



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Desarrollo de un proceso para el fraccionamiento
de hidrolizados de proteínas de yema de huevo**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Alimentos

Presenta:

Alba Lucia Peñaranda López

Asesores:

Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez
Dr. Edmundo Brito De La Fuente

RESUMEN

Peñaranda López, Alba Lucia. M. en C. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio del 2020. Desarrollo de un proceso para el fraccionamiento de hidrolizados de proteínas de yema de huevo. Asesores: Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez. Dr. Edmundo Brito De La Fuente.

La yema de huevo libre de lecitina (LFEY), es un subproducto del proceso de extracción de lecitina de la yema de huevo, que contiene un alto contenido proteico. Debido a esto, la LFEY tiene un gran potencial para la producción de hidrolizados, que pueden ser utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica debido a sus propiedades funcionales y/o nutricionales. Sin embargo, para aprovechar al máximo estas propiedades, los hidrolizados requieren de un fraccionamiento, con el fin de obtener una fracción con mejores propiedades funcionales y/o biológicas. La ultrafiltración (UF) se ha empleado como método de fraccionamiento de hidrolizados, sin embargo existen pocos estudios sobre el efecto de las variables de operación en el desempeño del proceso. Sobre esa base, en este proyecto se emplearon condiciones óptimas de reacción y se establecieron condiciones de proceso, para el fraccionamiento de hidrolizados obtenidos de dispersiones concentradas de proteína ($\geq 10\%$) empleando la ultrafiltración.

Operando en modo flujo pistón, se comparó el desempeño de membranas poliméricas de diferente naturaleza y diámetro de poro: celulosa regenerada (RC), polietersulfona (PES) y triacetato de celulosa (TCA) y se estudió el efecto de la concentración de proteína [P], grasa [G] y los solutos no solubles (SNS), en el desempeño del proceso. Se encontró que la concentración inicial de proteína tuvo un efecto importante en el flux y que la ausencia de los SNS tuvo un impacto negativo en el fraccionamiento. El contenido inicial de grasa disminuyó el desempeño de la UF, observándose el mayor efecto al trabajar con una concentración inicial de proteína y de grasa del 10%. También se observó que la membrana de TCA empleada, presentó el menor flux debido a su mayor resistencia intrínseca, mientras que las membranas de PES presentaban el mayor ensuciamiento, siendo las membranas de RC, las que presentaban el mejor desempeño.

La membrana polimérica seleccionada en el sistema flujo pistón, se comparó en flujo tangencial con membranas cerámicas y se establecieron condiciones hidrodinámicas, que permitieron operar el proceso manteniendo un flux sostenible (J_s). Las membranas cerámicas presentaron un mejor desempeño en comparación con las de RC, fenómeno atribuido a diferencias en la microestructura entre estas. Posteriormente, se estudió el efecto de la diafiltración (DF) con la membrana cerámica de 50 kDa (la cual presentó el mejor desempeño en el sistema tangencial) con el fin de obtener rendimientos de recuperación elevados. Para concentraciones de proteína del 10% un diavolumen (N_D) de 1.5 se recuperó el 90% de los péptidos solubles, mientras con un 20%, un N_D de 1 fue suficiente para obtener un rendimiento de recuperación del 90%. La UF empleando membranas cerámicas, es una herramienta útil para el fraccionamiento de hidrolizados de proteína de yema de huevo. La incorporación de conceptos como el de flux sostenible y la DF, permite la obtención de altos valores de flux y rendimientos de recuperación de proteína soluble elevados.

ABSTRACT

Peñaranda López, Alba Lucia. MSc. Technological Institute of Veracruz. June 2020. Development of a fractionation process for egg yolk protein hydrolysates. Advisers: Dr. Beatriz Torrestiana Sánchez. Dr. Edmundo Brito De La Fuente.

Lecithin-free egg yolk protein (LFEY) is a byproduct from the lecithin extraction process, with a high protein content, so enzymatic hydrolysis is an option for obtaining hydrolysates with functional peptides with higher added value. Hydrolysates can be used as ingredients in food and pharmaceutical industry due to their functional and/or nutritional properties. However, these hydrolysates must be rich in small peptides, hence a fractionation process is required. The fractionation process leads to a product with higher added value, a fraction with better functional and/or biological properties than the original hydrolysate is obtained. Ultrafiltration (UF) has been used as a method for fractionating hydrolysates and just a few researchers study the effect of operating conditions on the process performance. In this project, optimal conditions were used during the enzymatic hydrolysis and process conditions were established for the fractionation of concentrated protein dispersions ($\geq 10\%$) by ultrafiltration.

The performance of polymeric membranes of different nature and pore diameter: regenerated cellulose (RC), polyethersulfone (PES), cellulose triacetate (TCA) were compared, using a dead-end system. The effect of the initial protein and fat concentration on the performance of the process, as the absence of the not soluble solutes (SNS), was also studied. It was found that the initial protein concentration had an important effect on the flux and the absence of the SNS had a negative impact on fractionation. The initial fat content decreased the performance of the fractionation; however, the biggest effect was observed when an initial concentration of 10% of protein and fat were employed. It was also found that the TCA membrane, had the lowest flux due to its higher membrane resistance, while the PES membranes had the highest fouling. Therefore, the RC membranes showed the highest performance.

Polymeric membranes selected from the previous stage, were compared with ceramic membranes in a cross-flow system. Hydrodynamic conditions were established to operate under a sustainable flux. Ceramic membranes had the best performance compared with RC membranes; such phenomenon was attributed to differences in the microstructure of the membranes. Then, employing the 50 kDa ceramic membrane (which had the best performance), the effect of diafiltration process was studied, in order to have higher recovery yields. For protein concentrations of 10%, with a diavolume (N_D) of 1.5, a 90% of the soluble peptides were recovered, while with a 20%, a N_D of 1 was enough to obtain a yield recovery of 90%. UF with ceramic membranes is a useful tool for egg yolk protein hydrolysates fractionation. The incorporation of concepts as sustainable flux and diafiltration leads to high values of flux and yield soluble protein recovery.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACIONES Y SUBÍNDICES.....	v
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	3
1.2. SEPARACIÓN POR MEMBRANAS: ULTRAFILTRACIÓN	9
1.2.1. Modelo de resistencias	9
1.2.2. Proceso de purificación de péptidos empleando membranas.....	10
1.2.2.1. Presión Transmembrana (TMP).....	13
1.2.2.2. Material de la membrana y MWCO.....	15
1.2.2.3. Efecto de la concentración de proteína y composición del hidrolizado en la ultrafiltración.....	17
1.2.2.4. Efecto del pH.....	19
1.2.3. Flux crítico y flux sostenible	20
1.2.4. Diafiltración	25
2. SINTESIS DE ANTECEDENTES	31
3. HIPÓTESIS.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1. ETAPA 1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GRASA Y PROTEÍNA DURANTE LA UF EMPLEANDO MEMBRANAS DE DISCO.	35
5.1.1. Extracción de grasa en la yema de huevo libre de lecitina.....	36
5.1.2. Estimación del grado de hidrólisis (DH).....	37
5.1.3. Ultrafiltración en flujo pistón.....	38
5.2. ETAPA 2. PRODUCCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS HIDROLIZADOS EMPLEANDO UF TANGENCIAL (V=5 L)	40
5.2.1. Reactor enzimático usado en la hidrolisis.....	40
5.2.2. Sistemas de filtración tangencial empleados durante la UF de los hidrolizados.....	41
5.2.3. Método para establecer el flux sostenible.....	43
5.2.4. Separación de los péptidos	43
5.3. MÉTODOS EXPERIMENTALES Y DE ANÁLISIS:	46

