlada para optimizar la capacidad y propiedades de flujo. A pesar de las ventajas que presentan los soportes inorgánicos (gran estabilidad frente a la degradación física, química o microbiológica), en la mayoría de las aplicaciones industriales se utilizan soportes orgánicos. El carácter hidrofílico resulta ser una de las propiedades de mayor importancia para lograr el mayor nivel de actividad de la enzima inmovilizada.

Tabla 2.8. Clasificación de los soportes

Orgánicos
Polímeros Naturales
<ul style="list-style-type: none">• Polisacáridos: celulosa, dextranos, agar, agarosa, quitina, alginato• Proteínas: colágeno, albúmina• Carbón
Polímeros Sintéticos
<ul style="list-style-type: none">• Poliestireno• Otros polímeros: poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamidas, poliamidas, vinilo, polietersulfona
Inorgánicos
Minerales Naturales: bentonita, sílica
Materiales procesados: vidrio (no poroso y de poros controlado), metales, óxidos de metal de poro controlado

La agarosa es un soporte que ha sido ampliamente utilizado y con el cual se han obtenido excelentes resultados. Además de su gran porosidad, que permite ligar gran cantidad de proteína, otras ventajas que presentan son su característica hidrofílica, fácil de derivatizar, ausencia de grupos cargados (que previene la absorción no específica de sustratos y productos) y disponibilidad comercial. De todos modos su uso aún está muy limitado debido a su alto costo. Este problema podría ser superado si se utilizan métodos de inmovilización reversibles que permitieran la regeneración de la matriz y así poder reutilizarla.

Las enzimas pueden ser ligadas a los soportes a través de interacción que van desde la adsorción física reversible y uniones iónicas a uniones covalentes irreversibles. Una forma de clasificar los tipos de inmovilizaciones de enzimas es en dos categorías: métodos reversibles e irreversibles. La fuerza de los enlaces está inversamente relacionada a la reversibilidad. El enfoque tradicional ha sido lograr los enlaces más fuertes sacrificando la reversibilidad.

2.4.3. Métodos de inmovilización

La inmovilización de enzimas resulta una técnica apropiada para solucionar algunas desventajas de utilizar la enzima libre. Ahora bien, existen varios métodos de inmovilización. A continuación se describen los más utilizados.

2.4.3.1. Métodos de inmovilización reversibles

El uso de estos métodos resulta mucho más atractivo debido a razones económicas, cuando la actividad catalítica disminuye el soporte puede ser regenerado y recargado con enzima fresca. Es más, el costo del soporte es generalmente el principal

factor en el total del costo del catalizador inmovilizado. La inmovilización reversible de enzimas es particularmente importante para inmovilizar enzimas lábiles o para aplicaciones en sistemas bioanalíticos (Figura 2.11).

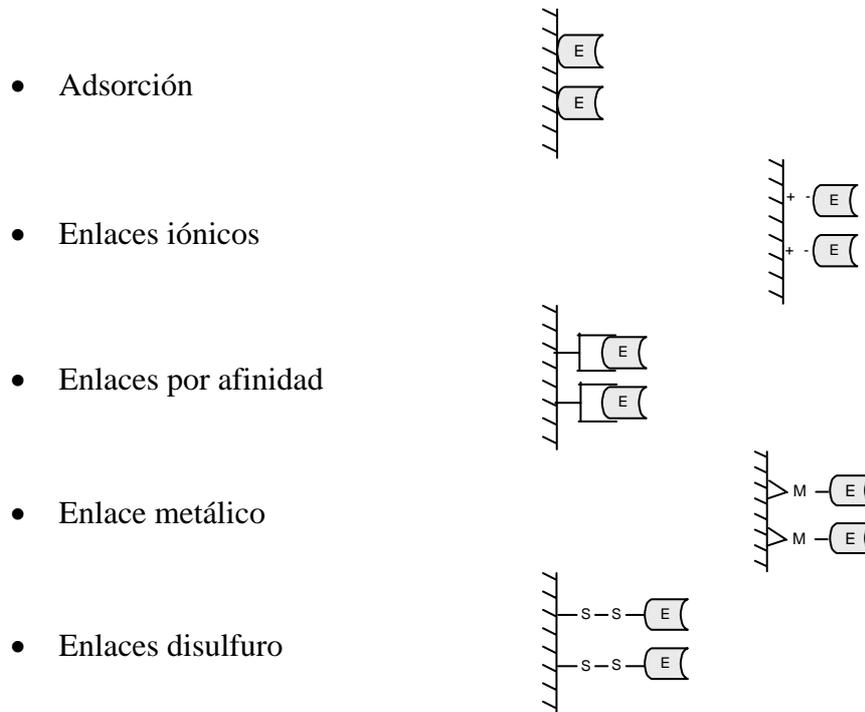


Figura 2.11. Métodos reversibles

2.4.3.2. Métodos de inmovilización irreversibles

Estos métodos suponen fijar la enzima al soporte de manera tal que resulta imposible recuperarla sin perder su actividad biológica o bien sin destruir el soporte (Figura 2.12).

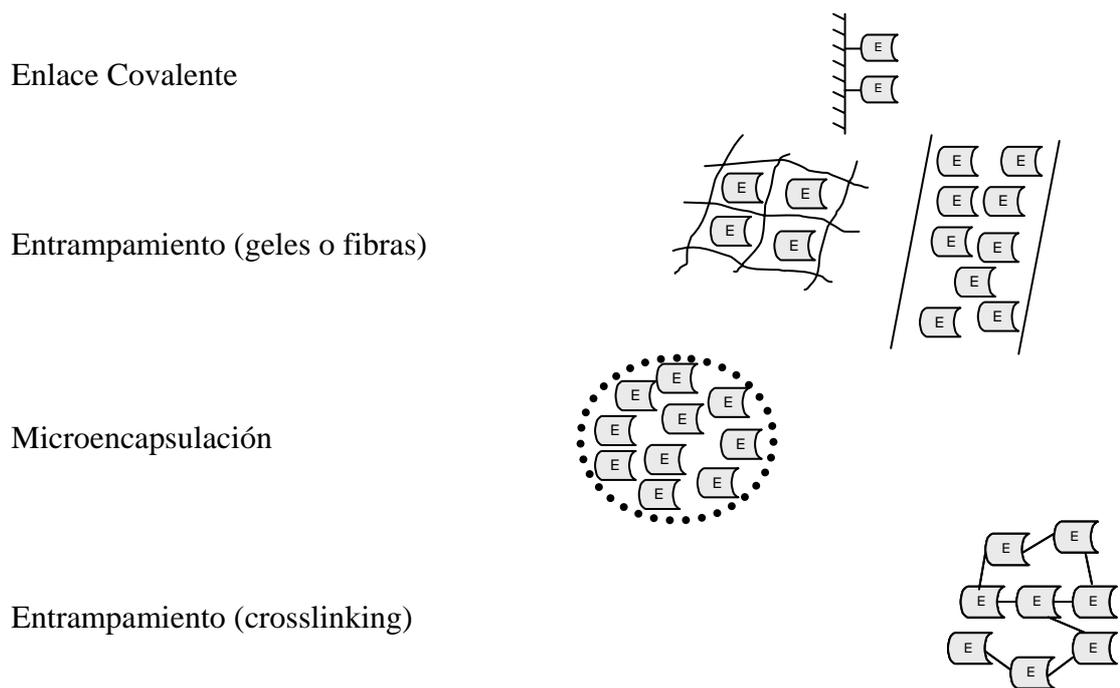


Figura 2.12. Métodos de inmovilización irreversibles

2.4.3.2.1. Entrampamiento

Este método se basa en la oclusión de la enzima en una red polimérica que permite al sustrato y productos pasar a través de ella, pero retiene a la enzima. Por este método la enzima no es ligada al soporte. Existen varias formas de entrapar a la enzima, se pueden utilizar geles o fibras, como así también la microencapsulación. Estos métodos están limitados por la transferencia de masa a través de las membranas o geles. Además, es imposible utilizar este método si disponemos de soportes comerciales, como lo pueden ser las membranas de ultrafiltración.

2.4.3.2.2. Formación de enlaces covalentes

La inmovilización de proteínas por métodos que se basan en la formación de enlaces covalentes es la más utilizada. Una ventaja que presenta este método es la estabilidad de los enlaces covalentes que se forman entre la enzima y la matriz del

soporte, la enzima no es liberada en la solución. De todos modos, para mantener altos niveles de actividad, los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad catalítica no deben estar involucrados en los enlaces covalentes; esto puede resultar un requisito difícil de cumplir en algunos casos. Un simple procedimiento que muchas veces incrementa la actividad es llevar a cabo la reacción de inmovilización en presencia de algún sustrato análogo. Los métodos de inmovilización por enlaces covalentes son utilizados cuando es requisito indispensable la ausencia de enzima en el producto.

Una gran cantidad de reacciones han sido desarrolladas dependiendo de los grupos funcionales disponibles en la matriz del soporte. Los métodos de acoplamiento pueden dividirse en dos grandes clases:

- (1) activación del soporte adicionando un reactivo funcional, y
- (2) modificación de la estructura polimérica para producir un grupo activo.

Tabla 2.9. Enlaces covalentes: Activación de la matriz del soporte

Método de activación	Grupo que reacciona (con la matriz activada)	Referencias
Cloruro de trifluoroetano sulfonilo Cloruro sulfonilo	Tiol, amino	Lawson y otros, 1983
Bromuro de cianógeno	Amino	Axén y otros, 1967
Epoxicianos	Tiol, amino	Porath y Axén, 1976
Epiclorhidrina	Tiol, amino	Porath y Axén, 1976
Glutaraldehido	Amino	Porath y Axén, 1976
Glicidol-Gloxilo	Amino	Guisán, 1988
N-Hidroxi-succinimidilo	Amino	Wilchek y Miron, 1982; Drobnick y otros, 1982

Existe una gran cantidad de soportes comerciales para inmovilizar enzimas, la mejor elección en cada caso requiere considerar aquellas propiedades que resultan relevantes para el catalizador y su uso.

Debido a la naturaleza de los enlaces, el soporte debe ser descartado junto con la enzima una vez que la actividad de la misma decaiga.

2.4.3.2.2.1. Glutaraldehído en la inmovilización de proteínas

Una de las técnicas más utilizadas en la inmovilización de enzimas es la inmovilización por enlaces covalentes usando glutaraldehído como agente activante. Existen diferentes formas de uso del glutaraldehído para lograr el objetivo, tales como la inmovilización de enzimas sobre soportes previamente activados con glutaraldehído o el tratamiento con glutaraldehído de las proteínas adsorbidas en el soporte que poseen grupos aminos primarios (Betancor y otros, 2006).

La inmovilización de proteínas sobre soportes preactivados con glutaraldehído es simple y eficiente, y en algunas circunstancias permite mejorar la estabilidad de la enzima mediante la inmovilización multipuntual (Figura 2.13).

Estos soportes pueden obtenerse haciendo reaccionar el glutaraldehído con una matriz que contenga grupos amino primarios. Esto significa, que por debajo de cada molécula de glutaraldehído, hay uno o dos grupos aminos que le confieren al soporte características de intercambio iónico.

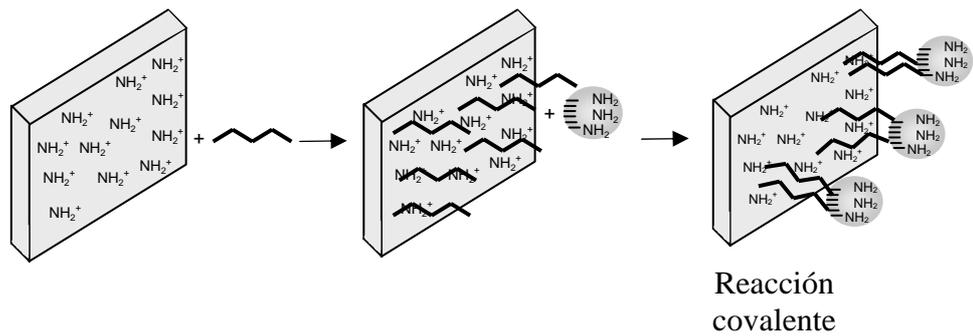


Figura 2.13. Inmovilización de proteínas sobre soportes aminados pre-activados con glutaraldehído

2.5. Reactores enzimáticos con enzimas inmovilizadas

La inmovilización de enzima sobre soportes poliméricos ha sido uno de los métodos ensayados para solventar las desventajas del reactor discontinuo, ya sea mediante la fijación química o física a una superficie sólida, o mediante la confinación física de la enzima en un soporte, de manera que se retienen sus propiedades catalíticas (Cheryan, 1998).

Las principales ventajas que presenta esta técnica son:

- Permiten la operación continua.
- Las enzimas inmovilizadas pueden ser reutilizadas, reduciendo los costos de producción que conllevan los procesos a gran escala.

Sin embargo, las técnicas de inmovilización también presentan inconvenientes:

- Se han descrito en la literatura pérdidas de actividad entre el 10-90% (dependiendo del método de inmovilización) debidas a restricciones en la difusión, especialmente con sustratos coloidales y de alto peso molecular.

Las técnicas de inmovilización y los soportes empleados son caros, especialmente en operaciones a pequeña escala (como en el caso de productos farmacéuticos). Los costos de inmovilización incluyen los costos del material soporte y del proceso de fijación de la enzima. Si se puede reutilizar el soporte, los costos no influyen tan decisivamente en el costo total de operación.

2.5.1. Reactores de membrana

Un reactor de membrana consiste en el acoplamiento de un módulo de separación de membranas a una unidad de reacción.

La membrana es un medio semipermeable, que crea una barrera físico-química selectiva al paso de determinadas especies. Las especies permeables se separan selectivamente de la mezcla de reacción debido a la existencia de una fuerza impulsora (potencial químico, presión o campos eléctricos) que genera el movimiento de solutos a través de la membrana (por difusión, convección o migración electroforética, respectivamente). Por otra parte, la membrana rechaza por completo la enzima, que se recircula al recipiente de reacción, donde se pone en contacto con nuevo sustrato. Dado el tamaño molecular de la mayoría de las enzimas (generalmente entre 10-100 kDa), la mayoría de los reactores enzimáticos de membrana están equipados con membranas de ultrafiltración.

Según Prazeres y Cabral (1996) los reactores enzimáticos de membrana se clasifican en:

- *Reactores de difusión.* En esta configuración, el contacto entre enzima y sustrato no se produce en el recipiente que contiene la enzima, sino que el contacto se

establece sólo después de la difusión de las moléculas de sustrato a través de los microporos de la membrana hacia el compartimento donde está la enzima (soluble o inmovilizada).

Los reactores de flujo de pistón o de fibra hueca son los más utilizados dentro de los reactores de difusión. En este caso, la enzima se sitúa (en el mayor número de casos, de forma inmovilizada) en el lado de la carcasa del módulo de membrana y la corriente de sustrato pasa a través de las fibras.

- *Reactores de contacto directo*, donde el sustrato y la enzima se encuentran juntos en solución en un tanque de reacción y la membrana separa el catalizador de los productos de reacción. Los reactores de contacto directo se pueden subdividir a su vez en:

a) Configuración en celda. En estos reactores, la enzima se carga inicialmente y el sustrato se alimenta en continuo bajo presión con el mismo caudal que la salida de permeado a través de la membrana. Se emplea agitación magnética para reducir el ensuciamiento de la membrana.

b) Reactores de diálisis. En estos reactores se ponen en contacto dos corrientes, una a cada lado de la membrana. El sustrato se añade a la corriente que contiene la enzima. El producto formado puede atravesar la membrana hacia la segunda corriente debido a la existencia de un gradiente de concentraciones entre ambos lados de la membrana.

c) Reactores de membrana agitados con recirculación. Están formados por un tanque agitado de reacción al que se le acopla un módulo de ultrafiltración. Este tipo de reactores pueden operar de modo discontinuo o continuo. En el primer caso, se emplea

la membrana una vez completada la reacción en el tanque y se reutiliza el retenido en una nueva reacción en el tanque. En el segundo caso, la mezcla reaccionante se pasa continuamente a través de la membrana. La membrana retiene la enzima y los productos de bajo peso molecular la atraviesan. La enzima se recircula continuamente al tanque que se alimenta en continuo con nuevo sustrato. Esta configuración de reactor es la más usada y la que más habitualmente aparece en la literatura (Prazeres y Cabral, 1994).

Rios y otros (2004) recogen las principales ventajas e inconvenientes que conlleva el uso del reactor continuo de membrana. Las ventajas en el uso son:

- Funcionamiento continuo y reutilización del catalizador, que conlleva una alta productividad y capacidad.
- Permite el uso de enzimas libres y solubles en contacto pleno con el sustrato, evitando los problemas habituales en reactores de enzima inmovilizada (pérdidas de actividad y restricciones en la difusión).
- Reducción de la inhibición por sustrato o por producto, lo cual permite alcanzar una alta conversión del sustrato.
- Producto final libre de enzima.
- Control de las propiedades del producto final, en primer lugar, debido a la especificidad de las enzimas y en segundo, por el corte de la membrana elegida.

Sin embargo, el reactor continuo de membrana presenta algunas desventajas:

- Pérdida de actividad enzimática debido a fugas de catalizador, desactivación térmica.
- Heterogeneidad de las condiciones de reacción entre el núcleo de la reacción y la superficie de la membrana.
- Ensuciamiento de la membrana.

- Formación de una capa de polarización por concentración.

2.6. Cinética de la reacción de hidrólisis de la lactosa catalizada por la enzima β -Galactosidasa

El modelo más utilizado para describir la cinética de la reacción de hidrólisis de la lactosa por la enzima β -Galactosidasa es el conocido como de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto. Una forma de análisis se basa en la teoría del estado estacionario que propone la existencia de un estado transiente muy breve (del orden de los μ seg) y que la concentración del complejo [enzima-sustrato] es constante frente a la concentración de sustrato y producto (Weetall y Noshir, 1974; Roberts, 1977; Mahoney y Whitaker, 1978; Richmond y Gray, 1981; Kuo-Cheng y otros, 1985; Shang-Tian y Okos, 1989; Santos y otros, 1998; Ladero y otros, 2000; Illanes y otros, 1998, 2001).

El mecanismo de reacción que representa este modelo se muestra en la Figura 2.14

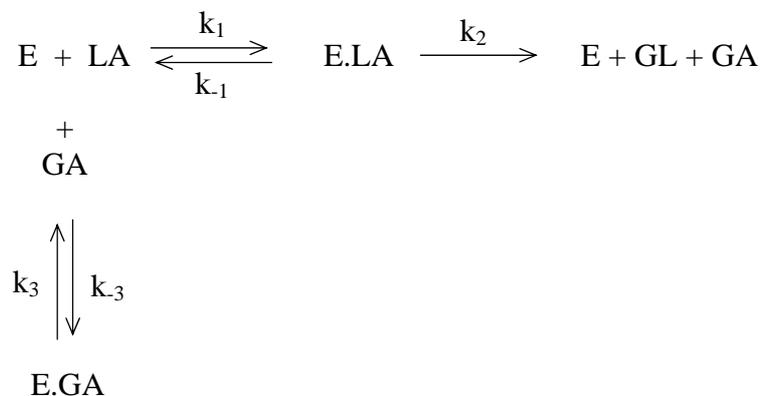


Figura 2.14. Reacción de hidrólisis enzimática

donde: E es la enzima β -Galactosidasa, LA es la lactosa, E.LA es el complejo enzima-sustrato (β -Galactosidasa–lactosa), GL es la glucosa, GA es la galactosa y E.GA es el complejo enzima-producto (β -Galactosidasa–galactosa).

La velocidad de consumo del sustrato se expresa como

$$r_{LA} = \frac{d[LA]}{dt} = -k_1 [LA][E] + k_{-1} [E.LA] \quad (2.1)$$

Si se considera estado estacionario, se puede plantear la velocidad de consumo para el complejo enzima-sustrato (Ecuación 2.2):

$$\frac{d[E.LA]}{dt} = k_1 [LA][E] - k_{-1} [E.LA] - k_2 [E.LA] = 0 \quad (2.2)$$

Por otra parte, teniendo en cuenta la concentración de enzima ligada a la galactosa, [E-GA], la concentración total de enzima, [E₀], puede expresarse de la forma

$$[E_0] = [E.LA] + [E] + [E.GA] \quad (2.3)$$

Haciendo un planteo similar para la reacción de inhibición en estado estacionario:

$$\frac{d[E.GA]}{dt} = -k_3 [E.GA] + k_{-3} [E][GA] = 0 \quad (2.4)$$

donde [GA] es la concentración de galactosa. Despejando [E.GA] de la Ecuación 2.4 y [E.LA] de la Ecuación 2.2, y reemplazando en la Ecuación 2.3 se obtiene:

$$[E_0] = [E] \left(1 + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [LA] + \frac{k_{-3}}{k_3} [GA] \right) = [E] \left(1 + \frac{[LA]}{K_m} + \frac{[GA]}{k_i} \right) \quad (2.5)$$

donde:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{y} \quad k_i = \frac{k_3}{k_{-3}}$$

Despejando [E] de la Ecuación 2.5, suponiendo que $[GA] \approx [GL]$, $[GA] = [LA_0] - [LA]$, y reemplazando en la Ecuación 2.1 se tiene

$$r_{LA} = - \frac{k_2 [E_0] [LA]}{K_m \left(1 + \frac{[GA]}{k_i} \right) + [LA]} = - \frac{V_{max} [LA]}{K_m \left(1 + \frac{[LA_0] - [LA]}{k_i} \right) + [LA]} \quad (2.6)$$

donde $r_{LA} = \frac{d[LA]}{dt}$ y $V_{max} = k_2 [E_0]$

Comparando la Ecuación 2.6 con la ecuación de Michaelis-Menten, el efecto de la inhibición se observa como un incremento de K_m en un valor de $[GA]/k_i$ que dependerá de la concentración de galactosa pero no afecta a la velocidad máxima, V_{max} , o sea que no interfiere en la velocidad de ruptura del complejo enzima-sustrato.

La constante de Michaelis-Menten, K_m , es una constante característica de la enzima, independiente de la concentración de la enzima e indica la afinidad de la enzima por el sustrato en las condiciones del medio de reacción (pH, fuerza iónica, presencia de activadores) y temperatura elegidos (Roberts, 1977).

2.6.1. Integración de la ecuación cinética en un intervalo de tiempo

Es posible integrar la Ecuación 2.6 cuando por las características de la reacción, no resulta posible determinar las velocidades iniciales, extendiendo el rango de tiempos y conversiones a utilizar. Considerando que $[GA] \approx [LA_0] - [LA]$, se obtiene (Ecuación 2.7):

$$\int_0^t [E_0] k_2 dt = - \int_{[LA_0]}^{[LA]} \left\{ \frac{K_m \left(1 + \frac{[LA_0] - [LA]}{k_i} \right) + [LA]}{[LA]} \right\} d[LA] \quad (2.7)$$

que reordenando, puede escribirse:

$$\int_0^t [E_0] k_2 dt = - \int_{[LA_0]}^{[LA]} \left\{ \left(1 - \frac{K_m}{k_i} \right) + \left(K_m + \frac{K_m [LA_0]}{k_i} \right) \frac{1}{[LA]} \right\} d[LA] \quad (2.8)$$

integrando la Ecuación 2.8 resulta:

$$[E_0] t = - \left\{ \left(\frac{k_i - K_m}{k_i} \right) \frac{[LA] - [LA_0]}{k_2} \right\} + \left\{ \left(K_m + \frac{K_m [LA_0]}{k_i} \right) \frac{1}{k_2} \right\} \ln \left(\frac{[LA]}{[LA_0]} \right) \quad (2.9)$$

Si se plantea la variación en términos de conversión, de acuerdo a la Ecuación 2.10:

$$X_{LA} = \frac{[LA_0] - [LA]}{[LA_0]} \quad (2.10)$$

e integrando la Ecuación 2.8 en términos de conversión resulta:

$$[E_0] t = \left\{ \left(\frac{k_i - K_m}{k_i} \right) \frac{[LA_0]}{k_2} \right\} X_{LA} - \left\{ \left(K_m + \frac{K_m [LA_0]}{k_i} \right) \frac{1}{k_2} \right\} \ln (1 - X_{LA}) \quad (2.11)$$

2.6.2. Factores que afectan la cinética de las enzimas

2.6.2.1. Influencia del pH sobre la cinética de reacción

La actividad de las enzimas es muy afectada por el pH. Usualmente cada enzima posee un pH óptimo porque, al igual que las proteínas, las enzimas poseen muchos grupos ionizables de forma que los cambios de pH pueden alterar su conformación, su capacidad de unión con el sustrato y la actividad catalítica de los grupos que forman el centro activo. Los efectos pueden deberse a un cambio en la velocidad de reacción máxima (V_{max}), un cambio en la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m) o una

alteración en la estabilidad de la enzima. La estabilidad depende del tiempo que la enzima haya sido mantenida a un pH desfavorable. De forma similar, los grupos ionizables del sustrato pueden verse afectados por el pH, lo que puede ser importante a la hora de formar el complejo enzima-sustrato. En muchas reacciones enzimáticas industriales el pH no es constante sino que cambia a lo largo de la reacción, dependiendo de la capacidad tamponante de los sustratos y de los productos implicados.

En general, todos estos efectos que se evidencian sobre los parámetros cinéticos, V_{max} y K_m , tienen lugar simultáneamente, aunque también pueden producirse en forma aislada (Roberts, 1977; Wiseman, 1991; Horton y otros, 1995).

El pH óptimo de trabajo se deberá seleccionar estableciendo un compromiso entre los efectos en la actividad y la estabilidad de la enzima (Bailey y Ollis, 1977; Doraiswamy, 1984; Wiseman, 1991).

2.6.2.2. Influencia de la temperatura sobre la cinética de reacción

El tratamiento termodinámico para la dependencia con la temperatura de las reacciones químicas simples, se ajusta perfectamente a las reacciones catalizadas por enzimas, pero en la práctica se presentan algunas complicaciones que deben ser adecuadamente comprendidas y analizadas.

En primer lugar, la mayoría de las enzimas pueden desnaturalizarse si son sometidas a temperaturas mayores a las fisiológicas durante un tiempo prolongado y la conformación puede resultar alterada, en general, de manera irreversible con consecuente pérdida de actividad. La desnaturalización es un proceso químico complejo debido al gran tamaño molecular de las proteínas y por su estructura tridimensional.

En las reacciones catalizadas por enzimas, al igual que en otras reacciones químicas, la velocidad de reacción aumenta al aumentar la temperatura; este aumento de temperatura incrementa la energía cinética de las especies reactivas y se produce un mayor número de colisiones por unidad de tiempo.