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1. SISTEMA FLUJO PISTÓN.....	50
6.1.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EMPLEANDO UN REACTOR ACOPLADO A UN IMPULSOR HELICOIDAL ($V_T=300$ mL).....	50
6.1.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE PROTEÍNA Y GRASA EN EL FLUX DE PERMEADO DURANTE EL FRACCIONAMIENTO.	56
6.2.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EMPLEANDO UN REACTOR ACOPLADO A UN IMPULSOR HELICOIDAL ($V_T=5$ L).....	62
CONCLUSIONES.....	85
BIBLIOGRAFÍA	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Hidrólisis pancreática de la caseína (Mahmoud & Cordle, 2000)	5
FIGURA 1.2. Dispersión de proteína con [P]=20% en el reactor de 100 mL con agitación magnética.	8
FIGURA 1.3. Impulsor helicoidal. Donde D es el diámetro del tanque, w y d el espesor y diámetro del impulsor respectivamente.	8
FIGURA 1.4. Correlación entre la presión transmembrana y el flux.....	10
FIGURA 1.5. Representación esquemática de la polarización por concentración y el ensuciamiento en la superficie de la membrana (Benhabiles <i>et al.</i> , 2012).	21
FIGURA 1.6. Descripción gráfica a) del flux crítico (J_c), el flux sostenible (J_s) b) flux crítico fuerte (J_{cF}) y flux crítico débil (J_{cD}).	22
FIGURA 1.7. Relación de Flux-TMP para la microfiltración de un caldo de fermentación de ácido láctico. (Bacchin <i>et al.</i> , 2006)	23
FIGURA 1.8. Representación esquemática de la diafiltración discontinúa (a) y continúa (b). (Cheryan, 1998)	26
FIGURA 1.9. Esquemas de las diferentes configuraciones empleadas por Saidi <i>et al.</i> (2014), durante el fraccionamiento por membranas de hidrolizados de proteína de atún.	27
FIGURA 1.10. Diagrama de optimización, cuando el producto deseado se encuentra en el permeado: el rendimiento como función del factor de purificación para diferentes valores de selectividad (ψ) y $ND\Delta S$ (Van Reis & Saxena, 1997).	29
FIGURA 5.1. Modos de UF y las variables de estudio en cada uno de estos.	34
FIGURA 5.2. Mezclador TURBOLAB equipado con un impulsor helicoidal ($V_T=300$ mL).....	36
FIGURA 5.3. Titulador automático Titroline 7000 empleado para llevar a cabo el estudio de desempeño de la hidrólisis de proteína de yema de huevo	38
FIGURA 5.4. Equipo de filtración Millipore.	39
FIGURA 5.5. a) Reactor de 5 L en acero inoxidable empleado para la hidrólisis enzimática b) Agitador helicoidal a utilizado.....	40
FIGURA 5.6. Equipo de filtración tangencial para membranas cerámicas.....	42
FIGURA 5.7. Equipo de filtración tangencial para membranas planas.	42
FIGURA 5.8. Determinación del flux sostenible mediante el protocolo de incrementos en el TMP	43

FIGURA 5.9. Curva estándar obtenida durante la calibración de la columna con los diferentes estándares de peso molecular conocido.....	49
FIGURA 6.1. Grado de hidrólisis a través del tiempo para una concentración de proteína de 10% y 20% en un reactor de 300 mL.	50
FIGURA 6.2 Imágenes de las muestras tomadas cada hora a lo largo de la hidrólisis enzimática.	51
FIGURA 6.3. Flux de permeado durante la UF de hidrolizados con concentraciones de proteína y grasa del 10 y 0% respectivamente, empleando membranas de RC, PES y TCA de 10 kDa y una presión de 0.5 bar.	53
FIGURA 6.4. Flux durante la UF de hidrolizados empleando membranas de RC y PES de 5 kDa y una presión de 1.5 bar.	55
FIGURA 6.5. Flux durante la UF secuencial de hidrolizados empleando membranas de RC de con diferentes MWCO 10, 5 y 1 kDa.	56
FIGURA 6.6. Hidrolizados obtenidos en suspensiones con diferentes concentraciones de proteína (P) y grasa (G)	57
FIGURA 6.7. Flux de permeado empleando una membrana de 10 kDa, una presión de 0.5 bar a diferentes concentraciones de proteína y grasa.....	57
FIGURA 6.8. Hidrolizados obtenidos en suspensiones con diferentes concentraciones de proteína (P) y grasa (G) antes y después del proceso de centrifugación.....	59
FIGURA 6.9. Efecto del proceso de centrifugación de los hidrolizados en el desempeño de la ultrafiltración. a) P=10% b) P=20%.....	60
FIGURA 6.10. Descripción gráfica del fenómeno de polarización presente durante la UF de los hidrolizados sin centrifugar (a) y centrifugados (b).....	61
FIGURA 6.11. Grado de hidrólisis a través del tiempo para una concentración de proteína de 10% y 20%.	63
FIGURA 6.12. Cromatogramas de los hidrolizados de proteína de yema de huevo con una concentración de proteína de 10 (a) y 20% (b).....	64
FIGURA 6.13. Dependencia del flux con la presión transmembrana para las membranas de celulosa regenerada (a) y cerámicas (b).....	66
FIGURA 6.14. Flux durante la ultrafiltración de hidrolizados con un contenido de proteína del 10 y 20%, usando membranas de celulosa regenerada (a) y cerámicas(b).....	68

FIGURA 6.15. Rendimiento de recuperación de proteína total, proteína soluble y perfiles de flux obtenidos durante el fraccionamiento de los hidrolizados con concentraciones de proteína del 10% (a) y 20%(b) durante el proceso de ultrafiltración/diafiltración.....	71
FIGURA 6.16. Cromatogramas de los retenidos obtenidos a lo largo del proceso de UF/DF de los hidrolizados con un contenido de proteína del 10%.	75
FIGURA 6.17. Cromatogramas de los retenidos obtenidos a lo largo del proceso de UF/DF de los hidrolizados con un contenido de proteína del 20%.	76
FIGURA 6.18 Efecto de la concentración de proteína en la reducción del radical ABTS ⁺ . Hidrolizados obtenidos de una dispersión de proteína de yema de huevo del 10 y 20%.	78
FIGURA 6.19. Diagrama de rendimiento vs factor de purificación para los hidrolizados con contenidos de proteína de un 10 y 20% empleando una membrana de 50 kDa.....	80
FIGURA 6.20. Esquema de producción y fraccionamiento de hidrolizados de proteína de yema de huevo con una concentración de inicial del 10 y 20%.	84

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1 Composición de la materia prima suministrada por Fresenius Kabi: Yema de huevo libre de lecitina.	6
TABLA 1.2. Relaciones geométricas de un impulsor helicoidal.	9
TABLA 6.1. Contenido de proteína soluble antes (%PS) y después del tratamiento térmico (%EPS) para cada uno de los hidrolizados obtenidos.	52
TABLA 6.2. Resistencia intrínseca (R_M) de las diferentes membranas, índice de ensuciamiento después del fraccionamiento (I_{UF}) y del lavado (IF) y propiedades de los permeados obtenidos durante la UF de los hidrolizados	54
TABLA 6.3. Valores de flux, coeficientes de transferencia de masa (k) y porcentaje de proteína obtenidos para los diferentes hidrolizados fraccionados.	58
TABLA 6.4. Porcentaje de proteína en el permeado, coeficientes de transferencia de masa (k) y valores de índice de ensuciamiento (IF) obtenidos para los hidrolizados sin centrifugar (SCF) y centrifugados (CCF).	62
TABLA 6.5. Grados de hidrólisis (%DH), proteína soluble antes (%PS) y después del tratamiento térmico (%EPS) obtenidos en los reactores de 300 mL y 5 L.	63
TABLA 6.6. Índice de ensuciamiento (IF) y coeficiente de separación (S) de las membranas estudiadas durante la ultrafiltración de hidrolizados obtenidos con dispersiones de proteína de 10 y 20%.	66
TABLA 6.7. Contenido de proteína soluble antes (%PS) y después del tratamiento térmico (%EPS), para los hidrolizados y los permeados obtenidos después de la UF con las diferentes membranas estudiadas.	69
TABLA 6.8. Proteína soluble antes (%PS) y después del tratamiento térmico (%EPS) en los hidrolizados y las fracciones obtenidas del proceso UF/DF usando una membrana de 50 kDa.	73
TABLA 6.9 Distribución de tamaño (%) de la alimentación y las fracciones obtenidas después del proceso de UF/DF.	77
TABLA 6.10 Porcentaje de inhibición de los permeados obtenidos durante el proceso de UF/DF con la membrana de 50 kDa.	79

Lista de símbolos

A	Absorbancia
Am	Área de la membrana
B	Volumen de la base añadida (mL)
C	Concentración másica (g g^{-1})
C_b	Concentración en el seno del líquido (%p/p)
C_g	Concentración de saturación (%p/p)
C_E	Costo de enzima (\$MXN)
C_T	Costo de total (\$MXN)
E_C	Costo de consumo de energía (\$MXN)
F	Factor para convertir contenido de nitrógeno a contenido proteíco (6.62)
h	Número de enlaces peptídicos rotos
h_{hot}	Número total de enlaces peptídicos en el sustrato
J	Flux ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
J_s	Flux sostenible ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
J_c	Flux crítico ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
J_{cF}	Flux crítico fuerte ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
J_{cD}	Flux crítico débil ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
k	Coefficiente de transferencia de masa ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
M	Masa (g)
m	Molaridad del HCl
m_p	Cantidad de proteína (g)
N_B	Normalidad de la base
P	Factor de purificación
P_B	Potencia de la bomba (kWh)
P_I	Potencia del intercambiador (kWh)
p_{kW}	Precio del kWh (\$MXN kWh^{-1})
Pm	Peso de la muestra (g)
R	Resistencia (s^{-1})
S	Factor de separación
t	Tiempo

T	Temperatura
V	Volumen (L)
v	Volumen de HCl agregado durante la titulación (mL)
W	Peso recolectado en el permeado (kg)
w_p	Cantidad de proteína soluble (kg)
Y	Rendimiento de recuperación (%)
[P]	Concentración de proteína (g g^{-1})
[G]	Concentración de grasa (g g^{-1})
α	Grado de disociación de los enlaces $\alpha\text{-NH}_2$
ψ	Selectividad

Lista de abreviaciones

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ABTS	2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
DD	Diafiltración discontinúa
DC	Diafiltración continúa
DF	Diafiltración
DH	Grado de hidrólisis
E/S	Relación enzima sustrato
IF	Índice de ensuciamiento después del lavado
IF_{UF}	Índice de ensuciamiento después del experimento
LFEY	Yema de huevo libre de lecitina
m-PES	Polietersulfona modificada
MW	Peso molecular
MWCO	Corte de peso molecular (kDa)
N_D	Número de diavolumenes
NF	Nanofiltración
OPA	orto-ftaldialdehído
PA	Poliamida
PBS	Buffer salino de fosfatos
PES	Polietersulfona
PS	Polisulfona
RC	Celulosa regenerada

Re	Número de Reynolds
RF	Factor de retención
RP-HPLC	Cromatografía en fase reversa
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SNS	Solutos no solubles
TCA	Triacetato de celulosa
TMP	Presión transmembrana (kPa)
TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico
UF	Ultrafiltración
% <i>EPS</i>	Contenido de proteína soluble después del tratamiento térmico
% <i>PS</i>	Contenido de proteína soluble

Subíndices

b	Agua agregada durante la DF
B	Blanco
C	Polarización por concentración
f	Final
F	Interacciones fisicoquímicas
i	Compuesto i
M	Membrana
o	Inicial
p	Permeado
r	Retenido
s	Muestra
w	De agua

INTRODUCCIÓN

El huevo es reconocido como una fuente muy valiosa de proteínas para la nutrición humana. Está reportado que contiene muchas sustancias con una función biológica más allá de la nutrición básica. Entre estas, se encuentra su actividad antimicrobiana, sus características antiadherentes y propiedades antioxidantes. Además de lo anterior, se ha encontrado que los péptidos derivados de la proteína de huevo, poseen actividades como antihipertensivos. La yema de huevo contiene aproximadamente 50% de sólidos, de los cuales, los principales constituyentes son lípidos con 65-70% en base seca, y las proteínas con 30% en base seca (Laca *et al.*, 2010).

Dentro de los lípidos de la yema de huevo, es remarcable el alto valor de los fosfolípidos, de los cuales se destaca la presencia de fosfatidilcolina o lecitina. Esta última, es ampliamente empleada en la industria alimenticia, debido a sus características como emulsificante, sus propiedades humectantes (en productos en polvo como el cacao, para evitar la formación de grumos) así como su capacidad de reducir la viscosidad (elaboración de chocolate). Debido a lo anterior, la yema de huevo es usada como materia prima para la obtención de la lecitina. Sin embargo, la yema de huevo libre de lecitina, sub-producto de dicha extracción, tiene un alto contenido proteico y es normalmente descartado por las plantas procesadoras de lecitina (Park *et al.*, 2001).

En la actualidad, la empresa Fresenius extrae lecitina a partir de la yema de huevo, con el fin de elaborar emulsiones nutricionales. Sin embargo, el subproducto de dicha extracción (yema de huevo libre de lecitina) es vendido a muy bajos costos, desaprovechándose su alto contenido proteico, el cual podría ser empleado en la elaboración de otros productos.

La hidrólisis enzimática es un método utilizado para el aprovechamiento de sub-productos ricos en proteínas, la cual consiste en la ruptura de estas últimas por la acción de enzimas, obteniéndose así, los llamados hidrolizados de proteínas. Estos, son mezclas complejas de aminoácidos y péptidos, que se utilizan como ingredientes importantes para la mejora de las propiedades tecnológicas o nutricionales de los productos alimenticios o como una fuente de péptidos bioactivos. Para aumentar el valor de dichos hidrolizados, se requiere un fraccionamiento y/o purificación de estos (Orue *et al.*, 1998).

Ríos (2016) llevó a cabo un trabajo para optimizar las condiciones de hidrólisis: pH, temperatura (T), relación enzima sustrato (E/S) y concentración inicial de proteína ([P]), sobre el desempeño de la enzima Alcalasa 2.4L en la hidrólisis de proteínas del sub-producto de yema de huevo. En el presente trabajo se establecerán condiciones de proceso para fraccionar los hidrolizados empleando tecnología de membranas (ultrafiltración, UF).

La UF se ha utilizado en el fraccionamiento de hidrolizados de diferentes proteínas (Park *et al.*, 2001; J. Wang *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013; Ranamukhaarachchi *et al.*, 2013; Holder *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Chi *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Wiriyaphan *et al.*, 2015; Farvin *et al.*, 2016; Thamnarathip *et al.*, 2016; Muinde *et al.*, 2017), sin embargo, la mayoría sólo mencionan la membrana usada, sin reportar las condiciones de operación empleadas e incluso los valores de flux obtenidos. Pocos estudios consideran la influencia de los parámetros de operación en el desempeño del proceso (Chabeaud *et al.*, 2009 a; Chabeaud *et al.*, 2009 b; Vandanjon *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2009; Benhabiles *et al.*, 2012; Fernández & Riera, 2013; Saidi *et al.*, 2013; Soufi *et al.*, 2016).

Basado en lo anterior, el objetivo del presente proyecto consistió en la búsqueda de las mejores condiciones de operación, durante el fraccionamiento de los hidrolizados, para la obtención de un permeado rico en péptidos que sean solubles y estables térmicamente. Para esto, se realizó el escalamiento del proceso de hidrólisis y durante la UF de los hidrolizados, se evaluó el desempeño de membranas de diferente naturaleza (poliméricas y cerámicas) con distintos cortes de peso molecular (MWCO). En esta etapa, se estudiaron diferentes condiciones hidrodinámicas para establecer el flux sostenible y se evaluó el proceso de diafiltración para incrementar la recuperación de los péptidos de interés.