El efecto de la temperatura sobre la constante de la velocidad de reacción ha sido descrito por Arrhenius mediante la Ecuación 2.12:

$$K = \kappa_A e^{-E_a/RT} \quad (2.12)$$

donde: K es la constante de la velocidad de reacción constante cinética, κ_A la constante de Arrhenius o factor preexponencial, E_a la energía de activación, R la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta.

En nuestro caso, además de la reacción de hidrólisis aparece una reacción secundaria de desnaturalización. Este se debe a que la actividad de una enzima depende de una estructura terciaria muy ordenada mantenida principalmente por enlaces no covalentes y que permite que el sustrato se acople a la enzima en el sitio activo, si la molécula adquiere suficiente energía, estos enlaces no covalentes pueden romperse (desnaturalización), perdiéndose la configuración de la estructura terciaria y por lo tanto, la actividad catalítica. La constante cinética de esta reacción también responde la ley de Arrhenius en cuanto a su dependencia con la temperatura y puede ser descrita por la Ecuación 2.12

Dado que en las reacciones catalizadas por enzimas, la energía de activación oscila entre 4 y 20 kcal/mol y que para producir la desnaturalización de la proteína se requiere una energía de activación de 40 a 130 kcal/mol, la temperatura óptima de reacción debe ser

el resultado del compromiso entre estos dos efectos. Es decir, el empleo de temperaturas más altas incrementa la actividad de la enzima, pero en detrimento de su estabilidad (Bailey y Ollis, 1977).

Como en el caso del pH, la temperatura también tiene influencia sobre los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) (Roberts, 1977; Wiseman, 1991; Horton y otros, 1995).

2.6.2.3. Influencia de la presencia de efectores sobre la cinética de reacción

De la misma manera que algunas sustancias actúan como inhibidores de una reacción catalizada enzimáticamente, existen otros compuestos que afectan las constantes cinéticas de una reacción catalizada enzimáticamente. Dentro de estas sustancias, los cationes mono y divalentes son los que generalmente producen las mayores alteraciones, ocasionando fundamentalmente un aumento o disminución de K_m (Becker y Evans, 1969; Mahoney y Whitaker, 1977).

Existen diversas hipótesis para explicar estos efectos. Debido a que el sitio activo de una enzima corresponde a una pequeña fracción de su estructura, compuesta por pocos aminoácidos ordenados de tal manera que existe una complementariedad en cuanto a tamaño, forma y naturaleza química de la molécula de sustrato, el mecanismo más aceptado implica la unión no covalente de estos grupos a la estructura de la enzima en las adyacencias del sitio activo, influyendo en las interacciones iónicas, hidrofóbicas, puentes de hidrogeno, etc., a través de las cuales se forma el complejo enzima-sustrato (Roberts, 1977; Wiseman, 1991; Horton y otros, 1995).

2.6.2.4. Efectos del proceso de inmovilización

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar se producen cambios en su estabilidad. En segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno (Arroyo, 1998).

2.6.2.4.1. Efectos en la actividad enzimática

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que:

1. la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido,
2. los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima,
3. la inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva,
4. las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

1) Efectos difusionales: Como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno.

a) *Resistencias difusionales externas:* si el soporte es insoluble en el medio de reacción, el sustrato deberá atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte.

En las proximidades de un soporte no cargado, la concentración de sustrato es menor que en el resto de la disolución, puesto que existe un gradiente de concentración a través de la zona de difusión. Por tanto, los valores de K_m para las enzimas inmovilizadas son siempre aparentes;

b) *Resistencias difusionales internas:* debida a que los sustratos tienen que atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada.

Existen diversas maneras de minimizar estos efectos difusionales (Arroyo, 1998) como por ejemplo: disminuir el tamaño del biocatalizador, aumentar la concentración de sustrato, incrementar la agitación o el flujo en el reactor, etc. Con estas medidas se consigue reducir el grosor de la capa de Nernst, y como consecuencia, el valor de K_m aparente disminuye.

2) *Efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte*, de tal manera que, si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción. Cuando el sustrato y el soporte tienen cargas opuestas, el valor de K_m aparente puede verse reducido hasta varias veces por debajo del obtenido en disolución. Hornby y otros (1968) desarrollaron una expresión matemática que permite calcular la actividad de las enzimas inmovilizadas, teniendo en cuenta tanto los factores de difusión como los electrostáticos. La expresión de Michaelis-Menten en este caso es:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m' + [S]} \quad (2.13)$$

Donde
$$K_m' = \underbrace{\left(K_m + \frac{x \cdot V_{\max}}{D} \right)}_{\text{Término de difusión}} \cdot \underbrace{\frac{RT}{RT - xzF_a\Omega}}_{\text{Término electrostático}}$$

donde x es el espesor de la capa de Nernst; D es el coeficiente de difusión; T es la temperatura absoluta; z la valencia del sustrato; F_a la constante de Faraday; R la constante universal de los gases y Ω es el gradiente de potencial en el soporte. Se puede disminuir el valor de K_m' , variando tanto el término de difusión como el término electrostático. En el primer caso, la disminución del valor de K_m' se consigue al disminuir el tamaño del soporte (con lo que disminuye el término “ x ”) o al aumentar el flujo o la agitación. En el término electrostático, si “ z ” y “ Ω ” tienen el mismo signo, es decir si el soporte y el sustrato tienen la misma carga, el término electrostático es menor de 1 y K_m' aumenta. Si tienen cargas opuestas, la K_m' disminuye. Si no poseen carga, K_m' sólo dependerá del término de difusión.

3) *Impedimentos estéricos o de tamaño de sustrato*. En un principio, cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya una pérdida apreciable de su actividad. Este hecho

suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente. Por ejemplo, muchas hidrolasas unidas covalentemente a soportes sólidos, a pesar de que son muy activas frente a sustratos pequeños, muestran una actividad muy baja hacia proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos (Beresin y otros, 1975). Este “efecto estérico” se puede evitar mediante una inmovilización covalente a través de un brazo espaciador enzima-soporte más largo.

4) Efectos en el microentorno: (Arroyo, 1998; Katchalski y otros, 1971) La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento del intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar. Por ejemplo, una enzima unida a un soporte cargado negativamente (ej. CM-sephadex) tendrá en su microentorno una concentración mayor de hidrogeniones que en el medio de reacción. Como resultado, la enzima inmovilizada será más activa a un pH más alcalino. La enzima sería más activa a pH más ácidos si estuviera unida a un soporte cargado positivamente (ej. DEAE-sephadex).

2.6.2.4.2. Efectos sobre la estabilidad de la enzima

Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones (Wiseman, 1991):

1. *Una estabilización conformacional* de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte.

La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados.

La inmovilización covalente multipuntual se puede combinar con la adición de reactivos bifuncionales que otorgan mayor rigidez a la estructura de la enzima.

2. Una *protección frente a las proteasas* en el medio. Se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis.

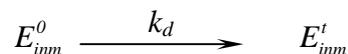
3. *Se evita la agregación intermolecular* al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.

4. Existe una *alteración del microentorno* de la enzima debida a la interacción de la enzima con el soporte. Por ejemplo, si una enzima sensible al oxígeno (como las nitrogenasas, hidrogenasas, etc.) se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como consecuencia, la concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción. En otros casos el soporte tiene un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la afinidad al agua del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima. Cuanto mayor es la hidrofiliidad del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

2.6.2.4.3. Pérdida de actividad y vida media de las enzimas inmovilizadas

La pérdida de actividad de una enzima inmovilizada puede deberse a cambios en su estructura terciaria o ruptura de sus cadenas polipeptídicas producidos por las condiciones de reacción, bloqueos permanentes de los sitios activos por parte de los inhibidores presentes, formación de agregados de moléculas de enzimas que pueden impedir el acceso del sustrato, pérdida de parte de la enzima fijada inicialmente al soporte, etc. Estas causas son difíciles de determinar en forma individual, por lo que resulta conveniente evaluarlas conjuntamente (Henley y Sadana, 1986; 1989).

El modelo más utilizado por su simplicidad, considera la disminución de actividad en el tiempo como una reacción irreversible de *primer orden*:



donde E_{imm}^0 representa a la enzima inmovilizada con actividad inicial; E_{imm}^t la enzima inmovilizada desactivada a un tiempo t y k_d la constante de desactivación.

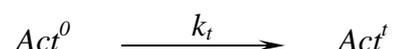
Para una concentración de enzima empleada, la velocidad de desactivación puede expresarse como:

$$\frac{d[E_{imm}^t]}{dt} = -k_d [E_{imm}^t] \quad (2.15)$$

Integrando esta ecuación se llega a una expresión exponencial para la concentración de enzima inmovilizada desactivada a un tiempo t ,

$$[E_{imm}^t] = [E_{imm}^0] e^{-k_d t} \quad (2.16)$$

Como en la práctica resulta imposible medir los valores de concentración de enzima, se puede realizar un planteo análogo en términos de la pérdida de la actividad del biocatalizador, expresada como:



donde Act^0 es la actividad inicial del catalizador; Act^t la actividad del catalizador a un tiempo t y k_t la constante de velocidad de pérdida de actividad. En este caso, la velocidad de pérdida de actividad del catalizador puede expresarse como:

$$\frac{dAct^t}{dt} = -k_t Act^t \quad (2.17)$$

Integrando esta ecuación se obtiene:

$$Act^t = Act^0 e^{-k_t t} \quad (2.18)$$

que nos permite obtener el valor de k_t por regresión lineal de los datos experimentales de $[\ln Act^t/Act^0]$ vs. $[t]$ cuando se emplean expresiones sencillas de cinéticas de reacción.

A fin de poder comparar distintos catalizadores, se determina el tiempo de vida media, $\theta_{1/2}$, que es el tiempo en que la actividad enzimática del biocatalizador disminuye hasta la mitad de su valor inicial ($Act^t = 0,5 Act^0$). Este valor es tomado como control del rendimiento del proceso de inmovilización y evolución del biocatalizador (Wiseman, 1991).

El efecto de la temperatura sobre la constante de pérdida de actividad de la enzima puede ser descrito por Arrhenius como se mencionó anteriormente (Ecuación 2.12)



Capítulo 3

DESARROLLO DEL MODELO TEÓRICO

En el capítulo anterior se realizó el análisis de cada una de las etapas que integran el sistema. Hasta aquí se ha visto la recuperación de las proteínas del suero por ultrafiltración y las correspondientes membranas disponibles. Analizamos la composición del concentrado de proteínas de suero (WPC) y observamos que el mismo posee una alta concentración de lactosa. Por tal motivo, consideramos la posibilidad de hidrolizar la lactosa presente utilizando la enzima β -galactosidasa, y analizamos la conveniencia de trabajar con la enzima inmovilizada para mejorar sus propiedades. El sistema elegido para operar será: recuperar de las proteínas del suero en forma conjunta con la hidrólisis de la lactosa de manera continua.

En este capítulo se analizarán las características más importantes del sistema propuesto para realizar en forma conjunta la hidrólisis de la lactosa y la concentración de las proteínas (Ultrafiltración) del suero de quesería y se obtendrá un modelo que representa tal situación.

3.1. Caracterización de la membrana de Ultrafiltración

3.1.1. Modelo de Hagen-Poiseuille

Se buscó modelar el flujo en función de los parámetros operativos y de las propiedades físicas. El mayor problema reside en la imposibilidad de precisar el fenómeno que ocurre en la superficie de la membrana. Las condiciones planteadas representan una situación ideal, con una distribución y tamaño de poros en la membrana, sin ensuciamiento y una polarización de concentración despreciable. De esta forma el modelo que mejor describe al flujo del fluido a través de una membrana microporosa es el descrito por la ley de Hagen-Poiseuille. El mismo relaciona la caída

de presión, la viscosidad, la densidad y las dimensiones del canal (como el diámetro de un tubo) con la velocidad del flujo a través del canal, es en general analizado por medio del balance de cantidad de movimiento en coordenadas cilíndricas (Bird y otros, 1960). Se hicieron varias suposiciones para llegar al modelo:

- 1) El flujo a través de los poros es laminar (El número de Reynolds es menor a 2100)
- 2) La densidad es constante; el líquido es incompresible.
- 3) El flujo es independiente del tiempo (estado estacionario)
- 4) El fluido es Newtoniano

El modelo que se utiliza en procesos de membranas es:

$$J = \frac{\varepsilon d_p^2 P_T}{32 \Delta x \mu} \quad (3.1)$$

donde J es el flujo a través de la membrana en litros por hora por metro cuadrado; d_p es el diámetro del poro; P_T es la presión transmembrana; μ es la viscosidad del fluido que permea a través de la membrana; Δx es el largo del canal (espesor de la membrana); y ε es la porosidad de la membrana.

De acuerdo con este modelo, el flujo es proporcional con la presión aplicada e inversamente proporcional con la viscosidad. La viscosidad es controlada por dos factores: la concentración de los sólidos (o composición de la alimentación) y la temperatura. Por lo tanto el flujo se incrementa al aumentar la presión o la temperatura. Esto es cierto bajo ciertas condiciones, tales como (a) bajas presiones, (b) bajas concentraciones de la alimentación, y (c) alta velocidad de la alimentación. Cualquier

desviación a estas condiciones determina que el modelo expresado en la Ecuación 3.1 deje de ser válido, por lo que no resulta de gran aplicación.

3.1.2. Modelo de transferencia de materia

Una forma simple de modelar el flujo cuando éste es independiente de la presión es aplicando el modelo de transferencia de materia. Este modelo se muestra esquemáticamente en la Figura 3.1.

Los solutos son transportados a la superficie de la membrana por transporte convectivo a una velocidad J_s , definido por:

$$J_s = J C_B \quad (3.2)$$

donde J es el flujo de permeado en unidades de volumen/tiempo y C_B es la concentración de la alimentación en unidades de masa/volumen. El gradiente de concentración resultante hace que el soluto sea transportado de vuelta a la alimentación debido a los efectos difusionales. Despreciando los gradientes de concentración axiales, el flujo de retroceso resulta:

$$J_s = D \frac{dC}{dx} \quad (3.3)$$

donde D es el coeficiente de difusión en unidades de área/tiempo y dC/dx es el gradiente de concentración en el elemento diferencial de la capa límite. En estado estacionario, los dos mecanismos se igualan, y las Ecuaciones 3.2 y 3.3 pueden ser igualadas y integradas a lo largo de la capa límite, resultando:

$$J = \frac{D}{\delta} \ln \frac{C_G}{C_B} = k \ln \frac{C_G}{C_B} \quad (3.4)$$

donde C_G es la concentración en la capa de gel (la concentración del soluto en la superficie de la membrana), y k es el coeficiente de transferencia de masa que tiene las mismas unidades de J y se calcula a partir de:

$$k = \frac{D}{\delta} \quad (3.5)$$

donde δ es el espesor de la capa límite donde existe el gradiente de concentración.

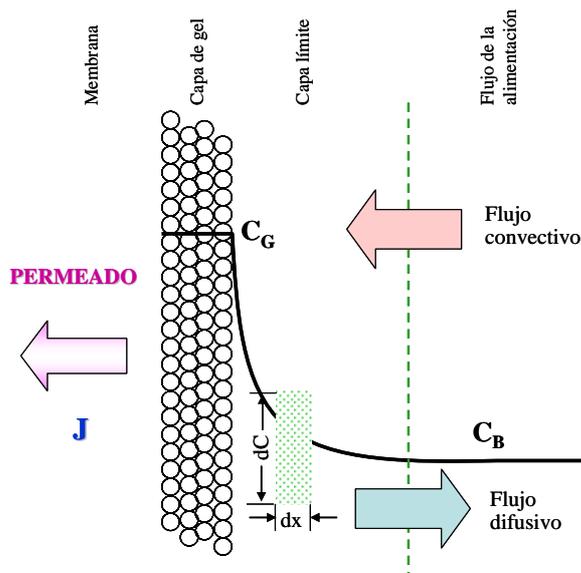


Figura 3.1 Representación esquemática del modelo de transferencia de masa

Este modelo no presenta ningún término que dependa de la presión. Sin embargo la presión afecta al flujo de permeado, por lo que este modelo en particular solo puede ser usado cuando se tienen precisiones sobre la no dependencia del flujo con la presión aplicada. En la mayoría de las operaciones los parámetros C_B y C_G se fijan de acuerdo con las características fisicoquímicas de la corriente de alimentación, por lo tanto el

flujo puede ser incrementado si se aumenta lo suficiente el valor de k . Esto se logra disminuyendo el espesor de la capa límite.

3.1.3. Modelo de Resistencias

Ninguno de los dos modelos analizados anteriormente describe el comportamiento completo del proceso Presión-Flujo que se observa en una operación típica de ultrafiltración. Una mejor aproximación se puede obtener si se utiliza el concepto de “resistencias en serie” que es muy utilizado en transferencia de calor. Para una membrana ideal, la Ecuación 3.1 puede ser escrita:

$$J = \Gamma \frac{P_T}{\mu} \quad (3.6)$$

donde Γ es el coeficiente de permeabilidad de la membrana en unidades de volumen/área de la membrana; y μ es la viscosidad del permeado (no de la alimentación) en pascal-segundo. Para una corriente de alimentación a una dada temperatura, la viscosidad suele estar incluida en el valor de Γ , la cual puede ser escrita como $1/R_M$ donde R_M es la resistencia intrínseca de la membrana determinada usando agua pura en la alimentación:

$$J_{H_2O} = \frac{P_T}{R_M} \quad (3.7)$$

En este caso, los valores de Γ y R_M son útiles no solo para modelar el sistema sino también para evaluar la eficiencia de los procedimientos de limpieza de las membranas y para conocer la estabilidad a largo plazo de la membrana. R_M no debe ser utilizado para evaluar la performance de una membrana en particular bajo condiciones

reales de operación. Con una corriente alimentación real, la resistencia de la membrana en si misma será una pequeña parte de la resistencia total. Por ejemplo, si existe un gran ensuciamiento de la membrana por interacciones entre los solutos con la membrana específica, la resistencia intrínseca de la membrana varía considerablemente. Esto se puede expresar incorporando un nuevo término a la Ecuación 3.7 que corresponde a la resistencia debida al ensuciamiento (R_F):

$$J = \frac{P_T}{R_M + R_F} \quad (3.8)$$

Este tipo de ensuciamiento se considera producido por interacciones fisicoquímicas, por lo que R_F no se verá afectada por los parámetros operativos y frecuentemente es agrupada con R_M obteniendo R'_M , donde $R'_M = R_M + R_F$.

Una nueva resistencia R_G puede ser incorporada al modelo para justificar los efectos de la polarización por concentración y la formación de la capa límite.

$$J = \frac{P_T}{R_M + R_F + R_G} \quad (3.9)$$

donde R_G es una función de los parámetros operativos y de las propiedades físicas. R_G será función de la permeabilidad de la capa de gel y de su espesor, que es una función de la presión aplicada:

$$R_G = \phi P_T \quad (3.10)$$

El término ϕ es función de las variables que afectan la transferencia de masa, tales como la viscosidad, velocidad y temperatura. Por lo tanto el modelo de resistencias resulta:

$$J = \frac{P_T}{R'_M + \phi P_T} \quad (3.11)$$

Este modelo es el más adecuado cuando se lo compara con datos experimentales. A presiones bajas el valor de R_G es muy pequeño comparado con R'_M y el flujo resulta ser solo función de la presión. A altas presiones, el término R_G se vuelve relativamente grande. El flujo es menos dependiente de la presión y se aproxima al valor de $1/\phi$. La presión óptima para operar el sistema será a la cual R'_M es igual a R_G :

$$(P_T)_{\text{óptima}} = R'_M / \phi \quad (3.12)$$

3.2. Modelos matemáticos del flujo de permeado en función del tiempo

La mayoría de los modelos que relacionan el flujo con el tiempo, generalmente tienen una forma exponencial y tienen en cuenta las formas que adoptan las curvas.

$$J_t = J_0 t^{-b} \quad (3.13a)$$

$$J_t = J_0 e^{-bt} \quad (3.13b)$$

$$J_t = J_0 V^{-b} \quad (3.13c)$$

$$J_t = J_{SS} + \kappa e^{-bt} \quad (3.14)$$

donde J_0 es el flujo inicial; J_t es el flujo en el tiempo t ; J_{SS} es el flujo en estado estacionario; y V es el volumen de permeado. Las constantes κ y b caracterizan el ensuciamiento del proceso (Cheryan, 1998). Estos modelos fueron obtenidos de manera empírica por lo que no siempre explican el fenómeno en sí. Algunos modelos predicen que el flujo será cero a tiempo infinito, lo que no ocurre en la práctica.

Otros modelos han sido desarrollados basados en el mecanismo de *bloqueo de poro* (Field, 1996; Jaffrin y otros, 1997). En este caso, se supone que solo una fracción de los poros de la membrana están completamente bloqueados por partículas. Esta fracción es proporcional a la cantidad de flujo de permeado que atraviesa la membrana. Este modelo toma la siguiente forma:

$$J_t = J_0 \exp(-J_0 b t) \quad (3.15)$$

En la literatura se encuentran otros modelos planteados para diferentes aplicaciones. Belfort y otros (1994) hacen una revisión de diferentes modelos que describen el ensuciamiento de las membranas. Otros describen solo el período inicial de decaimiento del flujo (Jaffrin y otros, 1997).

Otra posibilidad es utilizar el modelo de resistencias en serie discutido anteriormente. Partiendo de la Ecuación 3.9, trabajando a presión, velocidad de flujo, temperatura y concentración (reciclo total) constantes, R_M y R_G serán constantes. El flujo puede ser correlacionado con el aumento de R_F .

Además de los modelos analizados encontramos en la literatura un modelo que se adapta adecuadamente a nuestros datos experimentales y, que no solo tiene en cuenta el ensuciamiento de la membrana o fouling sino que también considera el efecto de la polarización por concentración (Lopes y otros, 2008).

El mismo se puede expresar:

$$J_t = \exp[\alpha \cdot (\ln t)^2 - \beta \cdot (\ln t) + \gamma] \quad (3.16)$$

donde J_t es el flujo de permeado ($L h^{-1} m^{-2}$), t el tiempo (min) y α , β y γ son los parámetros responsables de la disminución del flujo de permeado en ultrafiltración utilizando membranas: polarización por concentración y fouling, debido a la absorción y al depósito de proteínas. Con este modelo se soluciona el problema del flujo cero cuando el tiempo tiende a infinito.

Los parámetros del modelo pueden ser estimados a través de los ajustes de los perfiles de los flujos de permeado utilizando la Ecuación 3.16. De los tres parámetros, α y β son los más significativos para representar la polarización por concentración y el “fouling”, respectivamente.

3.3. Hidrólisis de la lactosa presente en el suero de quesería

La hidrólisis de la lactosa que contiene el suero de quesería se realiza, como ya se mencionó, en conjunto con la concentración de las proteínas. El objetivo es obtener un producto final con bajo contenido de lactosa. En general, las industrias lácteas obtienen concentrados de proteínas de suero (WPC) que van desde un 35% hasta un 80% de proteínas, siendo los WPC más comunes los que poseen menos cantidades de proteínas. Esto se debe principalmente a cuestiones de costos, ya que cada etapa de concentración implica grandes costos operativos. Ahora bien, estos concentrados, en especial el de 35% de proteínas, contienen grandes cantidades de lactosa en su formulación (alrededor del 50%). Esta lactosa no provoca inconvenientes tecnológicos cuando se utiliza WPC en bajas cantidades, pero cuando se requiere una mayor cantidad de proteínas es donde aparecen los problemas ya que la lactosa cristaliza dando como resultado un producto con características indeseadas. A su vez, si la lactosa es hidrolizada la utilización de los WPC podría ser más difundida: se disminuyen

drásticamente los problemas por intolerancia a la misma que presenta un gran parte de la población en especial los bebés y niños.

3.3.1. Estimación de los parámetros cinéticos

Como ya se analizó en el capítulo 3, la cinética de reacción de la hidrólisis de la lactosa utilizando a la enzima β -galactosidasa como catalizador, puede ser explicada por el modelo de Michaelis-Menten con inhibición competitiva de la galactosa.

Los métodos para determinar las constantes cinéticas de los modelos utilizados en catálisis enzimática son variados. La aplicación de alguno de ellos puede presentar problemas debido a la complejidad del sistema reaccionante.

Los más utilizados consisten en obtener velocidades iniciales por diferenciación gráfica de las curvas parametrizadas de concentración de sustrato e inhibidor, graficando estos valores directamente o bien se linealiza a partir de los métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee o Hanse entre otros (Carrara, 1994; Roberts, 1977)

En estos casos se debe disponer de datos experimentales de velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. Sin embargo, las determinaciones experimentales generalmente representan concentración de sustrato en función del tiempo, obteniéndose las velocidades por simple aproximación lineal.

Otra alternativa implica la integración analítica de la ecuación diferencial cuando las determinaciones experimentales son concentraciones de sustrato a diferentes tiempos de reacción. Este método es mucho más preciso ya que utiliza una regresión no lineal de los datos experimentales en su forma natural, esto es, concentración de sustrato en función del tiempo. La forma matemática de la ecuación integrada representa la

principal dificultad del método, en general incluye funciones logarítmicas que hacen que el método sea poco robusto frente a diferentes inicializaciones.

Los métodos de regresión no lineal requieren ser inicializados. Puede suceder que la ecuación integrada no sea una función explícita, que por supuesto conlleva problemas adicionales. Esto puede observarse en los modelos cinéticos sin inhibición, siendo aún más complejo cuando se trabaja con inhibición.

$$[LA] = k_2 [E_0] t + K_m \ln\left(\frac{[LA_0]}{[LA]}\right) + [LA_0] \quad (3.17)$$

$$[E_0] t = \frac{[LA_0] - [LA]}{k_2} - \frac{K_m}{k_2} \ln\left(\frac{[LA]}{[LA_0]}\right) \quad (3.18)$$

La ecuación 3.18 requiere de un método numérico de búsqueda de raíces para obtener la solución, es decir, requiere de una solución para resolver el método numérico y otra para resolver el problema de mínimos cuadrados. Existe una alternativa propuesta por Shang-Tian y otros (1989), que expresa la ecuación en forma inversa (tiempo vs. concentración de sustrato), evitando el método de búsqueda de raíces.