1. ANTECEDENTES

1.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Los seres humanos carecen de la capacidad de sintetizar todos los aminoácidos requeridos para una buena salud. Los aminoácidos esenciales, como la leucina, isoleucina, lisina, metionina, entre otros, son sintetizados metabólicamente por la ruptura hidrolítica de proteínas precursoras (Battaner Arias, 2012). Todos los aminoácidos (tantos los esenciales como los no esenciales) se deben suplir durante la alimentación, mediante la ingesta de proteínas que contengan la cantidad adecuada de estos. Pese a lo anterior, la ingesta real de proteínas puede verse afectada por factores como una elevada excreción, el embarazo y la lactancia, lo que puede causar deficiencia de aminoácidos.

Existen varios tipos de productos para el tratamiento de dicha deficiencia, como los llamados concentrados proteicos. Por otro lado, hay personas que son incapaces de digerir las proteínas, debido a una deficiencia enzimática, por lo que no se le pueden suministrar grandes cantidades de alimentos con elevado contenido proteico. A dichos pacientes, se les puede indicar la ingesta de hidrolizados (Gennaro, 2003). El empleo de hidrolizados en la dieta tiene grandes ventajas, entre las que se encuentra la mejor absorción de los péptidos pequeños, su mayor valor nutricional en comparación con las proteínas y tienen el valor potencial de mejorar el sabor por encima de los aminoácidos. Además de lo anterior, los hidrolizados generalmente son menos reactivos que las soluciones de aminoácidos, lo que mejora su funcionalidad y estabilidad. (Mahmoud & Cordle, 2000).

Como se mencionó anteriormente, la hidrólisis enzimática es el proceso mediante el cual se rompen las proteínas por la acción de enzimas, con el fin de obtener una mezcla de aminoácidos y péptidos, los cuales mejoran las propiedades tecnológicas o nutricionales de los productos alimenticios (Orue *et al.*, 1998). Diferentes proteasas se han empleado para la producción de hidrolizados de proteína, sin embargo, las endopeptidasas son las más usadas debido a que por su mecanismo de ruptura, se obtienen péptidos más pequeños. Sin embargo, estas son ocasionalmente combinadas con exopeptidasas para alcanzar una hidrólisis más completa y rápida.

En la literatura, se encuentran reportes en los que se han obtenido hidrolizados a partir de sustratos de diferente origen proteico, como por ejemplo, la proteína de cacahuete

(Quist *et al.*, 2009), de semilla de canola (Chabanon *et al.*, 2007), trigo (Wang *et al.*, 2006) y maíz (Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, destaca la producción de hidrolizados a partir de pescado y otras especies marinas, con propiedades funcionales y biológicas, obtenidos a partir de desechos que usualmente son descartados en la industria, como por ejemplo, desechos de filetes de pescado (Chabeaud *et al.*, 2009 a; Vandanjon *et al.*, 2009), sardina (Benhabiles *et al.*, 2012), atún (Saidi *et al.*, 2014), así como de vísceras y cabezas de moluscos (Soufi *et al.*, 2016).

Cabe resaltar que las propiedades moleculares de la proteína cambian debido a la hidrólisis enzimática, produciéndose una disminución del peso molecular, la liberación de grupos hidrofóbicos, entre otros. Dichos cambios moleculares afectan las propiedades funcionales y biológicas del producto. Dentro de las propiedades funcionales se encuentran la solubilidad, las propiedades espumantes y las emulsificantes. En cuanto a las propiedades biológicas, la liberación de péptidos bioactivos durante la hidrólisis puede conllevar a un producto con actividad antimicrobiana, antioxidante y/o con propiedades inhibitorias a la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Los hidrolizados también poseen un alto valor nutricional, debido al aumento en su digestibilidad y a la disminución en la alergenicidad al compararse con las proteínas de las que se originan (Benítez *et al.*, 2008).

Sin embargo, durante la hidrólisis enzimática, es necesario tener una medida de la degradación hidrolítica y el factor que refleja de manera más precisa la acción catalítica de la proteasa, es el número de enlaces peptídicos escindidos. Por lo tanto, determinaciones empíricas de la degradación hidrolítica durante la reacción, han sido definidas con el fin de calcular el grado de hidrólisis (DH) (Adler-Nissen, 1986). No existe un método estándar para calcular el DH, pero varias técnicas han sido desarrolladas y usadas de manera habitual para su determinación, como por ejemplo, el método del ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), del ortoftaldialdehído (OPA) y el pH-Stat, entre otros (Rutherford, 2010). En la Fig. 1.1 se muestra una curva típica del grado de hidrólisis vs el tiempo de hidrólisis. De aquí se puede observar que, en la etapa inicial, la velocidad de la reacción sigue un comportamiento lineal, pero a medida que avanza el tiempo, dicha velocidad disminuye de manera gradual, lo que conlleva a que la cinética enzimática muestre una tendencia curvilínea.

Para alcanzar el grado de hidrólisis deseado, cuatro parámetros deben ser controlados: la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el pH y la temperatura. Por

ejemplo, una concentración de sustrato adecuada debe ser escogida por razones económicas y tecnológicas. Un sustrato muy diluido conlleva a rendimientos bajos, sin embargo, altas concentraciones de sustrato, usualmente produce una suspensión viscosa, que puede limitar la difusión adecuada de la enzima. Además de lo anterior, durante la dispersión de la proteína cuando se lleva a cabo la hidrólisis a altas concentraciones, se tiende a producir espuma que puede afectar el rendimiento del proceso (Mahmoud & Cordle, 2000).

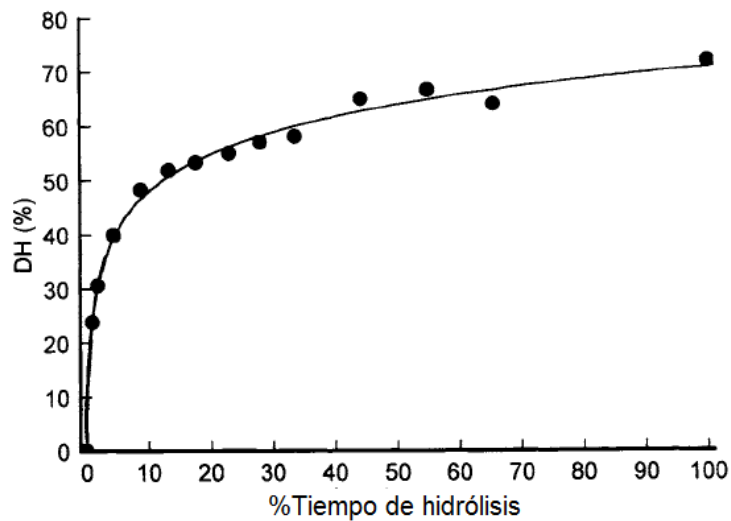


FIGURA 1.1 Hidrólisis pancreática de la caseína (Mahmoud & Cordle, 2000)

De lo anterior, se puede observar que la hidrólisis enzimática es un proceso atractivo para el aprovechamiento de subproductos con un alto contenido proteico. Los hidrolizados de proteína obtenidos, tienen propiedades funcionales y/o biológicas, que incrementan el campo de aplicación del producto final, dándole así, un valor agregado. Sin embargo, diferentes condiciones de operación deben ser controladas para alcanzar el grado de hidrólisis deseado.

1.1.1. Hidrolizados de proteína de yema de huevo.

La empresa Fresenius, obtiene un subproducto de la extracción de lecitina de la yema de huevo, el cual es vendido a muy bajos costos desperdiándose su alto contenido proteico, cerca de un 43% (Tabla 1.1). El subproducto yema de huevo libre de lecitina puede emplearse para la elaboración de otros productos, tales como la fabricación de hidrolizados.