3.4. Desarrollo del modelo para el sistema estudiado

Para el planteo del modelo que describe el proceso simultáneo de hidrólisis de lactosa y ultrafiltración del suero de quesería, se tomó como base el desarrollo llevado a cabo por Hatzinikolaou y otros (2005), que resulta similar en algunos aspectos. La construcción del modelo está basado en el esquema general que se muestra en la Figura 3.2. El mismo está compuesto por un tanque agitado cuyo volumen de trabajo es V_t y contiene el suero de quesería previamente acondicionado y termostatizado. El suero es

bombeado con una bomba de desplazamiento positivo a la unidad de ultrafiltración a un caudal F_1 , el retentado puede ser recirculado al dispositivo de mezcla, a un caudal F_3 . El permeado de la unidad de UF es el producto resultante del proceso completo de hidrólisis-ultrafiltración, con un caudal F_2 . Las suposiciones que se realizaron para la construcción del modelo matemático son las siguientes:

- ~ El volumen en las cañerías puede considerarse despreciable.
- ~ La unidad de ultrafiltración es el único lugar que donde se lleva a cabo la reacción de hidrólisis. El volumen donde se lleva a cabo la reacción, V_r , es constante.
- ~ El proceso se lleva a cabo a presión constante siendo el caudal función del tiempo.
- ~ No hay pérdida de enzima.
- ~ La desactivación enzimática sigue una cinética de primer orden, donde k_t es la correspondiente constante de desactivación y es función de la temperatura del proceso de acuerdo con la Ecuación 3.12:
- ~ La hidrólisis de la lactosa por β -galactosidasa sigue una cinética de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por galactosa.

$$r_{GL} = r_{GA} = -r_{LA} = \frac{k_2[E][LA]}{[LA] + K_m \left[1 + \frac{[GA]}{k_i} \right]} \quad (3.19)$$

Para abarcar todas las características del proceso, se seleccionó el estado transiente para el planteo del modelo. El proceso comienza cuando el volumen donde se produce la reacción se llena completamente con el suero ($t = 0$) que posee una concentración de lactosa inicial $[LA_0]$, donde cierta cantidad de enzima $[E_0]$ se encuentra inmovilizada en la membrana. A continuación se describen las ecuaciones

diferenciales que describen al proceso teniendo en cuenta las suposiciones realizadas y las condiciones iniciales.

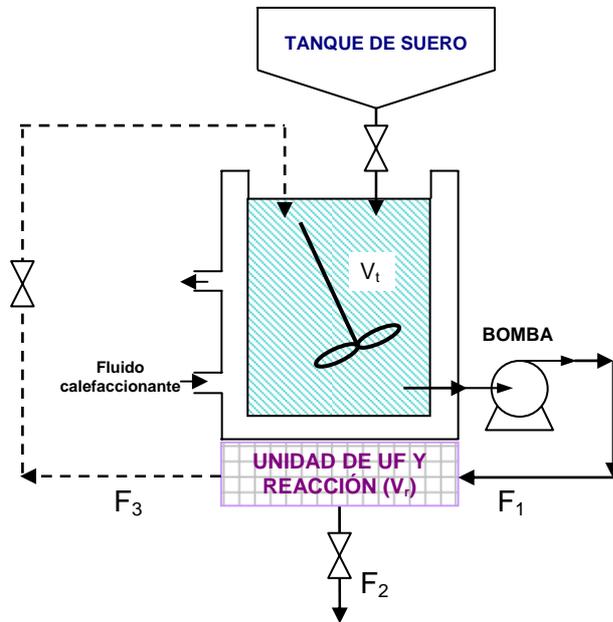


Figura 3.2. Esquema general del proceso simultáneo de ultrafiltración – hidrólisis de lactosa

1. Tiempos de residencia – Volumen de reacción

El balance de materia en volumen donde se lleva a cabo la reacción es el siguiente:

$$\frac{dV}{dt} = F_1 - F_3 - F_2 \quad (3.20)$$

Como el volumen de reacción permanece constante, resulta:

$$F_1 = F_3 + F_2 \quad (3.21)$$

y, en el caso que no existiera reciclo, $F_1 = F_2 = F(t)$ en estado transiente.

2. Concentración de Lactosa

El balance de materia para la lactosa en el volumen de reacción puede escribirse de la siguiente manera:

$$V_r \frac{d[LA_2]}{dt} = F_1[LA_1] - F_3[LA_3] - F_2[LA_2] + V_r r_{LA} \quad (3.22a)$$

Para el caso de que no exista reciclo, resulta:

$$V_r \frac{d[LA_2]}{dt} = F_1[LA_1] - F_2[LA_2] + V_r r_{LA} = F([LA_1] - [LA_2]) + V_r r_{LA} \quad (3.22b)$$

Si se sustituye el modelo cinético para la β -galactosidasa (Ecuación 3.19)

$$\frac{d[LA_2]}{dt} = \left(\frac{F(t)}{V_r} \right) ([LA_1] - [LA_2]) - \frac{k_2[E][LA_2]}{[LA_2] + K_m[1 + ([GA_2]/k_i)]} \quad (3.22c)$$

con la condición inicial: a $t = 0$, $[LA_2] = [LA_0]$

La Ecuación 3.22c toma la forma final si se sustituye $F(t)$ por el producto del modelo de flujo de permeado (J_i) y área de la membrana de ultrafiltración (A), resultando

$$\frac{d[LA_2]}{dt} = \left(\frac{J_i A}{V_r} \right) ([LA_1] - [LA_2]) - \frac{k_2[E][LA_2]}{[LA_2] + K_m[1 + ([GA_2]/k_i)]} \quad (3.22)$$

3. Concentración de glucosa y galactosa

Un análisis similar al de la lactosa, nos da como resultado las siguientes ecuaciones diferenciales que describen los cambios de concentración de la galactosa y la glucosa en el reactor enzimático:

$$\frac{d[GA_2]}{dt} = \left(\frac{J_i A}{V_r} \right) [GA_2] + \frac{k_2 [E] [LA_2]}{[LA_2] + K_m [1 + ([GA_2]/k_i)]} \quad (3.23)$$

con la condición inicial: a $t = 0$, $[GA_2] = 0$

$$\frac{d[GL_2]}{dt} = \left(\frac{J_i A}{V_r} \right) [GL_2] + \frac{k_2 [E] [LA_2]}{[LA_2] + K_m [1 + ([GA_2]/k_i)]} \quad (3.24)$$

con la condición inicial: a $t = 0$, $[GL_2] = 0$

4. Concentración de la enzima: Pérdida de actividad del catalizador

El balance de masa diferencial de la concentración de enzima (β -galactosidasa) en el volumen de reacción es el siguiente:

$$V_r \frac{d[E]}{dt} = V_r r_d \quad (3.25a)$$

teniendo en cuenta que no ingresa enzima al reactor y además no hay pérdida de la misma durante la operación. Como ya se mencionó anteriormente, la velocidad de pérdida de actividad de la enzima sigue una cinética de primer orden, resultando la ecuación anterior,

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_t [E] \quad (3.25)$$

con la condición inicial: a $t = 0$, $[E] = [E_0]$

Las ecuaciones (3.23)-(3.25) describen el estado transiente del sistema continuo hidrólisis-ultrafiltración de suero de quesería. El sistema de ecuaciones diferenciales puede ser integrado simultáneamente para varias condiciones experimentales, de manera tal de evaluar el efecto de los parámetros del proceso en la performance del sistema. Se utilizó el software MATLAB R2008a para la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales y para realizar las simulaciones. Las rutinas de programación se muestran en los correspondientes anexos.



Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1. Materiales

4.1.1. Sustrato

Para los estudios, se utilizaron soluciones de lactosa, permeado y suero dulce de quesería obtenidos industrialmente por la empresa Milkaut S.A. Mediante la determinación de nitrógeno en un equipo Kjeldhal Büchi 342 con unidad de destilación y titulador automático, se determinó el tenor de proteínas totales presentes en las corrientes de alimentación y permeado cuando se trabajó con suero dulce de quesería. Las soluciones fueron preparadas con el mismo tenor de lactosa que los sueros disponibles.

4.1.2. Selección de la membrana de ultrafiltración

4.1.2.1. Tamaño nominal de corte

La membrana seleccionada debe cumplir con una condición fundamental: el tamaño nominal de corte debe ser suficientemente pequeño para asegurar que no existe paso de la enzima a través de la membrana. La fuga o paso de enzima a través de la membrana, se detecta mediante la determinación de la actividad enzimática en el filtrado. Además, la membrana debe permitir el pasaje de productos liberados durante la reacción.

La selección del tamaño de corte de la membrana se efectúa teniendo en cuenta el tamaño de las proteínas presentes en el suero y el de la enzima empleada. El tamaño de corte debe ser tal que las proteínas queden retenidas en la membrana y que la enzima también quede retenida cuando está siendo inmovilizada.

4.1.3. Enzima

Se utilizó una preparación comercial de la enzima β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23), de *Kluyveromyces fragilis* (Lactozym 3000 L de Novozymes, Dinamarca). Las características físicas de la preparación utilizada, se muestran en la tabla:

Tabla 4.1. Características físicas de la preparación comercial de la enzima

Características	Lactozym 3000 L
Presentación	Líquida
Densidad	1.20 g/ml
Concentración de proteínas	35.09 mg/ml

Para esta enzima, la actividad se expresa a través del número de unidades de lactasa (LAU), que según declara el fabricante es de 3000 LAU/ml. A su vez, una LAU se define como la cantidad de enzima que es capaz de liberar un μ mol de glucosa por minuto bajo las condiciones indicadas en la siguiente tabla:

Tabla 4.2. Condiciones estándar para la determinación del número de LAU

Sustrato	Sol. de lactosa 4.7% p/v
pH	6,7
Temperatura	37 °C
Concentración de Enzima	0.035-0.1 LAU/ml
Sistema tampón	Tampón lácteo (0.025 M KH_2PO_4 , 0.025 M Na_2HPO_4 y 1.0 mM de MgSO_4)

4.2. Métodos Analíticos

4.2.1. Determinación de la actividad de la enzima y grado de hidrólisis

La actividad de la enzima fue medida siguiendo la reacción de hidrólisis de lactosa, considerando que se cumple la estequiometría de la reacción, obteniéndose sendas moléculas de glucosa y galactosa por molécula de lactosa hidrolizada. De la misma manera, el grado de hidrólisis se determinó midiendo la concentración de glucosa liberada por dosaje enzimático, empleando para ambos casos un kit de reactivos para determinación enzimática de glicemia (Wiener Lab., Rosario, Argentina), midiendo la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic Genesys 5 y comparando con un estándar.

Conociendo la cantidad de enzima utilizada, se calcula la actividad específica de la siguiente forma:

$$Act = \frac{[GL] V_r 10^6}{M t p^{enz}} \quad (4.1)$$

donde:

- *Act* es la actividad específica de la enzima definida como el número de μ moles de glucosa liberada por min y por g de enzima;
- *[GL]* es la concentración de glucosa (en g/l) determinada en la muestra;
- *V_r* es el volumen (lt) de la mezcla reaccionante;
- *M* es el peso molecular de la glucosa (180 g/gmol);

- t es el tiempo (min) de la hidrólisis y
- p^{enz} es la masa (g) de enzima utilizada.

Para permitir una rápida comparación entre diferentes condiciones, se calcula la actividad relativa, considerando la actividad desarrollada en las condiciones de utilización aconsejadas por el proveedor mediante la siguiente ecuación.

$$Act_{r\%} = \frac{Act_e}{Act_{es}} 100 \quad (4.2)$$

donde:

- $Act_{r\%}$ es la actividad relativa porcentual de la enzima;
- Act_e es la actividad específica de la enzima en las condiciones ensayadas y
- Act_{es} es la actividad específica de la enzima en las condiciones estándares aconsejadas por el proveedor.

4.2.2. Caracterización del flujo a través de la membrana

La determinación del caudal de filtrado frente a la presión transmembrana se explica a continuación: se pasa agua deionizada a 20 °C a través de la membrana de ultrafiltración y se mide el caudal de filtrado a diferentes presiones transmembrana. La medición del caudal de filtrado se realiza siguiendo el siguiente protocolo: se fija la presión transmembrana aplicada hasta obtener lecturas manométricas estables. Una vez estabilizada la presión, se recoge agua proveniente del canal de filtrado de la membrana durante 1 minuto en una probeta graduada. El cociente entre el volumen de filtrado

obtenido y el tiempo de filtración necesario es el caudal de filtrado para una presión transmembrana fijada. Esta operación se repite para varios valores de presión transmembrana.

La relación entre el caudal de filtrado de agua y la presión transmembrana aplicada permite estimar la permeabilidad de referencia para la membrana de ultrafiltración.

Este valor de referencia es característico de la membrana nueva y sirve para indicar la recuperación de la membrana después de cada limpieza, comparando los caudales de agua obtenidos para una presión dada cuando la membrana está nueva (esto es, limpia) y los valores tras un uso continuado. Para la estimación del nivel de recuperación de la membrana, se repite la operación descrita anteriormente para la determinación del caudal de filtrado en función de la presión aplicada después de cada uso y la subsiguiente limpieza. El cociente entre el caudal tras la limpieza y el caudal de agua de referencia a una presión transmembrana determinada es el porcentaje de recuperación de la membrana. Cuando el porcentaje de recuperación es inferior al 50 % después de varias limpiezas se considera que el módulo de membrana empleado se ha colmatado de manera irreversible y se procede a su sustitución. La relación entre caudal de filtrado con agua y presión debe determinarse para cada nuevo módulo usado.

4.2.2.1. Ensuciamiento de la membrana

Para la determinación del caudal de filtrado de suero frente a la presión transmembrana se filtra suero de quesería a través de la membrana, registrando el caudal de filtrado a diferentes presiones aplicadas. Se acondiciona el pH del suero en 6.9. La

filtración se realiza a 50 °C. El caudal se mide del siguiente modo: se parte del valor más bajo de presión transmembrana a ensayar, y una vez estabilizada la presión, se recoge en una probeta graduada el caudal de filtrado obtenido durante 1 minuto de filtración. El cociente entre volumen recogido y tiempo de filtración es el caudal a la presión fijada. A continuación se aumenta la presión hasta el siguiente valor de ensayo y se mide el caudal de la misma manera, y así sucesivamente hasta llegar al mayor valor del ensayo. Finalmente se ensayan los mismos valores de presión transmembrana pero en orden descendente, es decir, partiendo del valor más alto se baja la presión hasta llegar al menor. El objetivo de repetir las medidas de caudal en orden descendente de presión transmembrana es comprobar si en el comportamiento de la membrana aparecen fenómenos de histéresis.

La determinación de la relación entre caudal de filtrado y presión transmembrana permite calcular el óptimo de presión de operación.

4.3. Reactor de membrana

4.3.1. Unidad de reacción y separación

Para el estudio del proceso conjunto de recuperación de proteínas e hidrólisis de la lactosa se utilizó un dispositivo agitado de 500 ml de volumen útil, con camisa de circulación de agua para la regulación de la temperatura, conectada a un baño termostático y equipado con una membrana de ultrafiltración con la enzima inmovilizada covalentemente. El volumen del cassette de ultrafiltración es de 8 cm³.

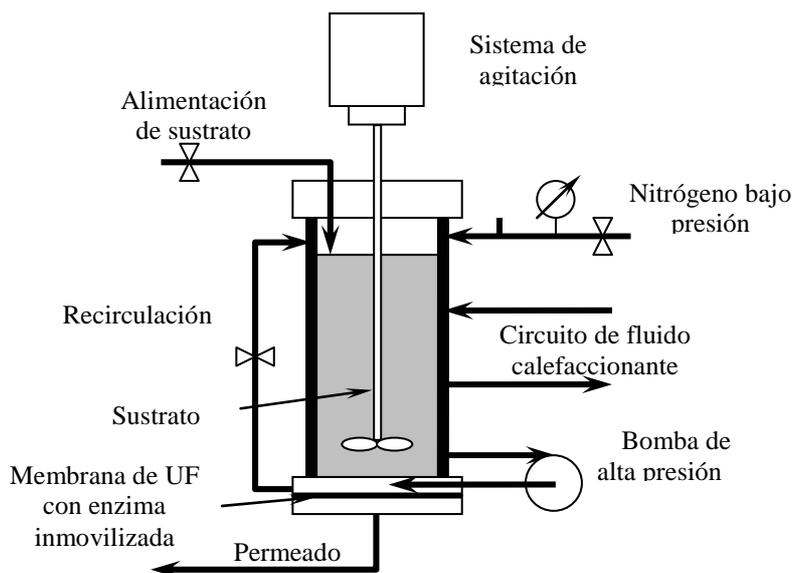


Figura 4.1. Esquema del sistema utilizado para la hidrólisis de lactosa conjuntamente con la recuperación de proteínas

El sistema se equipó con una membrana plana circular (7.5 cm de diámetro) de poliétersulfona (PES) (Omega, Estados Unidos de América) de 10 kDa de tamaño de corte y de un área efectiva de filtración de 16.2 cm² (36.7% de la superficie disponible). La membrana, que posee un rango de operación de 1 a 14 unidades de pH y de 0 a 60°C de temperatura, fue acondicionada de acuerdo a las especificaciones del proveedor y montada en el dispositivo mediante un casete de filtración tangencial. La porosidad de la membrana es 0.33.

4.4. Preparación y caracterización biocatalizador

4.4.1. Activación de la membrana

Para la posibilidad de la inmovilización en forma covalente de la enzima sobre la membrana, esta última fue activada con diferentes concentraciones de glutaraldehído (1,5 pentanodial) (Merck, Alemania).

La activación fue realizada con la membrana montada en el dispositivo de reacción, recirculando en reciclo total una solución de glutaraldehído al 2.5; 5.0 o 7.5% (v/v) en NaOH 0.2 M a 35 °C por un período de 1 h. Después de la activación, la membrana fue exhaustivamente lavada con tampón fosfato 100 mM de pH 7.5 a temperatura ambiente para retirar el exceso de glutaraldehído.

4.4.2. Inmovilización covalente de la enzima.

Al igual que la activación, la inmovilización covalente de la enzima sobre la membrana activada se realizó con la membrana montada en el mismo dispositivo de reacción. Una solución al 10% (v/v) de la enzima, con o sin agregado de 0.03 M de galactosa en tampón fosfato 100 mM de pH 7.5 se hizo permear por el sistema a 30 °C, con reciclo total, por un período de 2 hs. Posteriormente, la membrana fue lavada exhaustivamente con una solución al 1,5% (m/v) de KCl en tampón fosfato 100 mM de pH 7.5 para permitir el lixiviado de la enzima no ligada covalentemente. Finalmente, se realizó un acondicionamiento final mediante el recirculado de una alícuota de tampón fosfato 100 mM de pH 6.9 a temperatura ambiente.

4.4.3. Efectividad del proceso de inmovilización y determinación de la cantidad de enzima ligada

Para cada uno de los ensayos de inmovilización realizados se estimó la cantidad de enzima fijada covalentemente en la membrana ($Prot_{imm}$) por diferencia entre la cantidad de proteína en el sobrenadante, al inicio de la inmovilización ($Prot_0$) y al finalizar el proceso de inmovilización ($Prot_f$), medidas por el método de Bradford (1976); y se determinó la actividad conseguida en cada caso.

Asimismo, para verificar los efectos del proceso de inmovilización, se estimó un índice de recobro de actividad en cada uno de los ensayos de inmovilización realizados (*IRA*), relacionando la actividad total conseguida en la membrana con la correspondiente a una misma cantidad de enzima libre que permaneciera en el sobrenadante al finalizar el proceso de inmovilización, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$IRA\% = \frac{Act_{imm}}{Prot_{imm} \left(\frac{Act_f}{Prot_f} \right)} * 100 \quad (4.3)$$

donde: Act_{imm} es actividad total expresada por la enzima inmovilizada y Act_f es la actividad expresada por la enzima en todo el sobrenadante al final del proceso de inmovilización, ambas determinadas utilizando como sustrato solución de lactosa al 5% (p/v) en un tampón fosfato 100 mM de pH 6.9.

4.4.4. Ensayos de permeación.

Dado que la presión, pH y temperatura de trabajo condicionan la velocidad de permeación a través de la membrana de ultrafiltración, se realizaron ensayos de permeabilidad a 55 °C empleando sueros de quesería acondicionados a diferentes pH.

4.4.5. Ensayos de hidrólisis.

Las experiencias fueron realizadas a 55 °C, siguiendo el grado de hidrólisis en el sistema reaccionante hasta que la actividad de la enzima se redujo a la mitad del valor inicial (tiempo de vida media).

Las condiciones operativas en las que se realizaron las experiencias fueron:

- ~ Concentración de agente activante: 2.5; 5.0 y 7.5% (m/v).
- ~ Rango de concentraciones de presiones de trabajo: de 1 a 5 bar a intervalos de 1 bar.
- ~ Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

4.4.6. Ensayos de estabilidad térmica a 55 °C

Tanto la enzima libre como la membrana con la enzima inmovilizada fueron incubadas a 55 °C en tampón fosfato 100 mM de pH 6.9. A intervalos de tiempo predeterminados se determinó la actividad enzimática de cada muestra, expresando la actividad residual como una fracción de la actividad inicial. Para la estimación del tiempo de vida media ($\theta_{1/2}$) se empleó el modelo de desactivación térmica de la actividad enzimática propuesto por Sadana-Henley (Sadana y Henley, 1987; Sadana, 1991), el que puede ser simplificado por un aparente proceso de primer orden definido por dos parámetros:

$$Act_t / Act_0 = (1 - \eta) \exp(-k_t t) + \eta \quad (4.4)$$

donde Act_0 y Act_t representan la actividad que posee la enzima al inicio y a un determinado tiempo t , k_t es la constante aparente de desactivación térmica y η representa el cociente entre la actividad residual de la enzima a tiempos muy largos y su valor inicial.

El factor de estabilidad (FE) de cada membrana fue obtenido como el cociente entre el tiempo de vida media de la enzima inmovilizada y el correspondiente a la enzima libre, usando la siguiente ecuación:

$$FE = \frac{\theta_{1/2}|_{imm}}{\theta_{1/2}|_l} \quad (4.5)$$

donde $\theta_{1/2}|_{imm}$ y $\theta_{1/2}|_l$ son los tiempos de vida media de la enzima inmovilizada y de la enzima libre, respectivamente.

4.5. Determinación de las constantes cinéticas para la enzima libre e inmovilizada en la membrana

4.5.1. Usando lactosa como sustrato

La determinación de las constantes cinéticas para la enzima libre se realizó en forma similar a los ensayos de control de actividad, utilizando 20 y 40 μ l de enzima soluble en 20 ml de solución reguladora de pH 6.9 con lactosa como sustrato, en concentraciones de 2.5 – 5.0 – 7.5 y 10.0 % (p/v). Los tubos se incubaron a diferentes temperaturas, agitando ocasionalmente en un agitador de tubos Vortex. La reacción de hidrólisis fue detenida a distintos tiempos, por adición de NaOH. Para los cálculos se determinó la concentración de glucosa liberada durante la reacción a los 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 25 minutos.

Para determinar las constantes cinéticas de la enzima inmovilizada en la membrana, las experiencias se realizaron con el biocatalizador montado en el equipo de

ultrafiltración, descrito anteriormente. En este caso se hicieron permear soluciones de lactosa de distintas concentraciones manteniendo el caudal volumétrico de permeado constante de manera tal de asegurar un tiempo de residencia que permita la hidrólisis de la lactosa. Para los cálculos se determinó la glucosa liberada en la corriente de permeado durante la reacción a diferentes tiempos. Estas experiencias fueron repetidas para distintas temperaturas para obtener la dependencia de las constantes cinéticas con la misma.

4.5.2. Usando permeado como sustrato

Para determinar las constantes cinéticas de la enzima inmovilizada cuando se utiliza permeado de suero de quesería como sustrato se realizaron corridas a tres concentraciones iniciales de lactosa diferentes: 2.5; 4.062 y 5.416% (p/v). Para lograr estas concentraciones se diluyó el permeado utilizando buffer fosfato pH 6.9. En todos los casos el pH fue convenientemente acondicionado.

También se realizaron experiencias a distintas temperaturas, usando en este caso la concentración de lactosa inicial de 5.416% (p/v); de esta manera se encontraron las dependencias de las constantes cinéticas con la temperatura.

4.6. Estudio del comportamiento del biocatalizador en el reactor

Los biocatalizadores obtenidos fueron ensayados en un reactor de membranas, anteriormente descrito. Considerando que la reacción se lleva a cabo en la unidad de ultrafiltración donde se encuentra montada la membrana, se puede aproximar el comportamiento a un reactor tanque agitado continuo.

4.6.1. Variaciones de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos característicos de la operación del sistema se calculan mediante regresión no lineal de mínimos cuadrados. En esta técnica la suma de los errores cuadráticos absolutos de la variable independiente es la función objetivo que se pretende minimizar (Montgomery, 2002).

Para la regresión no lineal se emplea la herramienta Solver de la aplicación Excel de Microsoft Office. Esta herramienta permite minimizar (o maximizar) el valor de una celda objetivo variando un conjunto de celdas seleccionadas. En la resolución de problemas de optimización con funciones no lineales (NLP, Non-linear Programming), Solver utiliza el método del gradiente reducido generalizado (GRG); siempre y cuando la función objetivo o alguna de las restricciones sean funciones continuas y también sus derivadas sean funciones continuas. Los pasos de los que consta el algoritmo GRG son:

1. Cálculo de gradientes a partir de soluciones de prueba
2. Elección del gradiente negativo (si se minimiza, positivo si se maximiza)
3. Evaluación de la segunda derivada para estudiar la curvatura.
4. Evaluación de las restricciones si las hubiera.
5. Localización del óptimo, cuando se obtienen 5 valores de la función objetivo dentro de una tolerancia previamente fijada

4.6.2. Estimación de la constante de desactivación de los biocatalizadores

Se realizaron experiencias utilizando como sustrato suero crudo de quesería previamente acondicionado (pH 6.9), a diferentes temperaturas: 35, 45 y 55°C. Se midió la cantidad de glucosa producida en el tiempo hasta el tiempo de vida media, esto es cuando la actividad disminuyó a la mitad del valor inicial.



Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan en este capítulo los resultados obtenidos analizando los motivos teóricos por los cuales se producen.

5.1. Caracterización de las resistencias de la membrana al flujo

5.1.1. Resistencia de la membrana en función de la presión transmembrana aplicada

En la Figura 5.1 se representan los datos experimentales obtenidos para el flujo de filtrado de agua a diferentes valores de presión transmembrana. Las presiones aplicadas varían entre 1 y 3 bar.

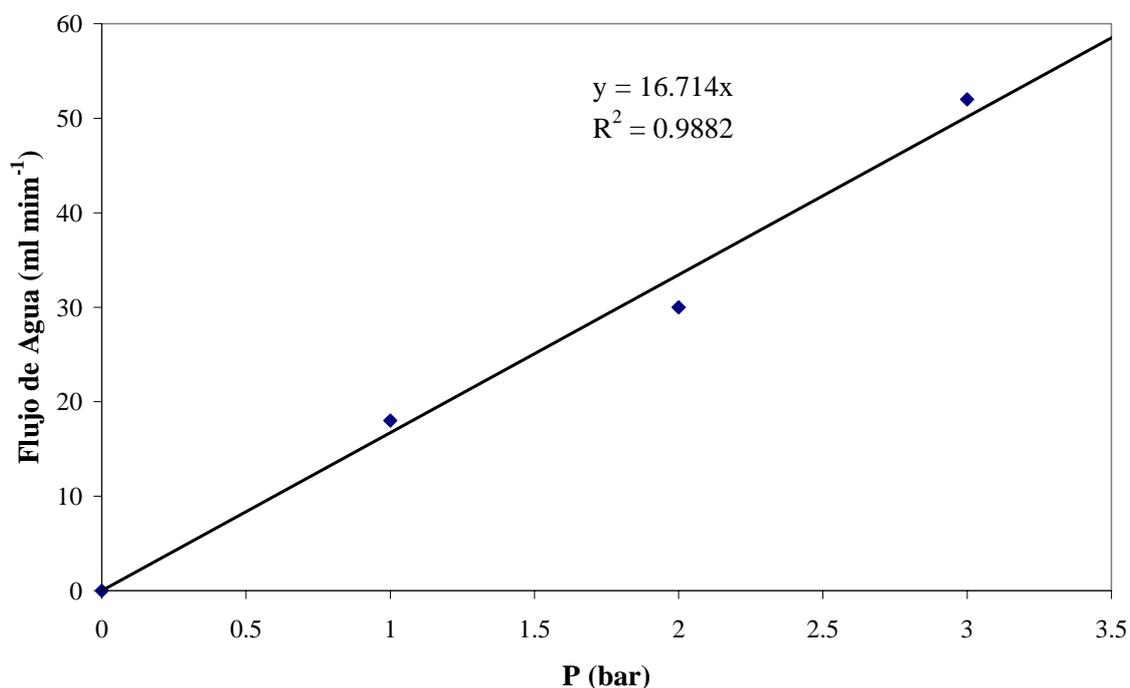


Figura 5.1. Relación entre el flujo de filtrado y presión transmembrana para agua a 20°C

Los datos experimentales se ajustan a una línea recta mediante regresión por mínimos cuadrados, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$J_{H_2O} = 16.714 \cdot P \quad (5.1)$$

con $R^2 = 0.9717$

Según el modelo de resistencias en serie (Cheryan, 1998), el flujo de filtrado de agua (J_{H_2O}) viene dado por la expresión:

$$J_{H_2O} = \frac{P_T}{R_M} \quad (5.2)$$

donde P_T es la presión transmembrana y R_M es la resistencia intrínseca de la membrana para agua pura, igual a la inversa de la pendiente de la recta (Ecuación 5.1):

$$R_M = 0.0598 \text{ bar min mL}^{-1}$$

La permeabilidad de la membrana se define como la inversa de la resistencia intrínseca de la membrana, esto es, $16.714 \text{ mL bar}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Tanto resistencia como permeabilidad son valores característicos de la membrana nueva y se emplean como referencia para calcular el porcentaje de recuperación del módulo de membrana después de cada ciclo de filtración/limpieza.

5.1.2. Flujo de filtrado de suero en función de la presión transmembrana

En la Figura 5.2 se representan los datos experimentales de los flujos iniciales de permeado frente a la presión transmembrana. Las presiones aplicadas varían desde 1 bar hasta 5 bar. La relación flujo de permeado vs. P_T presenta diferencias considerables con respecto al agua. La relación entre el flujo de permeado y presión no se puede ajustar con una sola recta en todo el rango de presión aplicada (como ocurría en el caso del agua).

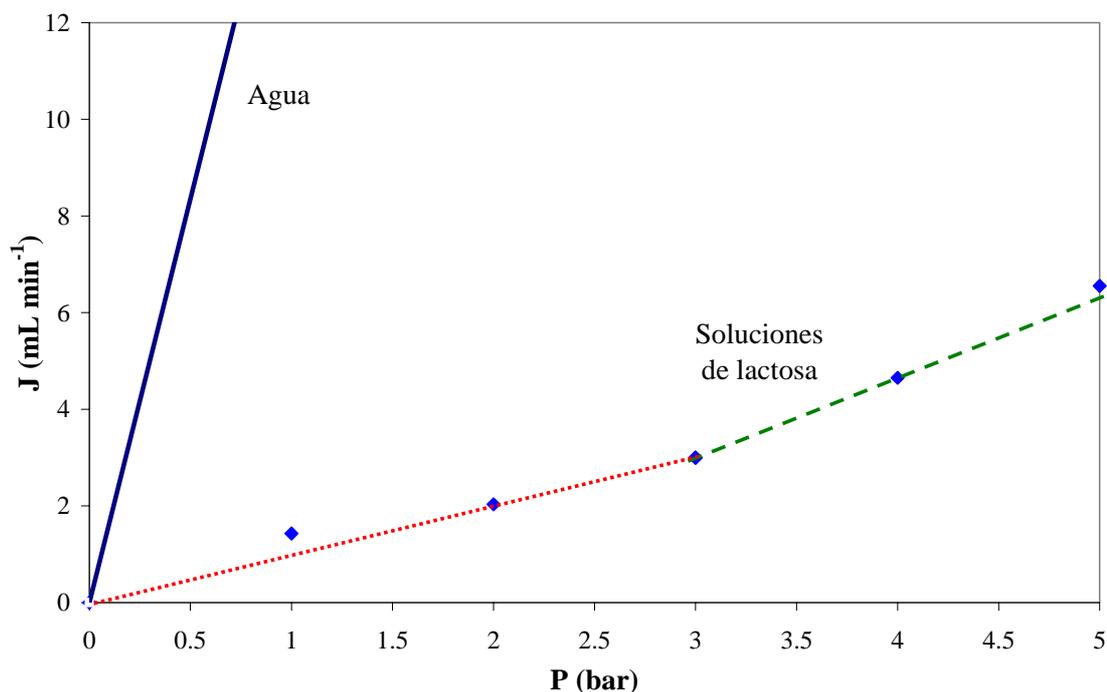


Figura 5.2 Relación entre el flujo inicial de permeado y presión transmembrana para soluciones de lactosa a 55°C y pH 6.9

La presión, pH y temperatura de trabajo condicionan, a su vez la velocidad de permeación a través de la membrana de ultrafiltración. En este caso a medida que se aumenta la presión de trabajo, la velocidad de permeación inicial aumenta. La relación entre el flujo inicial de permeado de soluciones de lactosa y la presión podría representarse, como para el caso del agua, por un recta. Esta correlación no presenta un buen ajuste, por lo que es más conveniente utilizar dos rectas, mejorando de esta manera la correlación de los datos. Por lo tanto, se pueden identificar dos tramos de pendiente diferentes que tienen un punto de intersección aproximadamente en 3 bar de presión. Para el tipo de membrana usada, no se encontraron diferencias en las velocidades iniciales de permeación en ensayos realizados con soluciones de lactosa y con suero crudo (Becker y Evans, 1969). Además, en este rango se estudió el comportamiento de la enzima libre y si bien no se encontró incidencia de la presión de trabajo sobre la

actividad de la enzima, se verificó que en condiciones de operación con suero crudo, a elevadas presiones de trabajo, el flujo de permeado se reduce considerablemente con el tiempo (Cheryan, 1998), siendo más complicado operar el sistema. Por esta razón, se adoptó una presión efectiva de trabajo de 2 bar, produciendo un flujo inicial de permeación de 2.05 ml min^{-1} , que teniendo en cuenta el área del equipo, resulta $0.125 \text{ ml min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. La inmovilización de la enzima se realizó a presión constante.

5.2. Estimación del flujo de permeado

Se obtiene el flujo de permeado en función del tiempo de operación para distintas presiones de trabajo y temperaturas. En la figura 5.3 se pueden observar distintas curvas (datos experimentales) que representan el flujo o caudal de permeado en función del tiempo cuando se utiliza suero crudo de quesería a 55°C y pH 6.9 para diferentes presiones aplicadas.

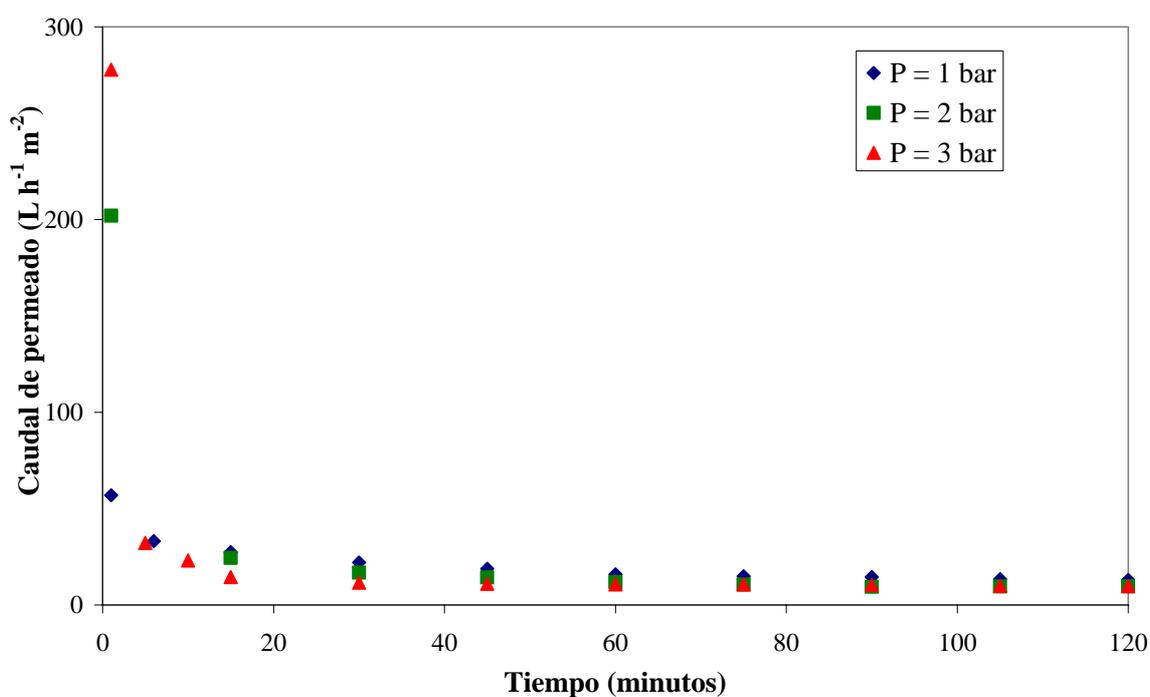


Figura 5.3. Variación del caudal de permeado con el tiempo para suero a 55°C y pH 6.9

Como puede verse, a mayor presión aplicada, los caudales iniciales son más grandes pero caen a una gran velocidad cuando transcurren algunos minutos. Luego, el caudal tiende a estabilizarse con el tiempo, disminuyendo de manera menos significativa. Si graficamos lo que ocurre a partir de 60 minutos tenemos la Figura 5.4. En esta Figura puede verse como a menor presión la caída del flujo es menor que a mayores presiones. Cuando la presión aumenta aparece el fenómeno de polarización por concentración que hace que el flujo disminuya. Kuo y Cheryan (1983) observaron que en el caso de suero, cuando la presión supera el valor crítico, el flujo disminuye considerablemente. Este mismo efecto se ha podido verificar en nuestro sistema considerando que el valor crítico de presión se encuentra alrededor de los 2 bar según se determinó en la Figura 5.2. Aparentemente, a altas presiones, la capa de ensuciamiento se vuelve más compacta y menos permeable.

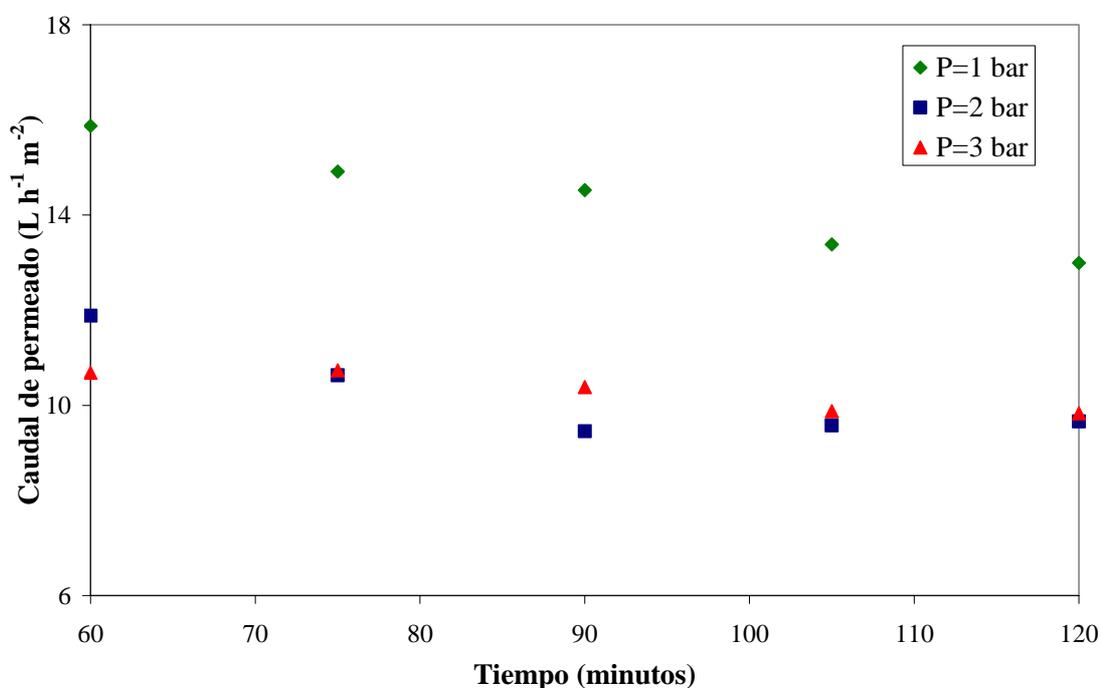


Figura 5.4. Variación del caudal de permeado con el tiempo luego de los 60 minutos para suero a 55°C y pH 6.9

Realizando los ajustes de los datos experimentales con el modelo de flujo que propone Cheryan (Ecuación 3.13a), se determina cómo el ensuciamiento o “fouling” de la membrana se incrementa cuando aumenta la presión aplicada. Este efecto se pone en evidencia en el valor que adquiere el coeficiente b , que toma un mayor valor a medida que el ensuciamiento adquiere importancia.

En la tabla 5.1 se presentan los valores encontrados a partir de los datos experimentales de flujo de permeado para los coeficientes b , para el modelo de Cheryan, α , β y γ para el modelo propuesto (Ecuación 3.16) a 55°C, los valores de correlación y el error relativo.

Tabla 5.1. Resultado de los ajustes de los modelos matemáticos con los datos experimentales de los flujos de permeado a las distintas presiones ensayadas a 55°C.

Presión (bar)	Modelo de Cheryan (1998)			Modelo Propuesto				
	b	R^2	Error (%)	α	β	γ	R^2	Error (%)
1	0.3026	0.995	4.30	-0.0109	0.2559	4.0390	0.997	2.49
2	0.7171	0.999	14.28	0.0631	0.9480	5.3084	0.999	2.59
3	1.1533	0.995	55.30	0.1941	1.6037	5.6266	0.999	6.14

Los ajustes al modelo propuesto fueron realizados con MATLAB utilizando los datos mostrados en el ANEXO 3. Además se desarrolló una rutina de programación en MATLAB para graficar las curvas de caudal en función del tiempo, que luego serán utilizadas para la resolución del modelo global del sistema. Se puede ver que los dos modelos propuestos correlacionan muy bien los datos experimentales si observamos los valores de R^2 . De todos modos si vemos los errores relativos calculados podemos decir

que el modelo que mejor reproduce el comportamiento de nuestro sistema es el segundo modelo matemático propuesto. Como ya se mencionó anteriormente utilizando este modelo se mejora el desempeño a tiempos grandes y además se tiene en cuenta no solo el ensuciamiento de la membrana sino también la polarización por concentración de las proteínas; logrando reproducir el comportamiento de manera mas precisa en el rango de trabajo utilizado. El modelo de Cheryan solo para los tiempos iniciales resultando más impreciso cuando se incrementa el tiempo de operación.

También se estudio el comportamiento de los flujos iniciales de permeado en función de la temperatura para las tres presiones ensayadas (Figura 5.5).

De acuerdo con el modelo de Hagen-Poiseuille basado en el flujo a través de los poros, un aumento en la temperatura resulta en un incremento del flujo. De todos modos, para el caso del suero de quesería existe un rango de temperatura hasta los 30°C para el cual un incremento de la temperatura disminuye la solubilidad de las sales de calcio, como fuera explicado en el capítulo 2. Por otra parte, por razones biológicas, un aumento muy grande en la temperatura puede desnaturalizar las proteínas presentes. Basados en esta ideas se ensayaron los flujos en el rango de 30 – 60°C (Cheryan, 1998).

En la Figura 5.5 se puede apreciar que a medida que se incrementa la temperatura los caudales iniciales son mayores, ya que disminuye la viscosidad de la solución y aumenta la solubilidad de las sales de calcio. También se puede ver que estos fenómenos adquieren mayor importancia cuando se opera a presiones mas altas; en el caso de 1 bar, los caudales iniciales se mantienen prácticamente constantes con la temperatura.

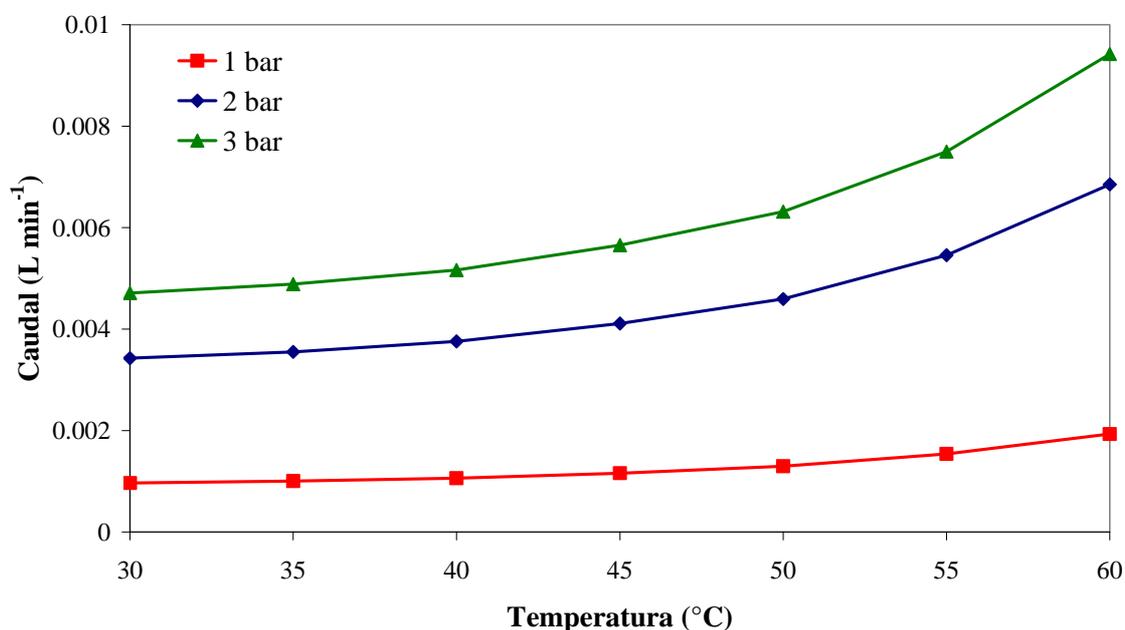


Figura 5.5 Caudales iniciales de permeado en función de la temperatura para las tres presiones ensayadas

5.3. Inmovilización de la enzima en la membrana

Se obtienen las condiciones óptimas de inmovilización de la enzima en la membrana. Estas condiciones serán las que den como resultado el mejor índice de recobro de actividad (IRA) y la mayor actividad de la enzima inmovilizada.

En la Tabla 5.2 se presentan los parámetros que determinan la efectividad del proceso de inmovilización para cada condición de ensayo. Como puede observarse, si bien un aumento en la concentración de glutaraldehído incrementa la cantidad de enzima ligada a la membrana, no ocurre lo mismo con la actividad de la enzima ligada, por tanto constantemente va disminuyendo el poder hidrolizante total de la membrana. Este efecto puede deberse a una distorsión de la estructura del sitio activo de la enzima por efecto del glutaraldehído, a la hidratación estérica del sitio activo y a algún otro

efecto no deseado que afecta la actividad de la enzima (Betancor y otros, 2006; Zhou y Chen, 2001).

Asimismo, también se observa en la Tabla 5.2, el efecto negativo de la cantidad de glutaraldehído, el que se puede reducir con el empleo, en condiciones adecuadas, de un inhibidor competitivo durante el proceso de inmovilización. Este fenómeno puede ser atribuido a que posiblemente, por la mayor afinidad de la enzima por este inhibidor, la estructura del sitio activo puede preservarse por más tiempo, disminuyendo el efecto distorsionador de la múltiple inmovilización covalente por el glutaraldehído.

En tales circunstancias, los resultados para la inmovilización de la enzima que consiguen mejor comportamiento son: concentración de glutaraldehído de 5.0 % (m/v), con el agregado de 0.03 M de galactosa junto a la enzima al realizar la inmovilización. De esta manera se consigue inmovilizar 12.49 mg de enzima (0.77 mg de proteína por cm^2 de membrana), con una actividad total a 37 °C, de 86.3 LAU (5.3 LAU por cm^2 de membrana), que corresponde a un 44.2% (Ecuación 4.3) de la actividad que le correspondería si dicha cantidad de proteína estuviera en la enzima libre que queda luego del proceso de inmovilización.

No se encontraron diferencias en el flujo cuando se hace circular agua a través de la membrana con o sin la enzima inmovilizada. De esta manera podemos decir que la resistencia intrínseca característica de la membrana no cambia cuando se inmoviliza covalentemente la enzima sobre la misma (Regenhardt y otros, 2008).

Tabla 5.2. Efectividad del proceso de inmovilización covalente de β -galactosidasa para diferentes concentraciones de glutaraldehído y agregado o no de galactosa

Activación	Inhibidor	$Prot_f$ (mg)	A_f (LAU)	$Prot_{imm}$ (mg)	A_{imm} (LAU)	IRA%
Glutaraldehído 2.5%	No	665.8	10409.0	9.18	65.0	45.3
Glutaraldehído 2.5%	Si	665.8	10987.3	9.18	72.4	47.8
Glutaraldehído 5.0%	No	662.5	9206.4	12.49	70.3	40.5
Glutaraldehído 5.0%	Si	662.5	10357.2	12.49	86.3	44.2
Glutaraldehído 7.5%	No	661.6	8389.7	13.37	46.3	27.3
Glutaraldehído 7.5%	Si	661.6	9194.2	13.37	56.1	30.2

5.4. Estabilidad Térmica del Biocatalizador

Se analiza la estabilidad térmica, ya que la temperatura a la cual se realiza la ultrafiltración del suero es un tanto superior a la temperatura óptima de trabajo de la enzima utilizada.

5.4.1. Estimación de la constante de pérdida de actividad de los biocatalizadores

Por otra parte, la estabilidad de la enzima puede verse afectada reversible o irreversiblemente por el tiempo en que la misma sea expuesta a condiciones desfavorables. En la Figura 5.6 se muestran los valores de actividad relativa de la enzima inmovilizada a diferentes temperaturas utilizando suero de quesería a pH 6.9, como así también la actividad relativa de la enzima libre a 55°C, considerando en cada caso el valor inicial de actividad como del 100%.

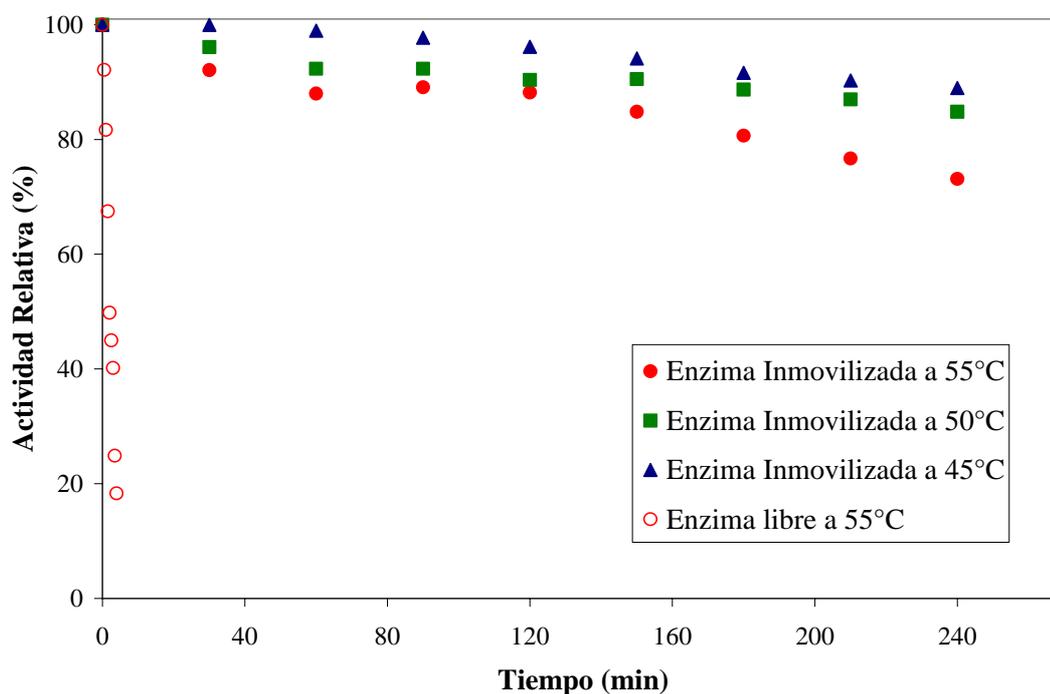


Figura 5.6. Curvas de actividad residual para la enzima inmovilizada a diferentes temperaturas y la enzima libre a 55°C.

En general, para obtener los valores del factor pre-exponencial y la energía de activación primero se determinan las constantes de pérdida de actividad (k_t) a las distintas temperaturas ensayadas para luego realizar la correlación de las mismas mediante regresión lineal. En este caso el ajuste se llevó a cabo mediante regresión no lineal utilizando la totalidad de los datos experimentales mostrados en la Figura 5.6. De esta forma logramos minimizar los errores del ajuste, obteniendo los valores de la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Valores de κ_A , E_a y el error residual del ajuste.