TABLA 1.1 Composición de la materia prima suministrada por Fresenius Kabi: Yema de huevo libre de lecitina.

Componente	Contenido
Lípidos	46.3 ± 0.7 %
Proteína	42.6 ± 1.8 %
Colesterol	270 ± 10 mg /100 g
Cloruro	223 ± 1.5 mg /100 g
Humedad	4- 8 %
pH	5.7 – 6.6
Etanol	1.2 – 3.3 %

En la literatura existen pocos reportes acerca de la producción de hidrolizados de proteína de yema de huevo y están enfocados principalmente a la obtención de péptidos con actividad biológica. Se han encontrado investigaciones en las que se emplean distintas condiciones de operación con diferentes enzimas, como la pepsina (Zambrowicz *et al.*, 2015; Zambrowicz *et al.*, 2012), tripsina, quimiotripsina (Zambrowicz *et al.*, 2012), y la Alcalasa 0.6 (Park *et al.*, 2001). También, se ha encontrado que los péptidos presentes en estos hidrolizados cuentan con actividad antioxidante (Park *et al.*, 2001; Sakanaka *et al.*, 2004; Sakanaka & Tachibana, 2006; Zambrowicz *et al.*, 2012, Zambrowicz *et al.*, 2015), actividad antimicrobiana (Zambrowicz *et al.*, 2012) y actividad inhibitoria al ACE (Eckert *et al.*, 2014). Sin embargo, cabe resaltar que la mayoría de estos emplean concentraciones de proteína bajas ($\leq 1\%$) (Park *et al.*, 2001; Zambrowicz *et al.*, 2012; Eckert *et al.*, 2014).

En la búsqueda bibliográfica realizada, sólo se encontraron dos reportes donde emplearon concentraciones de proteína superiores al 1%, durante la hidrólisis enzimática de la proteína de la yema de huevo libre de lecitina. Zambrowicz *et al.* (2015) usaron una pepsina porcina para llevar a cabo la hidrólisis, en dispersiones de proteína del 10%. La reacción tuvo un tiempo de 2 horas, fue llevada a cabo a pH de 3.5, y 37°C y se alcanzó un grado de hidrólisis del 45.3%. Los péptidos derivados fueron purificados mediante cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) y aquellos que presentaron mayor actividad biológica (4 en total) fueron identificados por espectrometría de masas. Cada uno de los

péptidos demostró tener actividad biológica importante, como actividad antioxidante, actividad antidiabética y una actividad inhibitoria media para la enzima ACE.

Sakanaka *et al.* (2004) emplearon concentraciones de proteína de yema de huevo del 20%. La hidrólisis enzimática fue llevada a cabo empleando una proteasa de *Bacillus* sp a pH 10 y 50°C durante 6 horas y el grado de hidrólisis no fue reportado. Los hidrolizados fueron filtrados y la parte soluble posteriormente fue secada. Empleando cromatografía de filtración en gel, encontraron que la mayoría de los péptidos se encontraban por debajo a 1 kDa y los hidrolizados demostraron tener una actividad antioxidante alta, la cual era dependiente de la concentración.

La enzima Alcalasa 2.4L, también se ha empleado en la hidrólisis de proteínas de distinto origen, por ejemplo, en la proteína de pescado (Klompong *et al.*, 2007; Valencia *et al.*, 2014). Klompong *et al.* (2007) prepararon dispersiones de proteína de pescado variando la [P] entre 0.25 y 10% (w/v). La hidrólisis fue llevada a cabo a 60°C, pH 8.5 y variaron la concentración de enzima entre 0.25 y 10%. Valencia *et al.* (2014) usaron una concentración de proteína de pescado del 5%, y llevaron a cabo la hidrólisis a 60°C, pH 8 durante 120 minutos. Quist *et al.* (2009) hidrolizaron de harina de cacahuate con Alcalasa 2.4 L a una concentración de proteína del 0.25% (w/w), durante 24 horas a 60°C, pH 7.5 y una E/S de 0.3. Con esta misma enzima, Chabanon *et al.* (2007) hidrolizaron proteína de semilla de canola variando la concentración inicial de proteína entre 0.5 y 13% (w/v) y la E/S entre 0.2 y 3. Trabajaron a 50°C y pH 8.

Sin embargo, en todos los reportes mencionados anteriormente, la concentración inicial de proteína ([P]) es baja. La máxima concentración de proteína reportada en la literatura para esta enzima es del 13% y se obtuvo un grado de hidrólisis del 22% (Chabanon *et al.*, 2007). Por otro lado, el valor máximo de DH reportado es de 40% durante la hidrólisis de proteína de pescado (Klompong *et al.*, 2007) con una concentración inicial de proteína del 10%. Ríos (2016), llevó a cabo un estudio para la hidrólisis de proteínas del sub-producto de yema de huevo libre de lecitina usando Alcalasa 2.4L y un reactor de 100 mL con agitación magnética. Estudió el efecto de diferentes parámetros de operación en el desempeño de la reacción. La temperatura se evaluó en el rango de 45 - 65 °C, el pH se varió entre 6 - 9, la relación E/S fue estudiada en el rango de 0.14-0.3y la [P] se varió entre 5 - 20%. Sin embargo, al aumentar la [P] de proteína a un 20%, se tuvo problemas para mantener la homogeneidad de la mezcla durante la hidrólisis (Fig. 1.2).



FIGURA 1.2. Dispersión de proteína con $[P]=20\%$ en el reactor de 100 mL con agitación magnética.

Para la solución de este problema, en este trabajo se propuso el uso de un impulsor helicoidal (Fig. 1.3). Estos impulsores son ampliamente utilizados en la industria (Carreau & Patterson, 1976; Delaplace *et al.*, 2000) y son reconocidos por su eficiencia para mezclar líquidos de alta viscosidad en condiciones de flujo laminar (número de Reynolds (Re) <50) (Robinson & Cleary, 2012). El funcionamiento eficiente de este se atribuye a que mejora el mezclado de abajo hacia arriba (Robinson & Cleary, 2012).

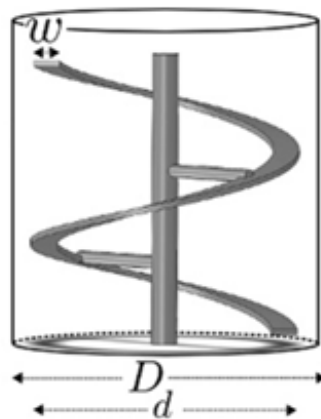


FIGURA 1.3. Impulsor helicoidal. Donde D es el diámetro del tanque, w y d el espesor y diámetro del impulsor respectivamente.

En la Tabla 1.2 se muestran las relaciones geométricas para un impulsor helicoidal convencional (Brito de la fuente *et al.*, 1997).

TABLA 1.2. Relaciones geométricas de un impulsor helicoidal.

Altura del líquido/Diámetro del tanque	1
Diámetro del impulsor/Diámetro del tanque	0.88
Altura del impulsor/Diámetro del impulsor	1
Espesor del impulsor/Diámetro del impulsor	0.162

1.2. SEPARACIÓN POR MEMBRANAS: ULTRAFILTRACIÓN

Una membrana es considerada como una barrera que permite el paso de algunas especies y en todos los procesos de separación por membranas, dos fases son separadas por dicha barrera. La separación de los componentes presentes en la mezcla de la alimentación, ocurre en presencia de una fuerza impulsora que puede ser un diferencial de presión, concentración o potencial eléctrico.

En este proyecto, el proceso de separación por membranas que se empleará en la parte experimental será la ultrafiltración. Este proceso separa de manera selectiva moléculas en solución en base a diferencias de tamaño molecular y la fuerza impulsora es un gradiente de presión transmembrana (TMP).

1.2.1. Modelo de resistencias

Cuando se filtran soluciones en las cuales hay partículas disueltas, el flux de permeado incrementa con el aumento de la presión transmembrana hasta cierto punto. Después de dicho valor, el flux llega a ser menos dependiente de la TMP, hasta alcanzar un valor límite, en el cual la permeabilidad deja de aumentar de manera lineal con la TMP (Fig. 1.4). En los procesos barométricos de separación por membranas, la reducción en el flux puede ser explicado debido a la acumulación de solutos en la superficie de la membrana, fenómeno conocido como concentración por polarización (Chisti, 2007).

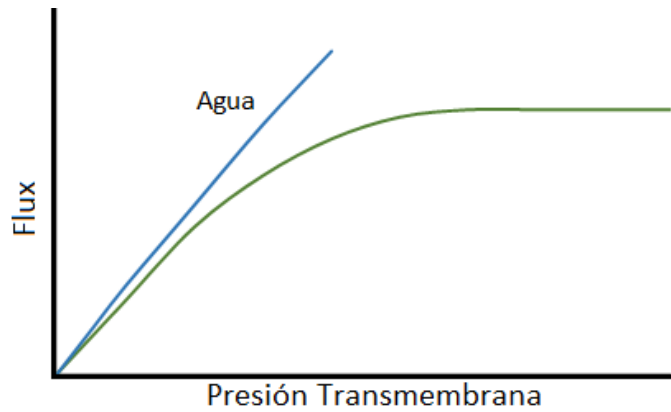


FIGURA 1.4. Correlación entre la presión transmembrana y el flux

El modelo más utilizado para describir el comportamiento del flux vs la TMP durante el proceso de UF, tanto para la región controlada por la presión como para la región independiente de esta, es el modelo de resistencias en serie (Ec. 1):

$$J = \frac{TMP}{R_M} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde R_M es la resistencia intrínseca de la membrana, la cual se puede determinar empleando mediciones de flux con agua pura. Cuando se filtra una solución real, la resistencia intrínseca de la membrana es sólo una parte de la resistencia total. En dicho caso, se incluye una resistencia debida al ensuciamiento ocasionado por las interacciones fisicoquímicas (R_F) y otra resistencia debida a la polarización por concentración (R_C), quedando entonces el modelo de resistencias en serie de la siguiente manera (Ec.2):

$$J = \frac{TMP}{R_M + R_F + R_C} \quad (\text{Ec. 2})$$

El ensuciamiento de las membranas depende de muchos factores, como la distribución de tamaño, la naturaleza y concentración de los solutos, las características de la superficie de la membrana y las interacciones membrana-soluto (Singh & Cheryan, 1997).

1.2.2. Proceso de purificación de péptidos empleando membranas

En la revisión de la literatura, se encontraron distintos estudios donde se ha usado la UF en el fraccionamiento de hidrolizados obtenidos a partir de diferentes proteínas, sin

embargo, en muchos de estos la UF ha sido empleada simplemente como una herramienta para propósitos analíticos.

Park *et al.* (2001) estudiaron la capacidad antioxidante de los hidrolizados de proteína obtenidos de la yema de huevo mediante Alcalasa. Para ello, prepararon hidrolizados al 1%(w/v) en un buffer pH 7 y llevaron la reacción durante 18 horas a 50°C. Separaron los hidrolizados a través de una serie de membranas de UF con MWCO de 10, 5 y 1 kDa, obteniéndose así, tres tipos de permeados. Estos fueron analizados por cromatografía en gel seguido por cromatografía en fase reversa y determinaron que el permeado de la membrana de 10 kDa, estaba conformado por péptidos de peso molecular entre 12 y 6.5 kDa, mientras que el patrón de distribución de peso molecular para el permeado de las membranas de 5 kDa y 1 kDa fue de 5.5 a 1 kDa y de 900 a 350 Da, respectivamente.

Eckert *et al.* (2014) prepararon hidrolizados de proteína de yema de huevo al 1%, en un buffer pH 8 durante 4 horas y a una temperatura de 37°C usando la proteasa *C. ficifolia*. Usaron una membrana de 5 kDa con el fin de separar la fracción peptídica bioactiva. Encontraron que la fracción peptídica menor a 5 kDa exhibió la mayor capacidad inhibitoria de la enzima ACE. Dicha fracción fue purificada por cromatografía de filtración en gel y RP-HPLC para posteriormente identificar los dos péptidos con la mayor capacidad inhibitoria de la enzima ACE.

Wang *et al.* (2014) hidrolizaron harina de gluten de maíz utilizando también una Alcalasa. Dicho hidrolizado fue ultrafiltrado de manera secuencial usando membranas de fibra hueca con MWCO de 20-50 kDa, 6-10 kDa y 6 kDa. Evaluaron la actividad antioxidante de todas las fracciones. Encontraron que la fracción con pesos moleculares mayores a 20 kDa eran las menos activas (10.16% de la actividad total) mientras que las fracciones menores a 20 kDa tenían la mayoría de la actividad (73.16%), sugiriendo así, que la actividad antioxidante de los péptidos está relacionada con su peso molecular. Se secuenció y se determinó el MW del péptido de mayor actividad antioxidante, encontrándose que este tenía un valor de 782 Da.

Zhang *et al.* (2014) prepararon hidrolizados de proteína de camote con Alcalasa y los fraccionaron por UF empleando membranas con un MWCO de 10, 5 y 3 kDa. Las fracciones se denominaron FI, F- II, F-III y F-IV con una distribución de MW >10 kDa, 5-10 kDa, 3-5 de kDa y < 3 kDa, respectivamente. Al igual que los estudios reportados anteriormente, encontraron que la fracción con mayor actividad antioxidante fue la

obtenida con la membrana de menor MWCO (< 3 kDa). Los péptidos de mayor actividad antioxidante en dicha fracción estaban compuestos por 5-8 aminoácidos, con un rango de MW de 640-930 Da.

Chi *et al.* (2015) hidrolizaron con papaína, una proteína obtenida como sub-producto del procesamiento de *Navodon septentrionalis*. Dicho hidrolizado fue ultrafiltrado usando una membrana de MWCO de 1 kDa, obteniéndose así, dos fracciones (BHH-I:MW>1 kDa; BHH-II:MW<1 kDa). Encontraron que de las dos fracciones obtenidas BHH-II mostraba una mayor capacidad antioxidante. Dicha fracción se secuenció y se determinó la masa molecular de los péptidos con mayor actividad antioxidante, encontrando dos péptidos conformados por tres aminoácidos y uno conformado por 5 aminoácidos cuyos MW eran de 269.33, 485.59 y 615.69 Da respectivamente.

En un estudio realizado por Liu *et al.* (2015) se aislaron péptidos antioxidantes de hidrolizados de proteína de clara de huevo, los identificaron y evaluaron su actividad antioxidante, así como su composición de aminoácidos. El hidrolizado fue separado por UF usando membranas con un MWCO de 30 kDa, 10 kDa y 1 kDa, separando así, el hidrolizado en tres fracciones: EWPH-I de 10kDa<MW< 30 kDa, EWPH-II de 1 kDa<MW<10 kDa y EWPH-III de MW<1 kDa. Encontraron que todas las fracciones tuvieron una mayor actividad antioxidante que el hidrolizado. De EWPH-III se identificaron tres nuevos péptidos, con pesos moleculares de 628.64; 630.71 y 684.1 Da.

Como se puede observar, en los estudios reportados anteriormente se ha aplicado la UF para el fraccionamiento de hidrolizados; sin embargo, su objetivo principal ha sido el estudio de las propiedades antioxidantes de las fracciones obtenidas, sin investigar el efecto de las variables de operación en el desempeño del proceso de UF. También cabe resaltar, que aquellos estudios donde fraccionan hidrolizados de proteína de yema de huevo libre de lecitina (Eckert *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2001), han empleado bajas concentraciones de proteína (cerca del 1%) y a escala industrial, el uso de hidrolizados diluidos conllevaría a una baja productividad (Bourseau *et al.*, 2009). Por lo tanto, se necesita un nuevo enfoque para mejorar el rendimiento de las membranas en esta aplicación.