Factor pre-exponencial κ_A (min^{-1})	Energía de Activación E_a (cal mol^{-1})	Error relativo (%)
258588.51	12694.49	7.46

Según el mecanismo propuesto (Ecuación 2.12), la expresión matemática de la constante de pérdida de actividad de la enzima inmovilizada resulta:

$$k_t = 258588.51e^{\frac{-12694,49}{RT}} \quad (5.3)$$

Esta expresión puede ser utilizada para obtener el valor de k_t a la temperatura deseada dentro del rango de temperaturas ensayadas.

Ahora bien, a partir de la Ecuación 5.3 se pueden obtener los valores de k_t para la enzima a distintas temperaturas (Tabla 5.4). Como puede observarse, los valores de k_t son mayores cuando la temperatura aumenta haciendo que la enzima sea cada vez menos estable. No obstante, comparando con lo que sucede con la enzima libre, puede observarse que el proceso de inmovilización multipuntual con enlaces covalentes estabiliza a la enzima considerablemente, obteniéndose a 55 °C y pH 6.9 tiempos de vida media de 1.32 min para la enzima libre y de 771.6 min para la enzima inmovilizada.

Tabla 5.4. Constantes de desactivación térmica de la enzima para las diferentes condiciones ensayadas

Enzima	Temperatura	k_t (min ⁻¹)
Inmovilizada	37°C	0.00028991
Inmovilizada	45°C	0.00048688
Inmovilizada	50°C	0.00066449
Inmovilizada	55°C	0.00089833
Libre	55°C	0.3780

5.5. Efectividad del proceso de inmovilización de la enzima a 55°C

Se analizan los distintos parámetros que determinan si la inmovilización de la enzima resulta efectiva cuando se opera a 55°C (temperatura más frecuente de ultrafiltración del suero).

Como se mencionó anteriormente, la estabilidad de la enzima se incrementó considerablemente al inmovilizar a la enzima sobre la membrana obteniéndose un valor de la constante de desactivación menor.

Otro parámetro que nos da una idea de la conveniencia de inmovilizar a la enzima es el Factor de Estabilización, definido por la Ecuación 4.5. En la Tabla 5.5 se muestran los tiempos de vida media para las condiciones ensayadas.

Tabla 5.5. Tiempos de vida media

Enzima	Temperatura	$\theta_{1/2}$ (min)
Inmovilizada	37°C	2390.92
Inmovilizada	45°C	1423.63
Inmovilizada	50°C	1043.12
Inmovilizada	55°C	771.59
Libre	55°C	1.32

De la tabla se puede ver que si bien el hecho de operar a una temperatura superior a la óptima de la enzima, el tiempo de vida media disminuye alrededor de cinco veces, inmovilizando a la enzima el *Factor de Estabilización* asciende a 584.54 cuando se opera a 55°C. Esto significa que tenemos una enzima alrededor de 600 veces más estable con respecto a la enzima libre trabajando a 55°C.

Además, si observamos la Figura 5.7 en donde se grafica la actividad total de la enzima ya sea libre e inmovilizada en función del tiempo de operación; el área bajo estas curvas nos están indicando la cantidad de lactosa hidrolizada. Si bien la actividad inicial de la enzima libre es superior, luego cae rápidamente a cero siendo la cantidad de lactosa hidrolizada muy inferior en comparación con la enzima inmovilizada.

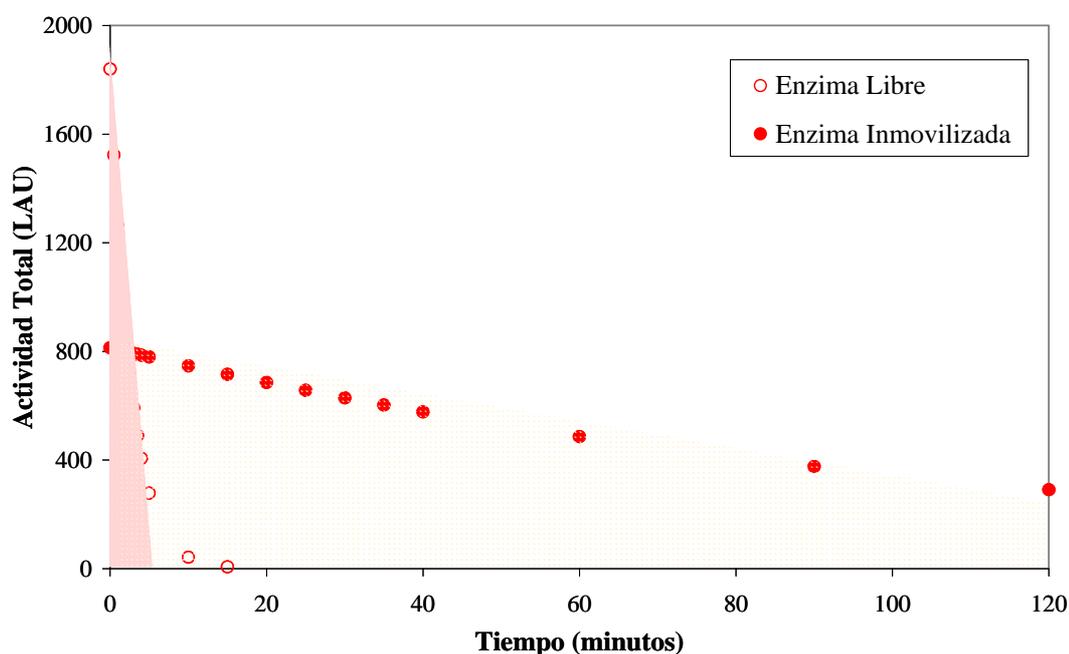


Figura 5.7. Actividad total de la enzima libre e inmovilizada a 55°C

5.6. Estimación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis-Menten

Se determinan los parámetros cinéticos cuando se opera con soluciones de lactosa o permeado de suero de quesería. Además, se obtendrá el modelo de desactivación o pérdida de actividad del biocatalizador cuando se utiliza suero de quesería.

5.6.1. Determinación de las constantes cinéticas para la enzima inmovilizada en la membrana para soluciones de lactosa y permeado de suero de quesería

El primer paso en el proceso de estimación de parámetros, luego de disponer de datos experimentales (ANEXO 1), se utilizó el software de computación comercial Excel para ajustar minimizando el error relativo. De esta manera los valores de las constantes calculados se obtienen al minimizar el error relativo. El error se calcula según la siguiente expresión:

$$Error(\%) = \frac{\sum_{i=1}^n \left[\frac{|x_i - y_i|}{x_i} \right]}{n} \cdot 100 \quad (5.4)$$

donde:

x_i es el valor experimental de la i -ésima observación

y_i es el valor estimado de la i -ésima observación

n es el número total de observaciones

En el ANEXO 2 se muestra el esquema de cálculo para obtener los valores de las constantes cinéticas. En dicho modelo ya se incluyó la variación de la constante de reacción en función de la temperatura. Las constantes fueron estimadas con un reactor tanque agitado continuo en estado pseudoestacionario que es el que representa mejor al sistema y por tanto errores relativos mucho menores.

En En la Tabla 5.5 se muestran los valores del factor pre-exponencial, la Energía de Activación y el error de correlación correspondientes a la Ecuación 2.12.

Tabla 5.5. Valores de A, Ea y coeficiente de correlación.

Factor pre-exponencial k_A (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Energía de Activación E_a (cal mol ⁻¹)	R ²
3.05•10 ⁹	19957.43	0.9064

Con estos valores se puede obtener una expresión de k_2 que nos será de utilidad para luego estimar el resto de las constantes cinéticas.

$$k_2 = (3.05 \cdot 10^9) e^{\frac{-19957.43}{RT}} \quad (5.5)$$

Cuando se trabaja con soluciones de lactosa se obtuvo:

$$K_m = 150.5261 \text{ mmol/L}$$

$$k_i = 6899.847 \text{ mmol/L}$$

Además, no se encontró variación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) con la temperatura en el rango de trabajo estudiado; lo mismo sucedió con la constante de inhibición (k_i).

Se aplicó el mismo procedimiento de cálculo descrito en el ANEXO 2 cuando se trabaja con permeado de suero de quesería. En este caso se obtuvo:

$$k_2 = (3.60 \cdot 10^{10}) e^{\frac{-21128.99}{RT}} \quad (5.6)$$

$$K_m = 279.014 \text{ mmol/L}$$

$$k_i = 7000 \text{ mmol/L}$$

5.6.2. Estimación de la constante de pérdida de actividad del biocatalizador

La expresión que permite calcular los valores de k_t a las distintas temperaturas corresponde a la Ecuación 5.3.

Con esta expresión se completa el modelo de desactivación del biocatalizador en el tiempo como ya se describió en el capítulo 3.

5.7. Validación del modelo teórico

Una vez obtenidos los parámetros cinéticos que describen al sistema y el modelo de flujo de permeado, solo resta evaluar el modelo integral planteado que representa al proceso conjunto de recuperación de proteínas por UF e hidrólisis de la lactosa. El desarrollo teórico del modelo se detalla en el Capítulo 3. El mismo está compuesto por las correspondientes ecuaciones diferenciales necesarias para predecir el comportamiento global. De todos modos, antes de realizar las simulaciones del proceso a fin de obtener las mejores condiciones de operación, se debe validar el modelo con valores experimentales.

Se utilizó una rutina de programación desarrollada en lenguaje Matlab® que resuelve el modelo planteado. Este programa, que se presenta en el ANEXO 4, permite calcular la cantidad de lactosa que es hidrolizada en función del tiempo cuando se opera a presión constante, para distintos valores de concentración inicial de sustrato. A su vez, se han incorporado en el mismo, la función de variación del caudal de permeado en función del tiempo y la desactivación de los biocatalizadores en el funcionamiento del reactor.

Para la validación del modelo, se comparó la producción teórica calculada para las condiciones que se muestran en la Tabla 5.8, del ensayo experimental conducido en dichas condiciones. En el ANEXO 5 se muestran los datos y las condiciones experimentales de cada una de las experiencias utilizadas en la validación del modelo matemático.

Tabla 5.8. Condiciones operativas para validar el modelo

Temperatura	45°C
Sustrato	Permeado de suero de quesería
Concentración inicial de lactosa	158.4 mmol/L
Concentración inicial de enzima	3801.25 mg/L

Se encontró un error relativo de ajuste, utilizando la Ecuación 5.4, de alrededor del 1%. En la Figura 5.11 se muestran los valores experimentales y teóricos de productividad en función del tiempo de operación. La productividad fue calculada como el producto entre la cantidad de producto formado en un determinado tiempo de operación y el valor correspondiente de caudal.

El ajuste de todas las constantes del sistema, y cinéticas como el empleo de incrementos de tiempo pequeños (1 minuto) permitieron predecir en el intervalo estudiado valores con bajo error.

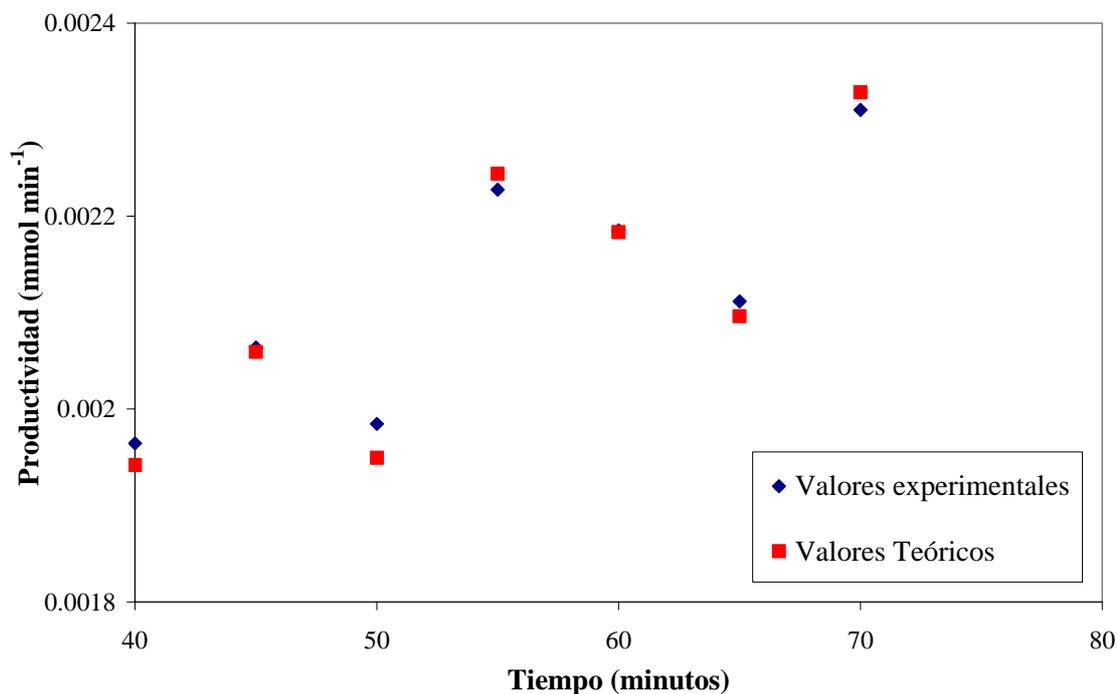


Figura 5.11. Productividad en función del tiempo de operación

5.8. Estudio del sistema bajo diferentes condiciones de operación

Una vez validado el modelo teórico con los datos experimentales, se realizan las simulaciones para diferentes condiciones de operación. Se trabajó con un rango de presiones de 1 a 3 bar y con las temperaturas de 37, 45, 50 y 55°C. Tanto las presiones como las temperaturas se eligieron teniendo en cuenta las condiciones a las cuales se determinaron tanto las constantes cinéticas como los parámetros del flujo y la cantidad de enzima ligada. En cuanto a las concentraciones iniciales de lactosa, se tuvieron en cuenta las siguientes: 5% de lactosa, que corresponde a la cantidad que se encuentra en general en el suero de quesería y 10% de lactosa, si consideramos que podemos concentrar fácilmente el suero usando el sistema de evaporadores que se dispone generalmente en la planta para preconcentrar leche. Para las simulaciones se adoptó como tiempo total de operación 800 minutos, que corresponde a aproximadamente el

tiempo de vida media de la enzima a la mayor temperatura (ver Tabla 5.4). Además, se tuvo en cuenta que el sistema se encuentra en régimen a partir de los 40 minutos de la puesta en marcha y que no existe reciclo.

Las simulaciones se realizaron suponiendo que la alimentación es suero de quesería, por lo que se adoptaron las constantes cinéticas correspondientes al permeado de suero (punto 5.5.1) ya que son dos productos similares y solo difieren en la cantidad de proteínas. Las proteínas presentes no afectan a las constantes cinéticas (Mammarella, 2001). La rutina de cálculo de producción total se muestra en el ANEXO 7 y las conversiones obtenidas para las distintas condiciones simuladas se presentan en el ANEXO 6.

A continuación se muestran las curvas de Productividad para las condiciones operativas antes mencionadas.

5.8.1. Curvas de Productividad

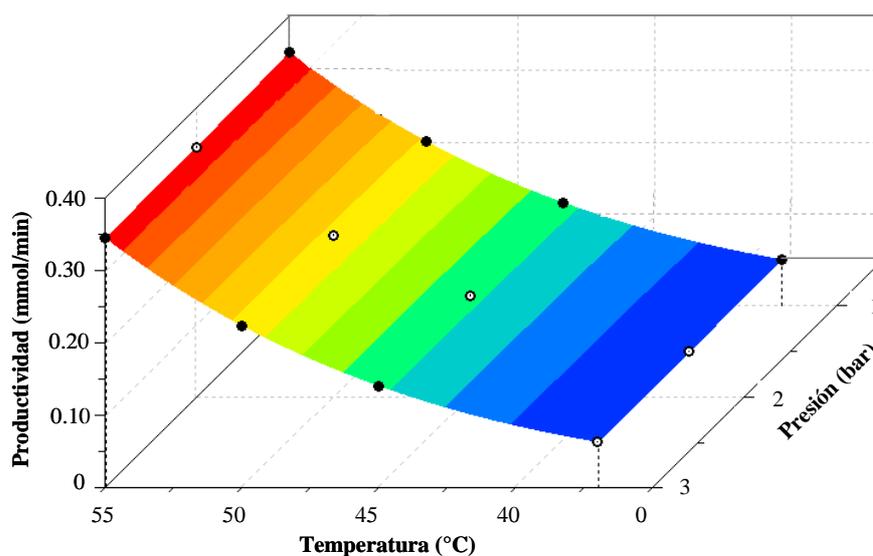


Figura 5.12. Producción total en función de la temperatura y la presión para una concentración inicial de lactosa de 10 %

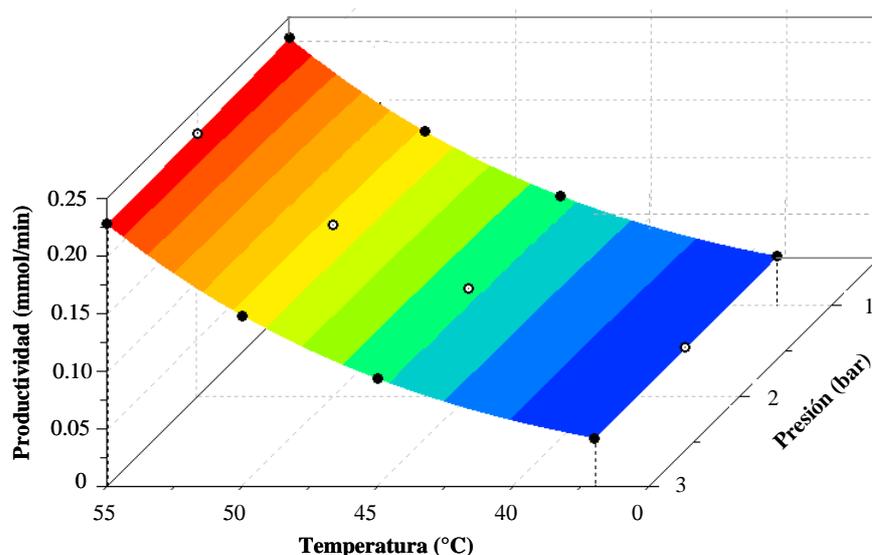


Figura 5.13. Producción total en función de la temperatura y la presión para una concentración inicial de lactosa de 5 %

Como puede observarse en las figuras anteriores, las productividades mayores se obtienen a 55°C. En la siguiente Tabla se presentan las productividades que se obtienen para las distintas condiciones operativas cuando la temperatura es de 55°C.

Tabla 5.9. Producción total a 55°C (800 minutos de operación)

Presión (bar)	Concentración inicial de lactosa (%)	
	5	10
1	0.2323	0.3505
2	0.2279	0.3453
3	0.2282	0.3455

La mayor producción teórica se obtiene operando a 55°C con una concentración inicial de lactosa del 10% a la menor presión de trabajo; no se observa una gran variación a presiones mayores.

Para ver como se ve afectada la producción total en función de la concentración inicial de lactosa para las distintas condiciones de temperatura y presión, se realizaron simulaciones para valores de concentración inicial de lactosa que van desde 2.5% hasta 27.5%. En las figuras que se muestran a continuación se puede observar que existe un valor de concentración inicial de lactosa (alrededor de 14%) hasta el cual la productividad se incrementa de manera considerable y luego es insignificante el aumento de la misma, permaneciendo prácticamente constante.

5.8.1.1. Curvas de Productividad en función de S_0 y la presión a distintas temperaturas

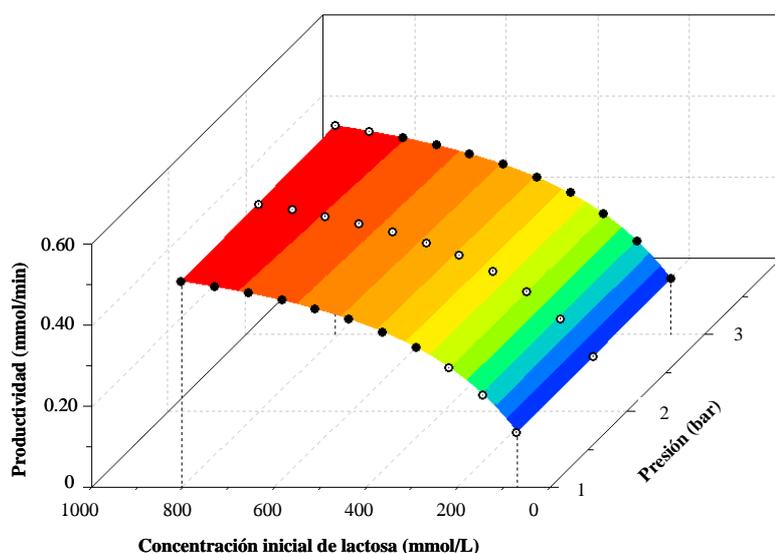


Figura 5.14. Producción total en función de la concentración inicial de lactosa y la presión para una temperatura de 55°C

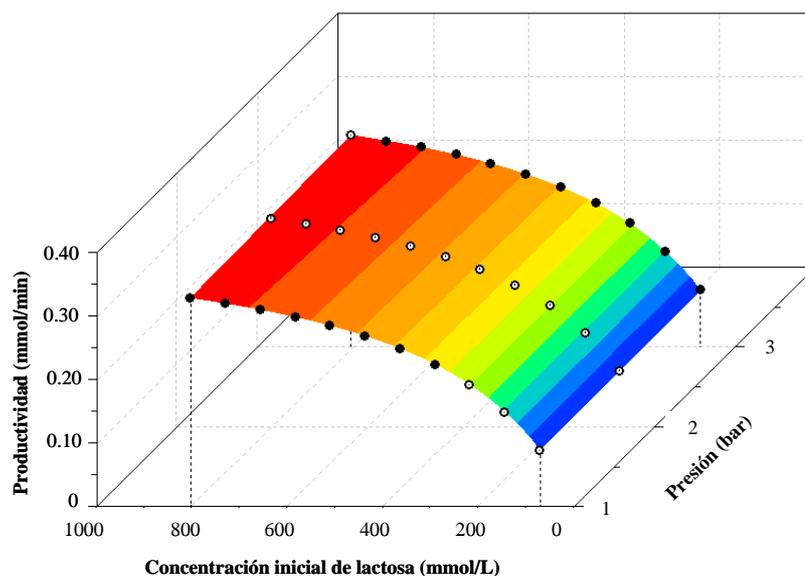


Figura 5.15. Producción total en función de la concentración inicial de lactosa y la presión para una temperatura de 50°C

Las curvas para las temperaturas restantes se muestran en el ANEXO 8

5.8.1.2. Curvas de Productividad en función de S_0 y la Temperatura a distintas presiones

Se muestra solo la gráfica correspondiente a 1 bar ya que la forma de las curvas es la misma y solo varían en los valores, en el ANEXO 8 se encuentran las gráficas para 2 y 3 bar.

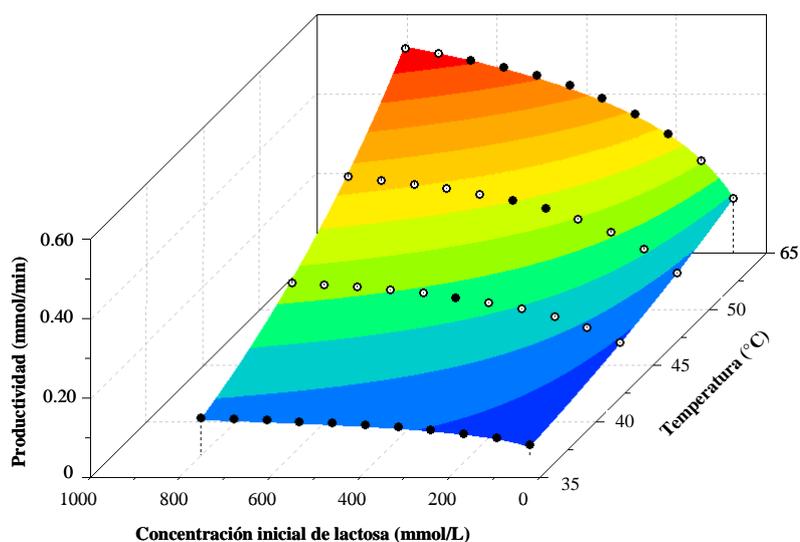


Figura 5.16. Producción total en función de la concentración inicial de lactosa y la temperatura para una presión de 1 bar

5.8.2. Curvas de Conversión

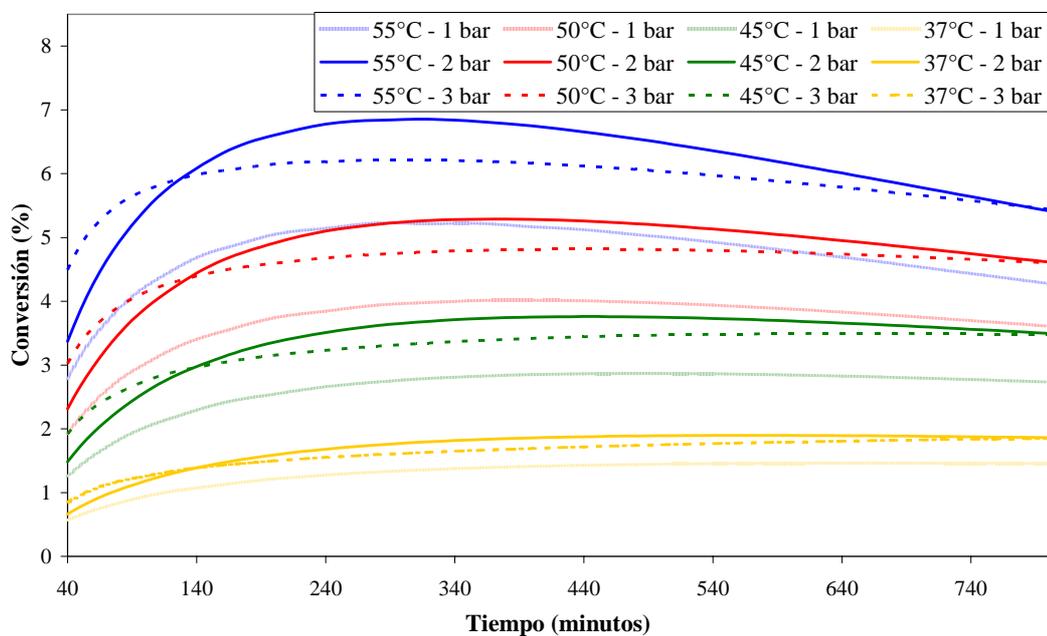


Figura 5.17. Conversiones a las distintas temperaturas y presiones para una concentración inicial de lactosa de 5 %

Se analiza en las Figuras 5.17 y 5.18 la conversión definida por la Ecuación 2.10 a través del tiempo. Se muestra el efecto de la temperatura y la presión sobre la conversión de lactosa para las dos concentraciones iniciales de sustrato consideradas. Puede verse que a medida que la temperatura se incrementa la conversión inicial es mayor, alcanzando un valor máximo, dicho máximo se produce a un tiempo menor a medida que la temperatura es mayor. También la velocidad de crecimiento y decrecimiento es mayor con la temperatura. De esta forma, a mayores temperaturas la desactivación térmica de la enzima cobra importancia, si se opera a 50°C o 55°C. A estas temperaturas, la desactivación térmica comienza a observarse a partir de las 5 horas de operación aproximadamente. Los mayores porcentajes de conversión de sustrato se obtienen con la menor concentración inicial de lactosa, lo contrario a lo que ocurre con la producción total.

A su vez, la presión de trabajo afecta a la conversión de sustrato, ya que modifica el caudal de permeación y por ende el tiempo de residencia en el interior del módulo de reacción-concentración.

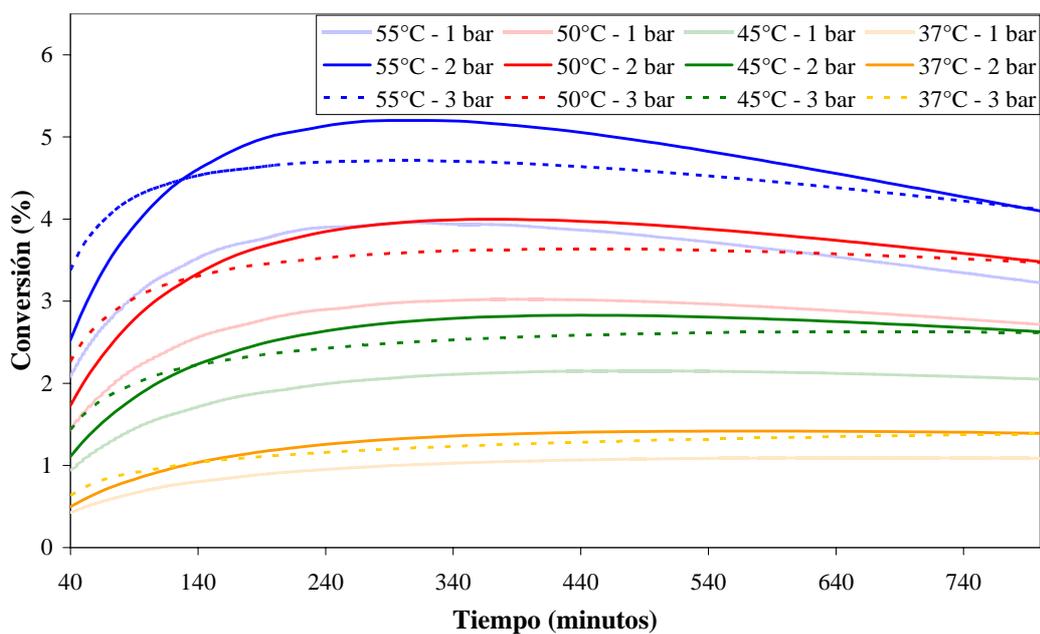


Figura 5.18. Conversiones a las distintas temperaturas y presiones para una concentración inicial de lactosa de 10 %



Capítulo 6

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudió el comportamiento de un sistema de reacción de hidrólisis de lactosa – concentración de proteínas de suero con la enzima β -galactosidasa inmovilizada en la membrana de ultrafiltración.

Las conclusiones pueden agruparse de acuerdo a las etapas en que fue desarrollado el trabajo.

6.1. Con respecto al modelo del flujo de permeado

Se adoptó un modelo matemático para representar la variación temporal del flujo de permeado en el reactor. Se encontró que el modelo de Lopes y otros, 2008 fue el mejor para predecir los datos experimentales en comparación con el modelo propuesto por Cheryan. Si bien este modelo originalmente no fue propuesto para ultrafiltración de suero, observamos que en nuestras condiciones de trabajo es el que mejor se adapta. Se determinaron los parámetros del modelo de flujo de permeado a 55°C como así también para el rango de temperaturas que va desde los 30 a los 60°C.

6.2. Con respecto a la inmovilización de la enzima en la membrana

La enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* fue inmovilizada con éxito sobre una membrana plana de polietersulfona de 10 kDa de tamaño corte.

Los mejores resultados se consiguieron utilizando una solución 5% de glutaraldehído (m/v) para activar al soporte y con el agregado de un inhibidor (galactosa) junto con la enzima. En esta condiciones se logró inmovilizar 12.49 mg de enzima con una actividad total a 37°C de 86.3 LAU, obteniéndose un índice de recobro

de actividad de 44.2%. El glutaraldehído funciona como agente ligante, facilitando la inmovilización de la enzima y evitando su posterior desorción.

Durante la activación, el glutaraldehído reacciona con los grupos aminos u oxhidrilos presentes en la superficie de la membrana, generando brazos espaciadores en los que se enlazaré la enzima formando bases de Schiff, a través de los grupos aminos terminales de los residuos de lisina.

6.2.1. Estabilidad Térmica del biocatalizador

Se obtuvo una expresión matemática para determinar la variación de la actividad del biocatalizador con el tiempo a distintas temperatura de operación. Además, se compararon los tiempos de vida media de la enzima libre e inmovilizada a 55°C, obteniéndose un factor de estabilización cercano a 600.

6.2.2. Con respecto a la estimación de los parámetros cinéticos

No se encontró dependencia con la temperatura de las constantes K_m y k_i en el rango de temperaturas ensayadas. Para el caso de permeado suero, el valor de K_m resultó mayor que en el caso de trabajar con soluciones de lactosa, lo que denota una menor afinidad de la enzima por el sustrato cuando se utiliza este producto. Las constantes cinéticas específicas determinadas fueron: $K_m = 279.014$ mmol/L, $k_i = 7000$ mmol/L

No se encontraron diferencias en las constantes cinéticas cuando se trabaja con permeado de suero o suero de quesería. Se obtuvo la expresión de la constante de velocidad de la reacción de hidrólisis en función de la temperatura

$$k_2 = (3.60 \cdot 10^{10}) e^{\frac{-21128.99}{RT}} \text{ [mmol lt}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{]}$$

6.3. Con respecto al sistema de reacción – concentración

Se obtuvo un modelo matemático completo que representa el proceso conjunto de recuperación de proteínas del suero de quesería y la hidrólisis enzimática de la lactosa, considerando la disminución de actividad de la enzima inmovilizada. El mismo incorpora las constantes cinéticas específicas de la β -galactosidasa inmovilizada covalentemente sobre la membrana de UF, como así también el modelo de flujo de permeado en función del tiempo. El modelo fue experimentalmente validado y resultó adecuado para predecir el comportamiento del sistema para distintas condiciones de operación tales como temperatura, presión y concentración inicial de lactosa.

6.3.1. Con respecto a la producción

Se determinó la forma en que varía la productividad con la temperatura en el rango de 37°C y 55°C y que no se modificó con la presión entre 1 y 3 bar. Además se analizó cómo se ve afectada la producción total al variar las concentraciones iniciales de lactosa, encontrándose un valor límite de alrededor del 14% hasta el cual tiene sentido concentrar el suero para obtener la máxima productividad. Para mayores concentraciones, la productividad permanece constante por lo cual solo representará un gasto de energía.

La mayor producción teórica se obtuvo operando a 55°C con una concentración inicial de lactosa del 10% a 1 bar de presión de trabajo

6.3.2. Con respecto a las conversiones

Se encontró que la conversión inicial es mayor a medida que la temperatura se incrementa, alcanzando un valor máximo. Así mismo, la desactivación térmica de la

enzima cobra importancia a mayores temperaturas (50°C o 55°C). A estas temperaturas, la desactivación térmica comienza a observarse a partir de las 5 horas de operación. Los mayores porcentajes de conversiones de sustrato se obtienen con la concentración inicial de lactosa de 5%, lo contrario a lo que ocurre con la productividades.

6.3.3. Conclusión final del modelo

El modelo es una adecuada herramienta si se lo utiliza en combinación con datos experimentales de los parámetros físicos y fisicoquímicos para determinar las condiciones óptimas del proceso.



Anexo 1

DATOS EXPERIMENTALES

A.1.1. Datos experimentales para la determinación de las constantes cinéticas para soluciones de lactosa

Concentración inicial de lactosa (%)	Temperatura (°C)	Glucosa (mmol/L)	Tiempo de residencia (min)
2.5	37	0.586	38.0
2.5	37	0.681	38.0
2.5	37	0.807	38.0
5.0	37	2.374	38.0
5.0	37	2.358	38.0
5.0	37	2.248	38.0
7.5	37	3.419	38.0
7.5	37	3.514	38.0
7.5	37	3.340	38.0
10	37	2.960	38.0
10	37	2.786	38.0
10	37	2.738	38.0
2.5	37	0.716	38.0
2.5	37	0.812	38.0
2.5	37	0.939	38.0
5.0	37	2.165	38.0
5.0	37	2.276	38.0
5.0	37	2.435	38.0
7.5	37	2.674	38.0
7.5	37	2.626	38.0
7.5	37	2.802	38.0
10	37	3.359	38.0
10	37	3.295	38.0
10	37	3.422	38.0
5.0	30	1.173	38.5
5.0	30	1.263	38.5
5.0	30	1.337	38.5
5.0	35	1.961	38.3
5.0	35	2.035	38.3
5.0	35	2.094	38.3
5.0	40	2.897	38.0
5.0	40	2.852	38.0
5.0	40	2.941	38.0
5.0	45	2.926	38.8
5.0	45	2.674	38.8
5.0	45	2.666	38.8
5.0	30	0.164	40.0
5.0	30	0.223	40.0
5.0	30	0.283	40.0
5.0	35	1.072	40.0
5.0	35	1.117	40.0
5.0	35	1.236	40.0
5.0	40	1.713	40.0
5.0	40	1.772	40.0
5.0	40	1.787	40.0
5.0	45	2.055	40.0
5.0	45	2.145	40.0
5.0	45	2.145	40.0

A.1.2. Datos experimentales para la determinación de las constantes cinéticas para permeado de suero de quesería

Concentración inicial de lactosa (%)	Temperatura (°C)	Glucosa (mmol/L)	Tiempo de residencia (min)
2.5	37	0.449	44.00
2.5	37	0.516	44.00
2.5	37	0.597	44.00
4.062	37	1.459	44.27
4.062	37	1.399	44.27
4.062	37	1.525	44.27
5.0	37	2.166	43.60
5.0	37	2.269	43.60
5.0	37	2.299	43.60
2.5	37	0.280	43.47
2.5	37	0.334	43.47
2.5	37	0.420	43.47
4.062	37	1.348	42.00
4.062	37	1.312	42.00
4.062	37	1.466	42.00
5.0	37	2.321	42.67
5.0	37	2.336	42.67
5.0	37	2.336	42.67
5.416	30	0.346	39.22
5.416	30	0.481	39.22
5.416	30	0.658	39.22
5.416	35	3.912	42.64
5.416	35	4.139	42.64
5.416	35	4.451	42.64
5.416	40	7.301	43.34
5.416	40	6.972	43.34
5.416	40	7.773	43.34
5.416	45	10.015	39.35
5.416	45	9.678	39.35
5.416	45	10.588	39.35
5.416	30	0.915	44.53
5.416	30	1.381	44.53
5.416	30	1.672	44.53
5.416	35	6.720	45.60
5.416	35	7.385	45.60
5.416	35	7.468	45.60
5.416	40	11.402	46.40
5.416	40	12.175	46.40
5.416	40	12.483	46.40
5.416	45	10.454	46.67
5.416	45	10.379	46.67
5.416	45	10.870	46.67



Anexo 2

ALGORITMO DE CÁLCULO

A.2. Algoritmo para estimar las constantes cinéticas para soluciones de lactosa y permeado de suero de quesería

Para obtener las constantes cinéticas mediante la utilización de este procedimiento se debe contar con los valores iniciales. Se utilizó el siguiente esquema de cálculo:

Partiendo de la expresión de la velocidad de reacción:

$$v = -\frac{k_2 [E_0] [S]}{K_m \left(1 + \frac{[Ga]}{k_i}\right) + [S]} = -\frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[S_0] - [S]}{k_i}\right) + [S]}$$

Cuando $S \approx S_0 \Rightarrow S_0 - S = 0$ y $S_0 \gg K_m \Rightarrow K_m + S \approx S$

Por lo que resulta $-v = V_{\max} = k_2 [E_0]$

Si consideramos que la reacción se lleva a cabo en un reactor discontinuo, se obtiene:

$$\frac{S_0 - S}{\tau} = k_2 [E_0]$$

Como sabemos, k_2 varía con la temperatura siguiendo la ecuación de Arrhenius, por lo tanto:

$$\frac{S_0 - S}{\tau} = A e^{\frac{-E_a}{RT}} [E_0]$$

Figura A.2.1. Esquema de cálculo

Como se indica en el esquema, se seleccionan los datos experimentales para los cuales S_0 es aproximadamente igual a S ; además se conocen el tiempo de residencia τ se trabajó a caudal constante, y la concentración inicial de enzima E_0 .

Para esto realizó una regresión lineal entre $-\ln\left(\frac{S_0 - S}{E_0 \cdot \tau}\right)$ y $\frac{1}{T}$. Estos valores y el correspondiente coeficiente de correlación se presentan en la Tabla 5.5.

Ahora bien, continuando con la secuencia de cálculo, ya podemos estimar los valores de K_m y de k_i . Para esto se procedió de la siguiente manera:

- Se utilizaron el conjunto de los datos experimentales con sus correspondientes réplicas.
- Se calcularon los valores de k_2 con la expresión previamente obtenida.
- Los ensayos se realizaron con el biocatalizador en el dispositivo de reacción.
- Con la ayuda de la herramienta Solver de Excel, se estimaron los parámetros antes mencionados minimizando el error relativo (Ecuación 5.3) para dos configuraciones de reactores: Reactor tanque agitado continuo (RTAC) y Reactor flujo pistón (RFP).
- Adoptamos las constantes que menor error residual producen.

Los datos experimentales se muestran en el ANEXO 1.



Anexo 3

FLUJOS DE PERMEADO

A.3.1. Datos experimentales de caudal de permeación usando suero de quesería a 55°C

Tiempo (min)	Caudal (L/h)	Caudal (L/h m ²)
	Presión = 1 bar	
1	0.0923	56.980
6	0.0537	33.167
15	0.0444	27.435
30	0.0356	22.002
45	0.0305	18.832
60	0.0257	15.873
75	0.0242	14.914
90	0.0235	14.524
105	0.0217	13.387
120	0.0211	12.995
135	0.0199	12.277
150	0.0192	11.820
	Presión = 2 bar	
1	0.3272	202.02
15	0.0396	24.42
30	0.0273	16.835
45	0.0232	14.337
60	0.0193	11.884
75	0.0172	10.633
90	0.0153	9.456
105	0.0155	9.579
120	0.0157	9.662
	Presión = 3 bar	
1	0.4500	277.778
5	0.0522	32.206
10	0.0375	23.148
15	0.0235	14.524
30	0.0188	11.574
45	0.0179	11.056
60	0.0173	10.684
75	0.0174	10.735
90	0.0168	10.384
105	0.016	9.877
120	0.0159	9.833

A.3.2. Caudales iniciales a distintas temperaturas

Temperatura (°C)	Caudal (L/min)	Caudal (L/ h m2)
	Presión = 1 bar	
30	0.000967	35.815
35	0.001002	37.111
40	0.001059	39.222
45	0.001159	42.926
50	0.001296	48.000
55	0.001538	56.963
60	0.001933	71.593
Presión = 2 bar		
30	0.003426	126.889
35	0.003552	131.556
40	0.003755	139.074
45	0.004111	152.259
50	0.004594	170.148
55	0.005454	202.000
60	0.006852	253.778
Presión = 3 bar		
30	0.004711	174.481
35	0.004884	180.889
40	0.005163	191.222
45	0.005653	209.370
50	0.006317	233.963
55	0.007500	277.778
60	0.009422	348.963



Anexo 4

PROGRAMA DE CÁLCULO DE CONVERSIONES

A.4. Rutinas de cálculo en Matlab

A.4.1. Rutina para graficar los flujos de permeado a distintas temperaturas y presiones para el tiempo total de operación

```

% Rutina para calcular y graficar los flujos de permeado a distintas
% temperaturas y presiones.
% Autor: Silvina Regenhardt
% Versión: Diciembre 2009

clear

% Constantes del modelo de flujo de permeado obtenidas con los datos
% experimentales
% Las filas corresponden a las distintas temperaturas y las columnas a
% las presiones

todas_las_a = [0.0499  0.0499  0.0499  0.0499
               0.0666  0.0666  0.0666  0.0666
               -0.034  -0.0328 -0.0328 -0.0328];

todas_las_b = [0.8003  0.8003  0.8003  0.8003
               0.9588  0.9588  0.9588  0.9588
               -0.1641 -0.1539 -0.1539 -0.1539 ];

todas_las_c = [5.23    5.0667  4.9557  4.865
               5.3084  5.1366  5.0257  4.935
               2.28    2.1288  2.018   1.9273];

%Intervalos de Presión y Temperatura

Presiones = [1 2 3]; % [bar]
Temperaturas = [55 50 45 37]; %[°C]

% Tiempo final de operación

Tfinal = 800;

tt = [1:Tfinal];

% Rutina de cálculo y gráficas de los flujos de permeado a distintas T
y % P

for T = 1:4
    for P = 1:3
        a = todas_las_a(P,T);
        b = todas_las_b(P,T);
        c = todas_las_c(P,T);

        % Modelo del flujo de permeado

        J(P,:) = exp(a * log(tt).^2 - b * log(tt) + c ); %[L/ hora m2]
    end
end

```

```

    end
    plot(tt, J)
    axis([40 Tfinal 0 30])
    texto = sprintf('Caudal en función del tiempo de operación a %d
C',Temperaturas(T));
    title(texto)
    xlabel('tiempo [min]');
    ylabel('caudal [L/h m2]');
    legend('P = 1 bar','P = 2 bar','P = 3 bar')
    nomarchivo = sprintf('caudales-temp-%d',Temperaturas(T));
    print('-djpeg',nomarchivo)
    pause
end

% Se ejecuta desde MATLAB Command Window con el nombre 'caudales'.

```

A.4.2. Rutina para el cálculo de conversiones de lactosa

```

% Se ejecuta desde MATLAB Command Window ---> resolver
% Programa para el cálculo de las conversiones de lactosa en un
reactor
% agitado continuo, con caudal variables en el tiempo, cinética de
% Michaelis-Menten competitiva por producto considerando la
desactivación
% térmica del biocatalizador.
% Autor: Silvina Regenhardt
% Versión: Diciembre de 2009

% MÓDULO DE INTRODUCCIÓN DE DATOS

global S0 E0 Km Ki k2 kd Presiones Temperaturas P T

%Intervalos de Presión y Temperatura
Presiones = [1 2 3]; % [bar]
Temperaturas = [55 50 45 37]; % [°C]]

% Ingresar los valores de S0 y E0
S0 = 146.2; % [mmol/L]
E0 = 3801.25; % [mg/L]
TiempoFinal = 800; % [min]

% CONSTANTES
% constantes universal de los gases
R = 1.978;

% Constante de Michaelis-Menten
Km = 279; % [mmol/L]

% Constante de inhibición
Ki = 7000; % [mmol/L]

% MÓDULO DE CÁLCULO DE VARIABLES

contador=1;
for P = 1:3

```

```

for T = 1:4

    % constantes variables
    Temp = 273 + Temperaturas(T); % Temperatura absoluta

    k2 = 3.60e10 * exp(-21128.99/(R*Temp));
    kd = 2.58e5 * exp(-12694.49/(R*Temp)); % Cte. de desactivación
térmica

% MÓDULO DE RESOLUCIÓN DE LA ECUACIÓN DIFERENCIAL

    [t, S] = ode45('vel', [0:TiempoFinal/800:TiempoFinal], S0);

% MÓDULO GRÁFICAS

    % Gráfica de S en función del tiempo de operación
    %plot(t,S)
    %texto=sprintf('Temp = %d C Presion %d bar', ...
    %    Temperaturas(T),Presiones(P));
    %title(texto)
    %xlabel('tiempo [min]')
    %ylabel('Concentracion de Sustrato [mmol/litro]')

    nomarchivo = sprintf('conc-T-%d-P-%d',...
        Temperaturas(T),Presiones(P));
    print('-djpeg',nomarchivo)
    pause

    todas_las_S(:,contador) = S;
    contador = contador + 1;

end
end
todas_las_P = [1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3];
todas_las_T = [55 50 45 37 65 50 45 37 55 50 45 37];

% Gráficas de S en función del tiempo a todas las temperaturas
plot(t,todas_las_S(:,1:4))
legend('T = 55°C', 'T = 50°C', 'T = 45°C', 'T = 37°C')
title('Concentración de sustrato a presion = 1 bar')
print('-djpeg', 'conc-p-1');
pause

plot(t,todas_las_S(:,5:8))
legend('T = 55°C', 'T = 50°C', 'T = 45°C', 'T = 37°C')
title('Concentración de sustrato a presion = 2 bar')
print('-djpeg', 'conc-p-2');
pause

plot(t,todas_las_S(:,9:12))
legend('T = 55°C', 'T = 50°C', 'T = 45°C', 'T = 37°C')
title('Concentración de sustrato a presion = 3 bar')
print('-djpeg', 'conc-p-3');
pause

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

```

% Gráficas de S en función tiempo para todas las Presiones
plot(t,todas_las_S(:,1:4:12))
legend('P = 1 bar','P = 2 bar','P = 3 bar')
title('Concentración de sustrato a temperatura = 55°C')
print('-djpeg','conc-t-55');
pause

plot(t,todas_las_S(:,2:4:12))
legend('P = 1 bar','P = 2 bar','P = 3 bar')
title('Concentración de sustrato a temperatura = 50°C')
print('-djpeg','conc-t-50');
pause

plot(t,todas_las_S(:,3:4:12))
legend('P = 1 bar','P = 2 bar','P = 3 bar')
title('Concentración de sustrato a temperatura = 45°C')
print('-djpeg','conc-t-45');
pause

plot(t,todas_las_S(:,4:4:12))
legend('P = 1 bar','P = 2 bar','P = 3 bar')
title('Concentración de sustrato a temperatura = 37°C')
print('-djpeg','conc-t-37');
pause

```

A.4.3. Subrutina para cargar la ecuación diferencial que debe ser integrada

```

% Rutina que carga la ecuación diferencial que debe ser integrada

function z = vel(t, S)

% Constantes globales
global S0 E0 Km Ki k2 kd Presiones Temperaturas P T

% S0: Concentración inicial de lactosa
% E0: Concentración inicial de enzima (enzima inmovilizada en la
membrana)
% Km: Constante de Michaelis-Menten
% Ki: Constante de inhibición
% kd: Constante de desactivación térmica de la enzima
% T: Temperatura
% P: Presión

% Constantes del modelo de flujo de permeado

todas_las_a = [0.0499  0.0499  0.0499  0.0499
               0.0666  0.0666  0.0666  0.0666
               -0.034  -0.0328 -0.0328 -0.0328];

todas_las_b = [0.8003  0.8003  0.8003  0.8003
               0.9588  0.9588  0.9588  0.9588

```

```

        -0.1641  -0.1539  -0.1539  -0.1539 ];

todas_las_c = [5.23      5.0667   4.9557   4.865
               5.3084   5.1366   5.0257   4.935
               2.28     2.1288   2.018    1.9273];

if (t < 1)
    tt = 1;

else
    tt = t;
end
a = todas_las_a(P,T);
b = todas_las_b(P,T);
c = todas_las_c(P,T);

d=0.003375; %cte. = (A/V)/60

% Modelo del flujo de permeado

J = exp(a * log(tt)^2 - b * log(tt) + c );