De manera general, durante la UF son tres los factores que determinan el desempeño del proceso: las propiedades de la membrana (material y MWCO), las propiedades de la alimentación (pH, concentración inicial de proteína, grasa y sales) y las condiciones de

operación empleadas (TMP, si se opera en modo DF o bajo el concepto de flux sostenible).

1.2.2.1. Presión Transmembrana (TMP)

La TMP es la fuerza impulsora del proceso de UF, sin embargo, esta no sólo determina el desempeño del proceso en términos de flux, también tiene un efecto significativo en la selectividad, la retención y el ensuciamiento de la membrana.

Chabeaud *et al.* (2009 a) ultrafiltraron hidrolizados de proteína de carbonero empleando 5 membranas de diferentes materiales: polietersulfona (PES), polietersulfona modificada (m-PES) y polisulfona (PS). Se manejó una velocidad tangencial máxima de $2,3 \text{ m s}^{-1}$, una baja concentración de proteína ($[P]= 5 \text{ g L}^{-1}$) y una temperatura de 60°C . La TMP se varió entre 1 y 5 bar. Se encontró la mayor eficiencia a baja presión (1 bar) para todas las membranas. En cuanto al factor de separación (S(AB)), a 1 bar este fue de 12.2 para m-PES de 4 kDa y osciló entre 2.1 a 5.7 para las otras membranas. Empleando una presión transmembrana de 5 bar, se encontró que S(AB) tenía valores menores a 3.5 para m-PES de 4 kDa y oscilaba entre 1.4 y 2 para las otras membranas.

Chabeaud *et al.* (2009 b) estudiaron el comportamiento de una membrana de 4 kDa y 0.029 m^2 de m-PES durante la UF de hidrolizado de proteína de pescado, usaron concentraciones iniciales de 5, 30, 90 y 150 mg mL^{-1} , valores de TMP de 10 y 30 bar y trabajaron en modo recirculación. Para todas las concentraciones trabajadas, el flux fue directamente proporcional a la TMP hasta un valor de 15 bar, mostrando que por debajo de esta no hay polarización por concentración. Entre los 15 y 25 bar ocurre la capa de polarización (fenómeno reversible) y para una presión mayor a 25 bar, el flux fue totalmente independiente de la presión para todas las concentraciones empleadas. Los perfiles cromatográficos de los permeados variaron dependiendo de la TMP aplicada. Sin importar el contenido peptídico, hubo una mayor retención de las moléculas al incrementar la TMP. Observaron que a valores altos de TMP se formó una capa de polarización compacta o una capa altamente viscosa que actuó como una membrana dinámica secundaria con tendencia a modificar la selectividad de la membrana. Este fenómeno predominante puede limitar la transferencia de las moléculas pequeñas y reducir el MWCO aparente de la membrana. Por ejemplo, al fraccionar el hidrolizado a

10 bar y 30 g L^{-1} , se obtuvo un permeado compuesto de péptidos menores a 3 kDa. Sin embargo, el incrementar la presión a 30 bar, el permeado fue rico en péptidos $<1 \text{ kDa}$.

Das *et al.* (2009) variaron la TMP de 1.5 a 2.25 bar en intervalos de 0.25 durante la UF de hidrolizado de proteína de ajonjolí. Emplearon una membrana de PES de 5 kDa, un pH de 7 y una concentración inicial de 103 ppm. Al incrementar la TMP, la concentración en el permeado aumentó, indicando que el rechazo disminuyó. Los resultados mostraron que este último pasó de 67.3 a 55.3% al aumentar la presión de 1.5 a 2.25 bar. Esto fue atribuido a que al aumentar la TMP más moléculas pequeñas pasaron a través de la membrana. Para todos los casos se observó una disminución de la concentración en el permeado a través del tiempo, así como una disminución del flux de manera rápida al principio, seguida de un decremento gradual. Ambos fenómenos fueron atribuidos a la polarización por concentración. El efecto del ensuciamiento fue más pronunciado a una mayor TMP. El flux de agua se redujo de $0.07 \text{ a } 0.02 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ trabajando a 1.5 bar, mientras que al trabajar a 2.25 bar se redujo a $0.012 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$.

Benhabiles *et al.* (2012) emplearon un biorreactor acoplado a una unidad de UF con el fin de concentrar hidrolizado de proteína de pescado. Se empleó una membrana cerámica con una capa ultra-fina de ZrO_2 ($0.05 \mu\text{m}$) y un área de 0.2 m^2 . Primero, el permeado se reinyectó en el reactor hasta que se alcanzó un grado de hidrólisis deseado. Posteriormente se inició el proceso de concentración sin recirculación del permeado. Se varió la TMP de 1 a 4 bar, observando un incremento en el flux con la TMP. El máximo valor de flux encontrado fue de $350 \text{ dm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ a una TMP de 2 bar. El flux fue independiente de la TMP por debajo de este punto. El coeficiente de rechazo depende de manera fuerte de la TMP, observándose un R de 18 y 90% a una TMP de 1 y 4 bar respectivamente.

Saidi *et al.* (2013) llevaron a cabo la UF de una solución de hidrolizados comercial (Prolastin) con una concentración inicial de 10 g L^{-1} , pH 5, empleando una membrana cerámica tubular de tres canales de 8 kg mol^{-1} y diferentes TMP (2, 4 y 6 bar). Encontraron que el flux aumentaba de manera proporcional al incremento de la TMP, teniendo valores de 49 y $124 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ para un valor de TMP de 2 y 6 bar respectivamente. En cuanto a la selectividad, la TMP no tuvo un efecto significativo en la retención de los péptidos de bajo peso molecular (menores a 1 kg mol^{-1}) mientras que las retenciones para los péptidos de 1-4 y 4-7 kg mol^{-1} disminuyeron al aumentar la TMP por encima de 4 y 2 bar respectivamente.

Lo anterior sugiere que operar el proceso de UF usando valores elevados de TMP durante el fraccionamiento de hidrolizados, puede cambiar el MWCO aparente de la membrana. Este fenómeno limita el interés de trabajar a presiones mayores, incluso si el flux de permeado es mayor.

1.2.2.2. Material de la membrana y MWCO

La selección de un MWCO y el material de la membrana adecuado para la UF es un parámetro importante. Se debe buscar una membrana que ofrezca el mayor rechazo al compuesto no deseado y menor rechazo a los compuestos de interés (o viceversa), flux alto y bajo ensuciamiento.

Un ejemplo claro de esto es lo reportado por Qi *et al.* (2012), quienes emplearon 3 membranas de PES con diferentes MWCO (5, 10 y 30 kDa), con el fin de escoger la membrana y las condiciones de operación para la recuperación de celulasa y la obtención de un permeado rico en glucosa. La menor transferencia de la celulasa fue obtenida para la PES-30 kDa (0.084 g L⁻¹ en el permeado), siendo muy parecida su retención a la PES-5 kDa (0.086 g L⁻¹), lo cual se atribuyó a la adsorción de la proteína en las paredes de la membrana, reduciendo el tamaño de poro hasta un valor menor que la membrana de PES-10 kDa. El mayor porcentaje de ensuciamiento irreversible fue obtenido para la PES-30 kDa (66.6%) indicando el ensuciamiento severo ocasionado por el bloqueo de los poros de la membrana debido principalmente a que su MWCO era mayor que el peso molecular de algunos componentes de la solución de alimentación.