% Ecuación diferencial para resolver el modelo de Ultrafiltración-
Reacción
z = J * d * (S0 - S) ...
    - ( k2 * E0 * exp(-kd * (t)) * S ) ...
    / (S + Km * (1 + (S0 - S)/Ki ) );

end

```



Anexo 5

DATOS PARA VALIDAR EL MODELO TEÓRICO

A.5. Datos para validar el modelo matemático de Reacción-Concentración

A.5.1. Condiciones experimentales

Temperatura: 45°C

Concentración inicial de lactosa: 5.416 %

Cantidad de Enzima inmovilizada: 3801 mg

Tiempo necesario para alcanzar el Estado Estacionario: 40 minutos

A.5.2. Datos experimentales

Tiempo (min)	Caudal (L/min)	Presión (bar)	Cant. de producto (mmol/L)	Productividad (mmol/min)
40	0.00021818	2.50	9.004	0.00196
45	0.00021818	2.40	9.459	0.00206
50	0.00021818	2.40	9.096	0.00198
55	0.00021818	2.30	10.209	0.00223
60	0.00021818	2.30	10.015	0.00218
65	0.00021818	2.30	9.678	0.00211
70	0.00021818	2.25	10.588	0.00231

* Productividad $\rightarrow P = \text{Cant. de producto} \cdot \text{Caudal}$



Anexo 6

CONVERSIONES

Tiempo (min)	CONVERSIONES (%) para concentración inicial de lactosa 5%											
	Presión = 1 bar				Presión = 2 bar				Presión = 3 bar			
	55°C	50°C	45°C	37°C	55°C	50°C	45°C	37°C	55°C	50°C	45°C	37°C
40	2.78588	1.92752	1.24974	0.56435	3.36851	2.31247	1.48461	0.66450	4.49024	3.02445	1.91948	0.85048
45	2.97222	2.06257	1.34332	0.60894	3.62083	2.49892	1.61093	0.72366	4.70497	3.19965	2.04372	0.91153
50	3.14278	2.18469	1.42855	0.64987	3.85669	2.67039	1.72844	0.77919	4.88289	3.35007	2.15276	0.96634
55	3.29623	2.29704	1.50623	0.68725	4.07527	2.82874	1.83765	0.83115	5.03048	3.47866	2.24782	1.01504
60	3.43316	2.40332	1.57756	0.72137	4.27644	2.97620	1.93916	0.87966	5.15470	3.58865	2.33033	1.05789
65	3.55605	2.50404	1.64413	0.75267	4.46075	3.11536	2.03377	0.92491	5.26291	3.68353	2.40190	1.09526
70	3.66930	2.59800	1.70782	0.78177	4.62940	3.24760	2.12239	0.96716	5.36073	3.76705	2.46433	1.12763
75	3.77860	2.68450	1.76919	0.80946	4.78429	3.37246	2.20613	1.00673	5.44757	3.84326	2.51960	1.15559
80	3.88355	2.76338	1.82755	0.83666	4.92797	3.48968	2.28618	1.04400	5.52366	3.91468	2.56987	1.17985
85	3.98163	2.83501	1.88235	0.86348	5.06368	3.59921	2.36316	1.07942	5.58959	3.97990	2.61750	1.20122
90	4.07151	2.90029	1.93325	0.88948	5.19336	3.70117	2.43673	1.11351	5.64631	4.03894	2.66366	1.22064
95	4.15269	2.96064	1.98014	0.91436	5.31588	3.79586	2.50668	1.14680	5.69507	4.09201	2.70668	1.23916
100	4.22556	3.01801	2.02310	0.93786	5.43049	3.88381	2.57289	1.17909	5.73746	4.13944	2.74647	1.25793
105	4.29133	3.07481	2.06242	0.95984	5.53679	3.96569	2.63529	1.21007	5.77541	4.18168	2.78306	1.27767
110	4.35208	3.13097	2.09863	0.98020	5.63470	4.04239	2.69389	1.23972	5.81115	4.21930	2.81653	1.29666
115	4.41072	3.18503	2.13243	0.99891	5.72447	4.11497	2.74879	1.26801	5.84609	4.25301	2.84703	1.31460
120	4.47014	3.23621	2.16475	1.01603	5.80670	4.18469	2.80015	1.29493	5.87910	4.28362	2.87475	1.33147
125	4.52856	3.28395	2.19674	1.03168	5.88232	4.25257	2.84819	1.32050	5.90969	4.31209	2.89995	1.34725
130	4.58417	3.32794	2.22937	1.04605	5.95260	4.31799	2.89323	1.34474	5.93753	4.33947	2.92294	1.36195
135	4.63579	3.36807	2.26175	1.05940	6.01914	4.38049	2.93566	1.36769	5.96244	4.36655	2.94407	1.37562
140	4.68269	3.40450	2.29325	1.07207	6.08385	4.43976	2.97592	1.38943	5.98442	4.39273	2.96378	1.38828
145	4.72453	3.43761	2.32346	1.08446	6.14710	4.49559	3.01456	1.41003	6.00360	4.41770	2.98254	1.40000
150	4.76146	3.46799	2.35204	1.09706	6.20766	4.54785	3.05216	1.42959	6.02031	4.44123	3.00089	1.41087
155	4.79404	3.49651	2.37876	1.11038	6.26486	4.59649	3.08925	1.44823	6.03499	4.46318	3.01924	1.42099
160	4.82327	3.52422	2.40347	1.12381	6.31821	4.64158	3.12514	1.46607	6.04828	4.48345	3.03706	1.43046
165	4.85058	3.55245	2.42613	1.13686	6.36737	4.68326	3.15956	1.48327	6.06095	4.50199	3.05418	1.43943
170	4.87787	3.58191	2.44678	1.14945	6.41221	4.72176	3.19244	1.49999	6.07394	4.51884	3.07054	1.44805
175	4.90726	3.61134	2.46556	1.16151	6.45272	4.75743	3.22375	1.51640	6.08791	4.53409	3.08610	1.45649
180	4.93789	3.64003	2.48268	1.17299	6.48911	4.79068	3.25347	1.53236	6.10195	4.54788	3.10084	1.46493
185	4.96804	3.66741	2.49846	1.18387	6.52172	4.82202	3.28160	1.54774	6.11559	4.56043	3.11478	1.47349
190	4.99661	3.69302	2.51333	1.19414	6.55108	4.85207	3.30817	1.56253	6.12845	4.57201	3.12791	1.48184
195	5.02280	3.71656	2.52778	1.20380	6.57789	4.88152	3.33322	1.57673	6.14027	4.58296	3.14028	1.48992
200	5.04604	3.73783	2.54242	1.21288	6.60301	4.91102	3.35684	1.59035	6.15083	4.59368	3.15193	1.49774
210	5.08261	3.77340	2.57426	1.22951	6.65244	4.96707	3.40015	1.61588	6.16772	4.61627	3.17339	1.51256
220	5.10684	3.80064	2.60569	1.24461	6.70102	5.01751	3.43911	1.63924	6.17898	4.63930	3.19307	1.52636
230	5.12325	3.82249	2.63449	1.25905	6.74375	5.06174	3.47512	1.66062	6.18570	4.66049	3.21199	1.53919
240	5.14040	3.84385	2.66000	1.27364	6.77839	5.09970	3.50922	1.68029	6.19015	4.67947	3.23083	1.55121
250	5.16621	3.87014	2.68205	1.28755	6.80402	5.13179	3.54054	1.69861	6.19583	4.69609	3.24867	1.56258
260	5.19278	3.89647	2.70096	1.30050	6.82103	5.15892	3.56888	1.71588	6.20431	4.71050	3.26536	1.57353
270	5.21402	3.91982	2.71751	1.31240	6.83112	5.18250	3.59426	1.73199	6.21172	4.72309	3.28087	1.58422
280	5.22664	3.93907	2.73298	1.32325	6.83733	5.20440	3.61680	1.74692	6.21696	4.73452	3.29525	1.59450
290	5.22989	3.95386	2.74886	1.33315	6.84397	5.22445	3.63677	1.76069	6.21950	4.74568	3.30860	1.60435
300	5.22554	3.96467	2.76417	1.34231	6.85067	5.24168	3.65454	1.77334	6.21929	4.75652	3.32113	1.61377
310	5.21791	3.97277	2.77812	1.35100	6.85428	5.25588	3.67065	1.78497	6.21680	4.76641	3.33311	1.62278

320	5.21384	3.98025	2.79049	1.35951	6.85393	5.26703	3.68549	1.79569	6.21296	4.77517	3.34473	1.63143
330	5.21797	3.98938	2.80121	1.36760	6.84929	5.27530	3.69881	1.80564	6.20919	4.78277	3.35579	1.63975
340	5.22215	3.99817	2.81040	1.37517	6.84056	5.28108	3.71054	1.81496	6.20619	4.78923	3.36622	1.64783
350	5.22305	4.00538	2.81838	1.38219	6.82847	5.28494	3.72068	1.82362	6.20244	4.79471	3.37601	1.65570
360	5.21900	4.01054	2.82563	1.38864	6.81426	5.28762	3.72930	1.83161	6.19747	4.79945	3.38516	1.66333
370	5.20969	4.01352	2.83275	1.39459	6.79972	5.28913	3.73653	1.83893	6.19104	4.80381	3.39374	1.67072
380	5.19609	4.01453	2.83941	1.40011	6.78479	5.28910	3.74252	1.84563	6.18314	4.80778	3.40180	1.67786
390	5.18054	4.01410	2.84530	1.40532	6.76822	5.28743	3.74753	1.85173	6.17396	4.81115	3.40947	1.68475
400	5.16670	4.01311	2.85030	1.41035	6.74963	5.28411	3.75174	1.85730	6.16393	4.81381	3.41683	1.69142
410	5.15696	4.01252	2.85439	1.41511	6.72889	5.27923	3.75506	1.86240	6.15368	4.81574	3.42380	1.69788
420	5.14702	4.01158	2.85763	1.41956	6.70609	5.27298	3.75746	1.86710	6.14355	4.81695	3.43036	1.70417
430	5.13531	4.00974	2.86016	1.42367	6.68157	5.26562	3.75893	1.87140	6.13291	4.81753	3.43649	1.71030
440	5.12110	4.00678	2.86221	1.42744	6.65589	5.25750	3.75951	1.87529	6.12150	4.81759	3.44220	1.71627
450	5.10425	4.00264	2.86406	1.43089	6.62985	5.24867	3.75926	1.87877	6.10922	4.81732	3.44750	1.72207
460	5.08523	3.99742	2.86558	1.43408	6.60346	5.23893	3.75828	1.88187	6.09605	4.81673	3.45244	1.72769
470	5.06512	3.99137	2.86662	1.43705	6.57619	5.22825	3.75669	1.88459	6.08209	4.81570	3.45708	1.73314
480	5.04562	3.98491	2.86712	1.43989	6.54785	5.21663	3.75459	1.88698	6.06757	4.81418	3.46148	1.73843
490	5.02785	3.97851	2.86706	1.44254	6.51839	5.20410	3.75193	1.88907	6.05280	4.81216	3.46559	1.74356
500	5.00988	3.97183	2.86647	1.44499	6.48785	5.19077	3.74871	1.89091	6.03798	4.80964	3.46940	1.74857
510	4.99098	3.96460	2.86543	1.44721	6.45642	5.17679	3.74492	1.89247	6.02278	4.80667	3.47288	1.75345
520	4.97082	3.95671	2.86407	1.44921	6.42435	5.16233	3.74057	1.89378	6.00708	4.80332	3.47606	1.75821
530	4.94934	3.94813	2.86253	1.45100	6.39205	5.14743	3.73572	1.89482	5.99082	4.79970	3.47894	1.76283
540	4.92677	3.93891	2.86077	1.45260	6.35952	5.13198	3.73040	1.89560	5.97398	4.79582	3.48154	1.76733
550	4.90360	3.92918	2.85868	1.45406	6.32652	5.11598	3.72469	1.89615	5.95663	4.79162	3.48391	1.77169
560	4.88062	3.91917	2.85624	1.45542	6.29297	5.09941	3.71865	1.89647	5.93890	4.78705	3.48609	1.77592
570	4.85836	3.90912	2.85344	1.45664	6.25885	5.08232	3.71225	1.89660	5.92095	4.78212	3.48803	1.78004
580	4.83596	3.89888	2.85029	1.45772	6.22418	5.06474	3.70550	1.89655	5.90291	4.77683	3.48974	1.78405
590	4.81307	3.88829	2.84684	1.45864	6.18906	5.04677	3.69838	1.89632	5.88460	4.77120	3.49121	1.78797
600	4.78954	3.87729	2.84317	1.45941	6.15361	5.02852	3.69091	1.89591	5.86595	4.76529	3.49244	1.79178
610	4.76534	3.86587	2.83936	1.46003	6.11805	5.00998	3.68311	1.89532	5.84692	4.75916	3.49344	1.79549
620	4.74059	3.85405	2.83539	1.46052	6.08237	4.99113	3.67501	1.89457	5.82752	4.75282	3.49422	1.79909
630	4.71552	3.84192	2.83120	1.46091	6.04647	4.97194	3.66666	1.89364	5.80777	4.74623	3.49482	1.80258
640	4.69051	3.82959	2.82677	1.46121	6.01031	4.95242	3.65809	1.89257	5.78776	4.73938	3.49525	1.80598
650	4.66582	3.81722	2.82210	1.46142	5.97389	4.93259	3.64929	1.89136	5.76758	4.73224	3.49550	1.80928
660	4.64104	3.80471	2.81719	1.46152	5.93723	4.91248	3.64026	1.89003	5.74731	4.72484	3.49557	1.81249
670	4.61601	3.79198	2.81207	1.46152	5.90038	4.89214	3.63099	1.88857	5.72686	4.71719	3.49544	1.81562
680	4.59068	3.77900	2.80680	1.46140	5.86340	4.87163	3.62149	1.88699	5.70617	4.70932	3.49512	1.81867
690	4.56502	3.76575	2.80143	1.46117	5.82639	4.85096	3.61178	1.88529	5.68523	4.70127	3.49462	1.82163
700	4.53910	3.75226	2.79594	1.46085	5.78934	4.83010	3.60188	1.88347	5.66404	4.69305	3.49395	1.82450
710	4.51303	3.73856	2.79030	1.46045	5.75223	4.80905	3.59181	1.88153	5.64262	4.68465	3.49313	1.82728
720	4.48699	3.72475	2.78449	1.45999	5.71504	4.78782	3.58161	1.87949	5.62103	4.67604	3.49217	1.82999
730	4.46109	3.71089	2.77852	1.45946	5.67778	4.76641	3.57126	1.87735	5.59931	4.66722	3.49107	1.83261
740	4.43514	3.69693	2.77238	1.45886	5.64046	4.74485	3.56075	1.87513	5.57751	4.65819	3.48982	1.83516
750	4.40910	3.68284	2.76610	1.45817	5.60311	4.72316	3.55010	1.87281	5.55557	4.64897	3.48841	1.83764
760	4.38293	3.66859	2.75971	1.45740	5.56575	4.70139	3.53929	1.87041	5.53348	4.63959	3.48684	1.84004
770	4.35665	3.65419	2.75324	1.45654	5.52842	4.67951	3.52834	1.86792	5.51123	4.63006	3.48512	1.84237
780	4.33029	3.63965	2.74667	1.45561	5.49113	4.65754	3.51726	1.86535	5.48884	4.62039	3.48326	1.84463
790	4.30388	3.62500	2.74000	1.45461	5.45386	4.63548	3.50607	1.86270	5.46632	4.61056	3.48127	1.84682
800	4.27752	3.61029	2.73321	1.45357	5.41662	4.61334	3.49479	1.85997	5.44370	4.60058	3.47916	1.84895

Tiempo (min)	CONVERSIONES (%) para concentración inicial de lactosa 10%											
	Presión = 1 bar				Presión = 2 bar				Presión = 3 bar			
	55°C	50°C	45°C	37°C	55°C	50°C	45°C	37°C	55°C	50°C	45°C	37°C
40	2.08750	1.44067	0.93303	0.42076	2.52825	1.72972	1.10857	0.49539	3.37603	2.26596	1.43479	0.63460
45	2.22559	1.54314	1.00344	0.45431	2.71763	1.87089	1.20356	0.53979	3.54126	2.39952	1.52908	0.68097
50	2.35513	1.63550	1.06753	0.48512	2.89428	2.00083	1.29202	0.58152	3.67835	2.51444	1.61205	0.72279
55	2.47381	1.71953	1.12580	0.51320	3.06025	2.12060	1.37423	0.62058	3.79177	2.61263	1.68442	0.76005
60	2.58057	1.79776	1.17906	0.53872	3.21454	2.23153	1.45058	0.65703	3.88649	2.69628	1.74709	0.79283
65	2.67572	1.87274	1.22846	0.56196	3.35690	2.33525	1.52161	0.69098	3.96796	2.76788	1.80115	0.82132
70	2.76090	1.94414	1.27545	0.58338	3.48754	2.43369	1.58796	0.72259	4.04189	2.83016	1.84785	0.84581
75	2.83912	2.01093	1.32121	0.60354	3.60716	2.52777	1.65043	0.75207	4.10919	2.88615	1.88861	0.86668
80	2.91471	2.07250	1.36527	0.62317	3.71695	2.61700	1.70989	0.77970	4.16904	2.93908	1.92506	0.88443
85	2.98910	2.12860	1.40706	0.64288	3.81855	2.70110	1.76730	0.80580	4.22152	2.98892	1.95898	0.89964
90	3.05981	2.17937	1.44617	0.66232	3.91412	2.77990	1.82262	0.83075	4.26701	3.03456	1.99233	0.91301
95	3.12539	2.22535	1.48236	0.68117	4.00601	2.85338	1.87557	0.85499	4.30613	3.07600	2.02490	0.92532
100	3.18499	2.26747	1.51555	0.69918	4.09405	2.92167	1.92597	0.87890	4.33974	3.11333	2.05535	0.93747
105	3.23839	2.30702	1.54580	0.71617	4.17730	2.98501	1.97369	0.90204	4.36898	3.14673	2.08361	0.95045
110	3.28594	2.34571	1.57336	0.73201	4.25519	3.04380	2.01866	0.92424	4.39523	3.17648	2.10967	0.96464
115	3.32861	2.38511	1.59861	0.74660	4.32736	3.09857	2.06088	0.94548	4.42016	3.20296	2.13356	0.97827
120	3.36795	2.42408	1.62212	0.75994	4.39372	3.14998	2.10038	0.96575	4.44505	3.22664	2.15535	0.99115
125	3.40613	2.46166	1.64461	0.77205	4.45439	3.19884	2.13726	0.98504	4.46903	3.24810	2.17515	1.00326
130	3.44567	2.49724	1.66695	0.78303	4.50973	3.24609	2.17170	1.00337	4.49156	3.26801	2.19312	1.01461
135	3.48576	2.53036	1.69007	0.79301	4.56033	3.29249	2.20388	1.02076	4.51230	3.28713	2.20947	1.02521
140	3.52463	2.56074	1.71332	0.80218	4.60702	3.33737	2.23410	1.03724	4.53100	3.30626	2.22444	1.03507
145	3.56119	2.58828	1.73604	0.81081	4.65087	3.38035	2.26266	1.05288	4.54755	3.32506	2.23834	1.04423
150	3.59463	2.61302	1.75792	0.81921	4.69317	3.42121	2.28997	1.06771	4.56197	3.34314	2.25148	1.05274
155	3.62448	2.63521	1.77871	0.82772	4.73529	3.45980	2.31644	1.08181	4.57437	3.36032	2.26427	1.06065
160	3.65055	2.65525	1.79823	0.83678	4.77663	3.49599	2.34257	1.09527	4.58499	3.37647	2.27711	1.06803
165	3.67301	2.67369	1.81637	0.84647	4.81633	3.52974	2.36847	1.10818	4.59420	3.39151	2.29000	1.07497
170	3.69229	2.69129	1.83306	0.85596	4.85385	3.56107	2.39338	1.12063	4.60248	3.40537	2.30243	1.08155
175	3.70916	2.70896	1.84831	0.86514	4.88881	3.59004	2.41724	1.13276	4.61042	3.41804	2.31436	1.08789
180	3.72470	2.72777	1.86220	0.87396	4.92090	3.61679	2.44002	1.14465	4.61874	3.42957	2.32576	1.09411
185	3.74029	2.74761	1.87484	0.88238	4.94997	3.64149	2.46169	1.15618	4.62809	3.44002	2.33661	1.10032
190	3.75764	2.76726	1.88645	0.89038	4.97596	3.66441	2.48226	1.16728	4.63766	3.44950	2.34691	1.10659
195	3.77739	2.78630	1.89727	0.89795	4.99895	3.68585	2.50173	1.17796	4.64696	3.45817	2.35667	1.11269
200	3.79770	2.80438	1.90762	0.90508	5.01912	3.70616	2.52013	1.18822	4.65575	3.46623	2.36590	1.11860
210	3.83616	2.83669	1.92855	0.91811	5.05235	3.74521	2.55388	1.20748	4.67114	3.48147	2.38287	1.12984
220	3.86728	2.86302	1.95148	0.92972	5.07957	3.78339	2.58399	1.22513	4.68290	3.49755	2.39819	1.14032
230	3.88827	2.88341	1.97335	0.94037	5.10657	3.81804	2.61119	1.24129	4.69087	3.51378	2.41238	1.15009
240	3.89937	2.89916	1.99321	0.95073	5.13435	3.84862	2.63641	1.25613	4.69563	3.52869	2.42613	1.15921
250	3.90376	2.91282	2.01073	0.96109	5.15831	3.87500	2.66014	1.26988	4.69854	3.54204	2.43964	1.16781
260	3.90763	2.92818	2.02586	0.97087	5.17716	3.89733	2.68183	1.28279	4.70169	3.55377	2.45239	1.17603
270	3.91931	2.94562	2.03892	0.97994	5.19037	3.91608	2.70141	1.29491	4.70659	3.56397	2.46432	1.18402
280	3.93483	2.96158	2.05049	0.98826	5.19814	3.93201	2.71890	1.30615	4.71086	3.57291	2.47542	1.19176
290	3.94795	2.97513	2.06152	0.99586	5.20141	3.94617	2.73441	1.31655	4.71370	3.58103	2.48573	1.19918
300	3.95598	2.98585	2.07278	1.00282	5.20186	3.95925	2.74815	1.32611	4.71475	3.58891	2.49534	1.20629
310	3.95781	2.99379	2.08336	1.00928	5.20191	3.97047	2.76037	1.33490	4.71396	3.59645	2.50438	1.21310
320	3.95395	2.99948	2.09293	1.01547	5.20189	3.97965	2.77143	1.34300	4.71157	3.60330	2.51306	1.21962

330	3.94652	3.00397	2.10135	1.02150	5.19988	3.98674	2.78156	1.35048	4.70811	3.60934	2.52144	1.22589
340	3.93922	3.00876	2.10862	1.02720	5.19537	3.99180	2.79057	1.35747	4.70444	3.61455	2.52940	1.23196
350	3.93685	3.01406	2.11486	1.03252	5.18816	3.99505	2.79844	1.36399	4.70118	3.61896	2.53690	1.23786
360	3.93641	3.01852	2.12030	1.03744	5.17837	3.99680	2.80518	1.37002	4.69744	3.62266	2.54393	1.24360
370	3.93453	3.02173	2.12532	1.04197	5.16637	3.99748	2.81085	1.37555	4.69287	3.62584	2.55051	1.24916
380	3.92997	3.02353	2.13022	1.04614	5.15287	3.99742	2.81552	1.38062	4.68731	3.62871	2.55667	1.25454
390	3.92225	3.02393	2.13469	1.05002	5.13888	3.99631	2.81934	1.38524	4.68073	3.63128	2.56248	1.25973
400	3.91164	3.02318	2.13858	1.05372	5.12458	3.99407	2.82246	1.38944	4.67324	3.63339	2.56801	1.26476
410	3.89914	3.02170	2.14183	1.05727	5.10922	3.99069	2.82500	1.39329	4.66509	3.63499	2.57331	1.26962
420	3.88650	3.02015	2.14443	1.06061	5.09257	3.98620	2.82688	1.39682	4.65667	3.63605	2.57831	1.27434
430	3.87597	3.01866	2.14643	1.06373	5.07454	3.98069	2.82809	1.40006	4.64828	3.63661	2.58300	1.27895
440	3.86618	3.01666	2.14796	1.06659	5.05519	3.97434	2.82864	1.40300	4.63954	3.63670	2.58738	1.28344
450	3.85559	3.01396	2.14919	1.06922	5.03471	3.96734	2.82855	1.40564	4.63027	3.63641	2.59145	1.28780
460	3.84367	3.01047	2.15028	1.07163	5.01341	3.95985	2.82787	1.40799	4.62038	3.63588	2.59523	1.29203
470	3.83019	3.00620	2.15108	1.07385	4.99177	3.95175	2.82667	1.41006	4.60988	3.63509	2.59875	1.29614
480	3.81529	3.00127	2.15151	1.07593	4.96989	3.94300	2.82503	1.41187	4.59880	3.63397	2.60206	1.30012
490	3.79942	2.99590	2.15155	1.07791	4.94742	3.93358	2.82303	1.41345	4.58729	3.63250	2.60518	1.30398
500	3.78337	2.99040	2.15118	1.07975	4.92428	3.92352	2.82061	1.41482	4.57554	3.63065	2.60809	1.30774
510	3.76815	2.98485	2.15045	1.08144	4.90043	3.91287	2.81778	1.41601	4.56373	3.62845	2.61076	1.31141
520	3.75318	2.97898	2.14941	1.08296	4.87588	3.90172	2.81454	1.41700	4.55166	3.62591	2.61320	1.31499
530	3.73778	2.97269	2.14816	1.08432	4.85075	3.89017	2.81090	1.41779	4.53924	3.62310	2.61542	1.31847
540	3.72170	2.96592	2.14679	1.08554	4.82518	3.87832	2.80690	1.41840	4.52642	3.62008	2.61742	1.32186
550	3.70484	2.95869	2.14522	1.08663	4.79942	3.86610	2.80257	1.41882	4.51319	3.61687	2.61922	1.32514
560	3.68726	2.95106	2.14341	1.08762	4.77351	3.85349	2.79795	1.41907	4.49959	3.61340	2.62085	1.32833
570	3.66918	2.94315	2.14133	1.08853	4.74730	3.84048	2.79310	1.41917	4.48569	3.60968	2.62233	1.33143
580	3.65096	2.93513	2.13900	1.08934	4.72074	3.82710	2.78798	1.41913	4.47161	3.60568	2.62364	1.33445
590	3.63308	2.92704	2.13642	1.09005	4.69383	3.81336	2.78260	1.41896	4.45745	3.60142	2.62478	1.33739
600	3.61528	2.91875	2.13364	1.09064	4.66658	3.79933	2.77696	1.41866	4.44310	3.59692	2.62573	1.34026
610	3.59726	2.91019	2.13071	1.09112	4.63905	3.78506	2.77106	1.41823	4.42851	3.59220	2.62651	1.34305
620	3.57888	2.90134	2.12768	1.09149	4.61131	3.77060	2.76493	1.41767	4.41366	3.58732	2.62712	1.34576
630	3.56011	2.89220	2.12452	1.09178	4.58347	3.75592	2.75859	1.41699	4.39853	3.58229	2.62758	1.34839
640	3.54099	2.88282	2.12119	1.09199	4.55558	3.74102	2.75206	1.41618	4.38316	3.57706	2.62790	1.35095
650	3.52161	2.87325	2.11768	1.09214	4.52755	3.72588	2.74538	1.41528	4.36758	3.57164	2.62809	1.35343
660	3.50215	2.86360	2.11400	1.09222	4.49937	3.71052	2.73853	1.41428	4.35188	3.56601	2.62815	1.35585
670	3.48284	2.85390	2.11015	1.09222	4.47105	3.69496	2.73150	1.41318	4.33609	3.56019	2.62807	1.35820
680	3.46356	2.84407	2.10616	1.09215	4.44259	3.67922	2.72430	1.41200	4.32018	3.55418	2.62785	1.36049
690	3.44417	2.83407	2.10207	1.09199	4.41402	3.66335	2.71695	1.41073	4.30410	3.54801	2.62748	1.36272
700	3.42461	2.82388	2.09790	1.09175	4.38539	3.64737	2.70944	1.40936	4.28785	3.54171	2.62698	1.36488
710	3.40487	2.81353	2.09363	1.09145	4.35674	3.63127	2.70179	1.40791	4.27142	3.53528	2.62636	1.36698
720	3.38498	2.80301	2.08926	1.09109	4.32808	3.61504	2.69402	1.40638	4.25482	3.52871	2.62563	1.36902
730	3.36496	2.79239	2.08476	1.09069	4.29940	3.59868	2.68615	1.40477	4.23809	3.52199	2.62479	1.37099
740	3.34492	2.78170	2.08014	1.09023	4.27069	3.58220	2.67817	1.40310	4.22127	3.51511	2.62384	1.37291
750	3.32495	2.77097	2.07540	1.08971	4.24196	3.56561	2.67008	1.40136	4.20438	3.50808	2.62278	1.37478
760	3.30498	2.76014	2.07056	1.08914	4.21323	3.54893	2.66188	1.39955	4.18739	3.50091	2.62160	1.37659
770	3.28496	2.74921	2.06565	1.08850	4.18449	3.53218	2.65358	1.39768	4.17029	3.49362	2.62031	1.37834
780	3.26490	2.73819	2.06069	1.08781	4.15578	3.51537	2.64518	1.39575	4.15309	3.48622	2.61891	1.38005
790	3.24480	2.72709	2.05564	1.08707	4.12710	3.49850	2.63669	1.39376	4.13580	3.47872	2.61741	1.38170
800	3.22470	2.71592	2.05052	1.08629	4.09846	3.48156	2.62813	1.39172	4.11842	3.47109	2.61581	1.38329



Anexo 7

PROGRAMA PARA CALCULAR PRODUCTIVIDADES

A.7.1. Rutina de MATLAB el cálculo de productividades

```

% Se ejecuta desde MATLAB Command Window ---> productividad
% Programa para el cálculo de la producción en un reactor
% agitado continuo, con caudal variable en el tiempo, cinética de
% Michaelis-Menten competitiva por producto considerando la
desactivación
% térmica del biocatalizador.
% Autor: Silvina Regenhardt
% Versión: Diciembre de 2009

for P = 1:3

    for T = 1:4
        produc(T,P) = productividad(T,P,146.2,3801.25);
    end
end

Temperaturas = 55:-5:37;
plot(Temperaturas,produc)
legend('P = 1','P = 2','P = 3')

% MÓDULO DE INTRODUCCIÓN DE DATOS

function z = productividad(T0,P0,S00,E00)

global S0 E0 Km Ki k2 kd Presiones Temperaturas P T

Presiones = [1 2 3];
Temperaturas = [65 50 45 37];

S0 = S00;
E0 = E00;
T = T0;
P = P0;
TiempoFinal = 800;

% CONSTANTES
% constantes universal de los gases
R = 1.978;

% Constante de Michaelis-Menten
Km = 279; % [mmol/L]

% Constante de inhibición
Ki = 7000; % [mmol/L]

% MÓDULO DE CÁLCULO DE VARIABLES
contador=1;

% constantes variables
Temp = 273 + Temperaturas(T);

k2 = 3.60e10 * exp(-21128.99/(R*Temp));
% Cte. de desactivación térmica

```

```

kd = 2.58e5 * exp(-12694.49/(R*Temp));

% MÓDULO DE RESOLUCIÓN DE LA ECUACIÓN DIFERENCIAL
[t, variable] = ode45('vel2', [0:TiempoFinal/800:TiempoFinal], [S0
0]);

S = variable(:,1);
prod = variable(:,2);

% MÓDULO GRÁFICAS
plot(t,prod)

z = prod(end)/TiempoFinal;

```

A.7.2. Subrutina para cargar la ecuación diferencial que debe ser integrada

```

function z = vel2(t, variable)

% Variables S (concentración de lactosa en el tiempo) y
prod(Productividad)

S = variable(1);
prod = variable(2);
z = zeros(2,1);

% Constantes globales
global S0 E0 Km Ki k2 kd Presiones Temperaturas P T

% S0: Concentración inicial de lactosa
% E0: Concentración inicial de enzima (enzima inmovilizada en la
membrana)
% Km: Constante de Michaelis-Menten
% Ki: Constante de inhibición
% kd: Constante de desactivación térmica de la enzima
% T: Temperatura
% P: Presión

% Constantes del modelo de flujo de permeado

todas_las_a = [0.0499  0.0499  0.0499  0.0499
               0.0666  0.0666  0.0666  0.0666
               -0.034  -0.0328 -0.0328 -0.0328];

todas_las_b = [0.8003  0.8003  0.8003  0.8003
               0.9588  0.9588  0.9588  0.9588
               -0.1641 -0.1539 -0.1539 -0.1539 ];

todas_las_c = [5.23    5.0667  4.9557  4.865
               5.3084  5.1366  5.0257  4.935
               2.28    2.1288  2.018  1.9273];

if (t < 1)
    tt = 1;
else
    tt = t;
end

```

```
a = todas_las_a(P,T);
b = todas_las_b(P,T);
c = todas_las_c(P,T);

d=0.003375; %cte. = (A/V)/60

% Modelo del flujo de permeado
J = exp(a * log(tt)^2 - b * log(tt) + c );

% Ecuación diferencial para resolver el modelo de Ultrafiltración-
Reacción
z(1) = J * d * (S0 - S) ...
      - ( k2 * E0 * exp(-kd * t) * S ) ...
      / ( S + Km * ( 1 + (S0 - S)/Ki ) );

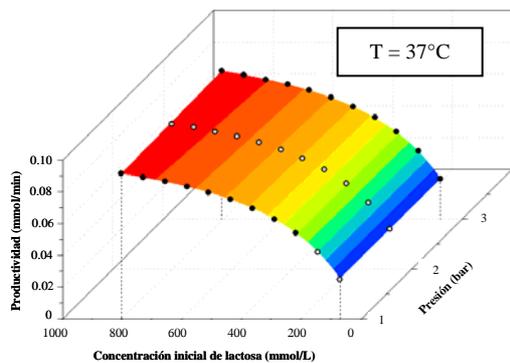
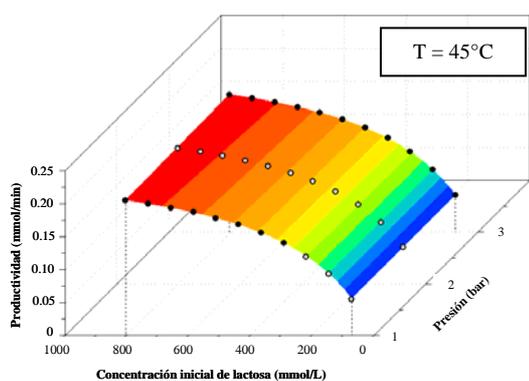
% Ecuación para resolver la productividad
z(2) = J * d * (S0 - S);
end
```



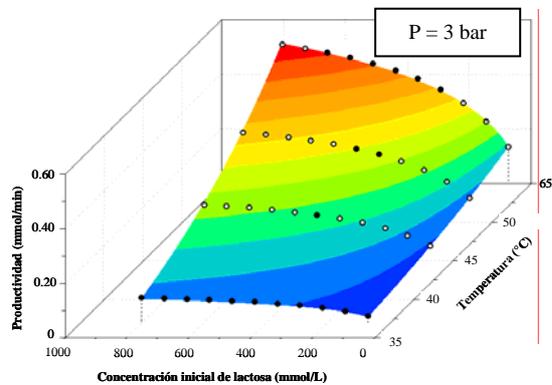
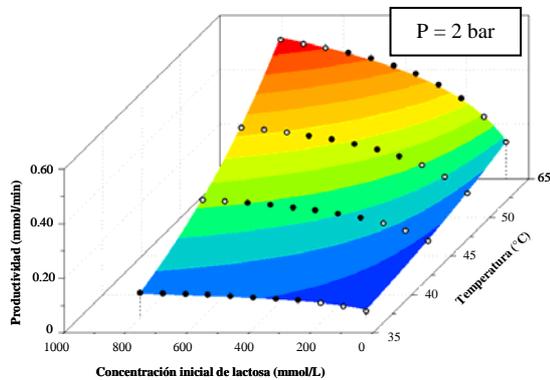
Anexo 8

CURVAS DE PRODUCTIVIDAD

A.8.1. Curvas de Productividad en función de S_0 y la presión a distintas temperaturas



A.8.2. Curvas de Productividad en función de S_0 y la Temperatura a distintas presiones





NOMENCLATURA

Especies

E:	Enzima β -Galactosidasa
E.GA:	Complejo enzima-producto (β -Galactosidasa–galactosa)
E.LA:	Complejo enzima-sustrato (β -Galactosidasa–lactosa)
GA:	Galactosa
GL:	Glucosa
I:	Especie genérica
LA:	Lactosa
S:	Sustrato

Variables

α :	Constante de la función de flujo
β :	Constante de la función de flujo
γ :	Constante de la función de flujo
$\theta_{1/2}$:	Tiempo de vida media (h)
κ_A :	Constante de Arrhenius o factor preexponencial
κ :	Parámetro que caracteriza el ensuciamiento de la membrana
τ :	Tiempo de residencia en el reactor (min)
ε :	Porosidad de la membrana
μ :	Viscosidad del fluido que permea a través de la membrana
Γ :	Coefficiente de permeabilidad de la membrana
η :	Cociente entre la actividad residual de la enzima a tiempos largos y su valor inicial
P_T :	Presión transmembrana (bar)
Δx :	Espesor de la membrana (cm)
δ :	Espesor de la capa límite (cm)
Ω :	Gradiente de potencial en el soporte
A:	Area (cm ²)
Act:	Actividad enzimática (μ moles glucosa liberada min ⁻¹ g ⁻¹ material) o (LAU)
b:	Parámetro que caracteriza el ensuciamiento de la membrana
C:	Concentración de la alimentación (mol L ⁻¹)
d_p :	Diámetro de poro (cm)
Γ :	Coefficiente de permeabilidad de la membrana
D:	Coefficiente de difusión
Ea:	Energía de activación (kcal gmol ⁻¹)
F:	Caudal molar (mol lt ⁻¹)
F _a :	Constante de Faraday
FE:	Factor de Estabilidad
IRA:	Indice de recobro de actividad (%)
J:	Flujo a través de la membrana (L h m ⁻²)
k_1 :	Constante de velocidad de reacción (mmoles lt ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹)
k_{-1} :	Constante de velocidad de reacción (mmoles lt ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹)
k_2 :	Constante de velocidad de reacción (mmoles lt ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹)

k_3 :	Constante de velocidad de reacción (mmoles $l^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)
k_{-3} :	Constante de velocidad de reacción (mmoles $l^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)
k_d :	Constante de desactivación (h^{-1})
k_i :	Constante de inhibición (mmoles l^{-1})
k :	Coefficiente de transferencia de masa ($L \text{ h m}^{-2}$)
K_m :	Constante de Michaelis-Menten (mmoles l^{-1})
K :	Constante de velocidad de reacción
k_f :	Constante de velocidad de pérdida de actividad (h^{-1})
M :	Peso molecular de la glucosa (180 g gmol^{-1})
N :	Número total de observaciones
p :	Masa (g)
Prot:	Cantidad de proteína (mg)
R :	Constante universal de los gases ($\text{kcal gmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
r_i :	Velocidad de producción o desaparición de la especie I por reacción química (mmoles $l^{-1} \text{ min}^{-1}$)
R :	Resistencia
R^2 :	Coefficiente de correlación
T :	Temperatura absoluta ($^{\circ}\text{K}$)
t :	Tiempo (s)
V :	Volumen (lt)
V_t :	Volumen total del tanque agitado (lt)
V_r :	Volumen de reacción (lt)
V_{\max} :	Velocidad máxima de reacción (mmoles $l^{-1} \text{ min}^{-1}$)
x :	Espesor de la capa de Nernst
X_I :	Conversión de la especie I por reacción química
x_i :	Valores experimental de una observación
y_i :	Valor estimado de una observación
z :	Valencia del sustrato

Subíndices

0:	A tiempo inicial
1:	En la entrada del reactor
2:	En el permeado
3:	En el retentado (reciclo)
e:	Específico en las condiciones ensayadas
es:	Específico en las condiciones estándar
ef:	Efectivo
f:	Al finalizar la experiencia
inm:	Inmovilizada
l :	libre
s:	En la superficie de la membrana
B:	En el seno del fluido
G:	En la capa de gel
M:	Intrínseca a la membrana
F:	Debido al ensuciamiento
ϕ :	Función de las variables que afectan la transferencia de masa
SS:	En estado estacionario

r: Relativo

H₂O: Agua

Supraíndices

' : Parámetros cinéticos intrínsecos de la enzima inmovilizada

0: Inicial

cat: Catalizador

enz: Enzima

t: A un tiempo t



REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- Arroyo M. 1998. Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. 39 (2): 23-39
- Axén, R., J. Porath y S. Ernback. 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*. 214: 1302–1304.
- Bailley J. y D. Ollis. 1977. *Biochemical engineering fundamentals*. Mc. Graw-Hill Inc. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Barnes, L. 1994. *Manual de nutrición en pediatría*. 3ra. Edición. Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Becker V. y H. Evans. 1969. The influence of monovalent cations and hydrostatic pressure on β -galactosidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 191: 95-104.
- Belfort, G., R. H. Davis, y A. L. Zydney. 1994. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science* 96 (1-2): 1-58
- Bernal V. y J. Pavel. 1985. Lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* β -D-galactosidase in skim milk, whey, permeate and model system. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 18: 97-99.
- Betancor, L., A. Hidalgo, G. Fernandez-Lafuente, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, R. y J. M. Guisan. 2003. Preparation of stable biocatalyst of bovine liver catalase. *Biotechnol. Prog.* 19: 763-767.
- Betancor, L., F. López-Gallego, N. Alonso-Morales, G. Dellamora, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, y J. M. Guisan. 2006. Glutaraldehyde in Protein

- Immobilization. A Versatile Reagent From: Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition Edited by: J. M. Guisan © Humana Press Inc., Totowa, NJ, 57-64
- Bhave, R.R. 1991. Inorganic membranes: Synthesis, characterization and applications. Van Nostrand Reinhold, Nueva York, EEUU.
- Bird, R.B., W.E. Stewart y E.N. Lightfoot. 1960. Transport *Phenomena*. John Wiley & Sons, New York.
- Bódalo, A.; J. L. Gómez; E. Gómez, M. Fuensanta Máximo, y M. C. Montiel. 2005. Development and experimental checking of an unsteady-state model for ultrafiltration continuous tank reactors. *Chemical Engineering Science*. 60(15): 4225-4232
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
- Brena, B. y F. Batista-Viera. 2006. Enzyme Immobilization Methods 1965-1995: a literature survey (Chapter 2). In: “Methods in Biotechnology, Vol.22: Immobilization of enzymes and cells”, 2nd Edition, José M. Guisán, Editor. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 15-30.
- Calabrò, V.; S. Curcio y G. Iorio. 2002. A theoretical analysis of transport phenomena in a hollow fiber membrane bioreactor with immobilized biocatalyst *Journal of Membrane Science*. 206 (1-2): 217-241
- Carrara C. y A. Rubiolo. 1994. Immobilization of β -galactosidase on chitosan. *Biotechnol. Prog.* 10: 220-224.

- Carrara, C. R. y A.C. Rubiolo. 1996. Determination of kinetics parameters for free and immobilized β -galactosidase *Process Biochemistry*. 31: 243-248
- Cheryan M. y M. A. Mehaia. 1986. Membrane Bioreactors. Membrane separations in *Biotechnology* (McGregor C. W., ed) Marcel Dekker, Nueva York, 255-301
- Cheryan M. y W. D. Deeslie. 1980. Production of protein hydrolyzates in UF-enzyme reactors. *Ultrafiltration Membranes and Applications* (Cooper A R, ed.) Plenum Press. Nueva York, 591-601
- Cheryan, M. 1998. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, EEUU.
- Daufin G., F Michel y U Merin. 1992. Study of ultrafiltration of defatted whey protein concentrates (WPC) withdrawn from an industrial plant. *Lait*. 72: 185 – 199
- Defrice, D. y V. Gekas. 1988. Microfiltration membranes and the problem of microbial adhesion. *Process Biochem*. 23: 105-116
- Doraiswamy L. 1984. Recent advances in the engineering analysis of chemically reacting systems. J. Wiley. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Drobnick, J., W. Labsky, H. Kudlvasrová, V. Saudek y F. Svec. 1982. The activation of hydroxy groups of carriers with 4-nitrophenyl and N-hydroxysuccinimidyl chloroformates. *Biotechnol. Bioeng*. 24: 487–493.
- Field, R. 1996. En *Industrial Membrane Separation Technology*. K. Scott y R. Hoghes (Editores) Blakie Academic London, UK. P. 67
- Fox, P. F. 1987. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 1. General Aspects. Elsevier Applied Science, London and New York.

- Gan Q., S. J. Allen y G. Taylor. 2002. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*. 12: 223-229.
- Giorno L. y E. Drioli. 2000. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Trends in Biotechnology*. 18: 339-349.
- Green H. y F. Ghishan. 1982. Excessive fluid intake as a cause of chronic diarrhea in young children. *Journal Pediatr*. 102: 836-840
- Guisán, J. M. 1988. Agarose-aldehyde gels as supports for immobilization- stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol*. 10: 375–382.
- Guisán, J. M. 2006. “Methods in Biotechnology, Vol.22: Immobilization of enzymes and cells”, 2nd Edition, José M. Guisán, Editor. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Hannibal-Friedrich O., M. Chun y M. Sernetz. 1980. Immobilization of β -galactosidase, albumin, and γ -globulin on epoxy-activated acrylic beads. *Biotechnol. Bioeng*. 22: 157-175.
- Hatzinikolaou D. G., E. Katsifas, D. Mamma, A. D. Karagouni, P. Christakopoulos y D. Kekos. 2005. Modeling of the simultaneous hydrolysis – ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*. 24: 161–172.
- Henley S. y T. Sadana. 1986. Deactivation theory. *Biotechnol. Bioeng*. 28: 1277-1285.
- Henley S. y T. Sadana. 1989. Graphical determination of mean activation theory energy and standard deviation in a microheterogeneity model of enzyme deactivation. *Biotechnol. Bioeng*. 34: 916-923.

- Hobman, P. 1984. Review of processes and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. *J. Dairy Sci.* 67: 2631-2653.
- Hornby W., M. Lilley y E. Cook. 1968. Some changes in the reactivity of enzymes resulting from their Chemicals attachment to water-insoluble derivatives of cellulose. *Biochem. J.* 107: 669-674
- Horton R., L. Moran, R. Ochs, J. Rawn y K. Scrimgeour. 1995. *Bioquímica*. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México, México.
- Illanes, A., C. Altamirano, A. Aillapán, G. Tomasello y M. E. Zuñiga. 1998. Packed-bed reactor performance with immobilized lactase under thermal inactivation. *Enzyme and Microbial Technology.* 23(1-2): 3-9
- Illanes, A., L. Wilson y G. Tomasello. 2001. Effect of modulation of enzyme inactivation on temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 11(4-6): 531-540
- Jaffrin, M. H., L. H. Ding, Ch. Couvreur y P. Khari. 1997. Effect of ethanol on ultrafiltration of bovine albumin solutions with organic membranes . *Journal of Membrane Science.* 124(2): 233-241
- Jucker, C. y M. Clark. 1994. Adsorption of aquatic humic substances on hydrophobic ultrafiltration membranes. *J. Membr. Sci.* 97: 37-52
- Jurado E., F. Camacho, G. Luzon y J.M. Vicaria. 2006. Influence of the hollow-fibre membrane on the stability of β -galactosidase and on lactose hydrolysis. Kinetic models including adsorption of the enzyme onto the membrane. *Enzyme and Microbial Technology.* 39: 1008-1015.

- Jurado, E., F. Camacho, G. Luzón y J. M. Vicaria. 2002. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 300-309.
- Katchalski E., I. Silman y R. Goldman. 1971. Effect of the microenvironment on the mode of action of immobilized enzymes. *Adv. Enzymol.* 34: 445-536
- Katchalsky-Katsir E. 1993. Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnol.* 11: 471-478
- Kuo, K.P. y M. Cheryan. 1983. Ultrafiltration of acid whey in a spiral-wound unit. Effect of operating parameters on membrane fouling. *J. Food Sci.* 48(4):1113-1117.
- Kuo-Cheng C., H. Jer-Ying y C. Alvin. 1985. Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 510-514.
- Ladero M., A. Santos y F. García-Ochoa. 2000. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 583-592.
- Lawson, T. G., F. E. Regnier y H. L. Wieth. 1983. Separation of synthetic oligonucleotides on columns of microparticulate silica coated with crosslinked polyethylene-imine. *Anal. Biochem.* 133: 85-93.
- Lloyd-Still J. 1979. Chronic diarrhea and the misuse of elimination diets. *Journal Pediatr.* 95: 10-13
- Lonsdale, H.K. 1987. Editorial: What is a membrane? *J. Memb. Sci.*, 34: 125-126.
- Lonsdale, H.K. 1989. Editorial: What is a membrane? Part II, *J. Memb. Sci.*, 43: 1-4

- Lopes, F. L. G., Severo Jr., J. B., Ribeiro, V. C. S., Ferreira, H. S. y Santana J. C. C. 2008. Desenvolvimento de um modelo matemático para simulação do fluxo de permeado da microfiltração tangencial do suco do Ananas comosus L. Merrill. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química.
- López C., I. Mielgo, M. T. Moreira, G. Feijoo y J. M. Lema. 2002. Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. *Journal of Biotechnology*. 99: 249-257.
- Mahoney R. y E. Adamchuk. 1980. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.* 45: 962-964 y 968.
- Mahoney R. y J. Whitaker. 1978. Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Science*. 43: 584-591.
- Mammarella E. J. 2001. Estudio del sistema de inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa. Tesis doctoral. Facultad de Ingeniería Química - UNL
- Marshall, A.D., P. A. Munro y G. Trägårdh. 1993. The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: A literature review. *Desalination*, 91(1): 65-108.
- Matthiasson, E. y B. Sivik. 1980. Concentration polarisation and fouling. *Desalination* 35: 59–103
- McCaffrey, R.R., R. E. McAtee, A. E. Grey, C. A. Allen, D. G. Cummings, A. D. Appelhans, R. B. Wring y J. G. Jolley. 1987. Inorganic membranes technology. *Sep. Sci. Technol.*, 22: 873-887.

- McDonough, F. E., R. E. Hargrove, W. A. Mattingly, L. P. Posati y J. A. Alford. 1974. Composition and Properties of Whey Protein Concentrates from Ultrafiltration. *Journal of Dairy Science* . 57: 1438-1443.
- McSweeney P. y P. F. Fox. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London
- Merin,U. y M. Cheryan. 1980. Factors affecting the mechanism of flux decline during ultrafiltration of cottage cheese whey. *J.Food Process. Preserv.* 4(3): 183-198
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación SAGPyA (2007 – 2008)
www.sagpya.mecon.gov.ar
- Montgomery, D. 2002. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Segunda Edición. Linusa–Wiley, México D.F.
- Nilsson, J. 1990. Protein fouling of UF membranes: Causes and consequences. *J. Membrane Sci.* 52: 121–142.
- Novalin S., W. Neuhaus y K. D. Kulbe. 2005. A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk *Journal of Biotechnology.* 119: 212-218.
- Office of Premarket Approval. 1998. Partial list of enzyme preparations that are used in foods. Center for Food Safety & Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. Rockville, Estados Unidos de América.
- Okos M., E. Grulke y A. Syverson. 1978. Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase adsorbed to a phenol formaldehyde resin. *J. Food Sci.* 43: 566-571.

- Palacio, L., J. I. Calvo, P. Pradanos, A. Hernandez, P. Väisänen y M. Nyström. 1999. Contact angles and external protein adsorption onto ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*. 152: 189-201.
- Papayannakos, N.; G. Markas y D. Kekos. 1993. Studies on modeling and simulate on of lactose hydrolysis free and immobilized beta-galactosidase from *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Journal*. 52 (1): B1-B12
- Phillips, G.O y P.A. Williams (Eds.) 2000. *Handbook of hydrocolloids*; Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK
- Porath, J. y R. Axén. 1976. Immobilization of enzymes to agar, agarose, and Sephadex supports. In: *Methods in Enzymology*, volume XLIV, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, New York, NY, pp. 19–45.
- Prazeres D. M. F. y J. M. S. Cabral. 1994. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 16 (9): 738-750.
- Prazeres D. M. F., F. Lemos y J. M. S. Cabral. 1996. Modeling of membrane bioreactors NATO ASI Series, Series E: Applied science. 305: 191-200
- Regenhardt, S. A., E. J. Mammarella y A. C. Rubiolo. 2008. XXI Simposio Iberoamericano de Catálisis (SICAT) 1037-1046
- Richmond M. y J. Gray. 1981. Beta-galactosidasa: Review of recent research related to technological application, nutritional concern and immobilization. *J. Dairy Sci*. 64: 1759-1771.
- Rios, G. M., M. P. Belleville, D. Paolucci, J. Sanchez. 2004. Progress in enzymatic membrane reactors: A review. *Journal of Membrane Science*. 242: 189–196.

- Roberts D. 1977. Enzyme kinetics. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
- Robertson, D. E. y B. A. Steer. 2004. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 141-149
- Roy I. y M. N. Gupta. 2003. Lactose hydrolysis by LactozymTM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry.* 39: 325-332.
- Sadana, A. 1991. *Biocatalysis: Fundamentals of Enzyme Deactivation Kinetics.* Prentice Hall, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.
- Sadana, A. y J. P. Henley. 1987. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 30, pp: 717–723.
- Santos A., M. Ladero y F. García-Ochoa. 1998. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technol.* 22: 558-567.
- Scott, K. 1995. *Handbook of industrial membranes.* Elsevier Sci. Publishers, Ltd., Oxford, Gran Bretaña.
- Shang-Tian Y. y M. Okos. 1989. A new graphical method for determining parameters in Michaelis-Menten type kinetics for enzymatic lactose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 763-773.
- Siso M. 1993. Covalent immobilization of β -galactosidase on corn grits. A system for lactose hydrolysis without diffusional resistances. *Process Biochem.* 29: 7-12.

- Suki, A, A. G. Fane y C. J. D. Fell. 1984. Flux decline in protein ultrafiltration, J. Membrane Sci., 21, 269–283
- Van der Burg B. y V. G. H. Eijssink. 2002. Selection of mutations for increased protein stability. Curr. Opin. Chem. Biol. 13: 333-337
- Walter-Smith J. 1988. Diseases of small intestine in childhood. Butterworths. Londres, Reino Unido.
- Wang X. y E. Ruckenstein. 1993. Preparation of porous polyurethane particles and their use in enzyme immobilization. Biotechnol. Prog. 9: 661-665.
- Weetall H. y B. Noshir. 1974. The preparation of immobilized lactase and its use in enzymatic hydrolysis of acid whey. Biotechnol. Bioeng. 16: 295-313.
- Wilchek, M. y T. Miron. 1982. A spectrophotometric assay for soluble and immobilized N-hydroxysuccinimide esters. Anal. Biochem. 126: 433–435.
- Wiseman A. 1991. Manual de biotecnología de los enzimas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Wiseman A. 1991. Manual de biotecnología de los enzimas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Zadow, J. G. 1984. Lactose: Properties and uses. J. Dairy Sci. 67: 2655-2679
- Zadow, J. G. 1992. Lactose Hydrolysis in Whey and Lactose Processing. Elsevier Science Publishers Ltd., Amsterdam, Holanda.
- Zhou, Q. Z. K. y X. Dong Chen. 2001. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biochemical Engineering Journal. 9 (1): 33-40