Chabeaud *et al.* (2009 a) fraccionaron un hidrolizado de proteína de carbonero, con el fin de obtener péptidos antioxidantes de bajo peso molecular (<2 kDa). Investigaron el efecto del material de la membrana y para ello, probaron 5 membranas de varios materiales y diferentes MWCO: PES (4 y 9 kDa), m-PES (4 y 6kDa) y PS (8 kDa). Se encontró que para un mismo material el factor de retención (RF) aumentó con la disminución del MWCO. Sin embargo, los valores del RF variaron de acuerdo al material de la membrana, bajo el siguiente orden m-PES > PES > PS. En cuanto al flux, este aumentó con el MWCO de la membrana, sin embargo, las PES mostraron ser menos permeables que las m-PES y PS. Se encontró que la separación de las moléculas menores de 2 kDa de las otras era mejor que con la membrana PES de 4 kDa.

Saidi *et al.* (2013) desarrollaron un proceso de separación por membranas de dos etapas (UF+NF) para el fraccionamiento de hidrolizados de proteínas de subproductos de atún. Para escoger la membrana de UF adecuada, realizaron un barrido de estas con una solución modelo de hidrolizado de pescado comercial, con una concentración de 10 g L^{-1} . Seis tipos de membranas planas poliméricas de UF fueron probadas: tres de PES con un MWCO de 10 kg mol^{-1} (membranas A-C), una de RC de 10 kg mol^{-1} (D), una de poliamida (PA) de 8.5 kg mol^{-1} (E) una de PES de 5 kg mol^{-1} (F) y una cerámica tubular de tres canales de 8 kg mol^{-1} (G).

Compararon el rendimiento de las seis membranas planas en filtración flujo pistón bajo las mismas condiciones de velocidad de mezclado y presión. Los resultados se compararon con aquellos obtenidos con la membrana cerámica probada en filtración tangencial. La permeabilidad de agua pura fue muy diferente de una membrana a otra y no pudo ser correlacionada con el MWCO de las membranas o su naturaleza. Se obtuvieron valores de permeabilidad diferentes entre las membranas A, B y C de PES con el mismo MWCO, este efecto se atribuyó a diferencias en su morfología.

Las membranas de PES y PA mostraron un índice de ensuciamiento (*IF*) mayor que la de RC. El flux en todas las membranas disminuyó cuando la reducción del volumen fue mayor a 3. La disminución de la permeabilidad depende de la membrana probada. La mayor pérdida (20%) se observó para la membrana con menor MWCO (F). La menor pérdida de permeabilidad se observó para las membranas hidrofílicas de RC y PA, las cuales también mostraron los valores de *IF* más bajos: 23% y 32% respectivamente. Sin embargo, la membrana de PA (E) presentó un flux bajo. La membrana cerámica (G) presentó un alto flux inicial ($49 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). De todas las membranas probadas, D y G fueron las únicas que pudieron retener más de 80% de los péptidos con un peso molecular mayor a 4 kg mol^{-1} sin presentar una muy alta retención para las fracciones entre $1\text{-}4 \text{ kg mol}^{-1}$.

Soufi *et al.* (2016) estudiaron el potencial de dos membranas de UF para el fraccionamiento de hidrolizados de calamar. Su objetivo era escoger una membrana que permitiese obtener un permeado rico en una fracción peptídica menor a 2 kDa. Emplearon dos membranas de PES denominadas ES 404 y XP 117 con un MWCO de 4 y 5 kDa respectivamente. Para los péptidos mayores de 2.1 kDa la membrana ES 404 fue más eficiente y selectiva. Por ejemplo, para péptidos con $\text{MW} > 7 \text{ kDa}$ la retención fue

del 100% para la ES 404 y de 93.47% para la XP 117. Con los péptidos con un MW por debajo de los 1500 Da, la retención de las membranas se comportaba de manera similar, sin embargo, por encima de este peso molecular (MW), la retención se daba de manera diferente. Al parecer la membrana con el MWCO menor retiene mejor los péptidos con un MW por encima de los 800-1000 Da. La diferencia en la retención disminuye un poco a partir de los 5 kDa, donde se supone que las moléculas por encima de este tamaño son retenidas por ambas membranas.

En los diferentes reportes donde se han empleado membranas poliméricas, se ha demostrado que tienen un índice de ensuciamiento pequeño, así como buenos resultados en términos de rendimiento y flux durante el fraccionamiento de hidrolizados cuando se selecciona el MWCO adecuado. Los trabajos presentados en esta sección, están centrados en la obtención de péptidos entre 1-4 kDa (Saidi *et al.*, 2013) o <2 kDa (Chabeaud *et al.*, 2009a; Soufi *et al.*, 2016). Para la recuperación de péptidos <2kDa, ambos autores concuerdan en que se logra un buen desempeño al emplear un MWCO de 4 kDa.

1.2.2.3. Efecto de la concentración de proteína y composición del hidrolizado en la ultrafiltración

Se ha demostrado que la concentración inicial de proteína empleada durante la UF, juega un papel clave en los fenómenos de ensuciamiento y polarización por concentración, llevando a que este factor incluso controle la resistencia a la transferencia de masa de proceso, afectando no el rendimiento de este en términos de flux.

Varios autores han estudiado el efecto de la concentración inicial de proteína en el desempeño del proceso. Das *et al.* (2009) variaron la concentración inicial de proteína entre 100 y 400 ppm aproximadamente, durante la UF de hidrolizados de proteína de ajonjolí, empleando una membrana de PES de 5 kDa. Chabeaud *et al.* (2009 b) variaron la concentración inicial de proteína (5, 30, 90 y 150 mg mL⁻¹) durante el fraccionamiento de hidrolizados de proteína de pescado, empleando una membrana de m-PES de 4 kDa. Saidi *et al.* (2013) emplearon concentraciones de alimentación de 10 a 120 g L⁻¹ durante la UF de una solución de Prolastina (hidrolizado comercial de proteína de pescado). Todos los autores anteriormente mencionados reportaron una disminución del flux al aumentar la concentración inicial, lo cual fue atribuido a la polarización por concentración.

También, se ha reportado que, al aumentar la concentración inicial, hay un mayor ensuciamiento en la membrana, lo cual es atribuido a una mayor adsorción de los compuestos en la superficie de ésta (Das *et al.*, 2009).

La composición peptídica del hidrolizado inicial, también influye de manera significativa el desempeño del proceso. Saidi *et al.* (2013) compararon el desempeño de una membrana de 8 kDa, durante el fraccionamiento de un hidrolizado comercial y un hidrolizado de proteína de pescado elaborado por ellos. La mayor diferencia entre ambos hidrolizados, era que aquel preparado en el laboratorio, tenía una fracción peptídica mayor a 7 kDa del 11.5%, mientras que en el hidrolizado comercial, dicha fracción sólo correspondía a un 2%. Bourseau *et al.* (2009) fraccionaron dos hidrolizados comerciales de proteína de pescado, a una concentración de 100 g L⁻¹, empleando una membrana de m-PES de 4 kDa. Dichos hidrolizados tenían un rango de peso molecular diferente: el tamaño de los péptidos del hidrolizado FPH1 osciló entre 350 Da y 4 kDa, mientras que en FPH2, el tamaño de los péptidos estaba entre 1.5 y 7 kDa. En ambos trabajos, se observa que aquellos hidrolizados que contienen péptidos más grandes, presentan un menor flux durante la UF. Saidi *et al.* (2013), reporta una disminución del flux de hasta 3 veces, para el hidrolizado que contiene los péptidos de mayor tamaño. Este fenómeno fue atribuido a que los péptidos con mayor peso molecular, los cuales son retenidos durante la UF, causaron un mayor ensuciamiento, conllevando así, a menores valores del flux.

Vandanjon *et al.* (2009) también observó el efecto de la composición inicial de la alimentación durante el fraccionamiento de dos hidrolizados de proteína de pescado: H1-B y H2-B. El hidrolizado H1-B presentaba péptidos más grandes, por ejemplo, la fracción peptídica >3.5 kDa correspondía cerca del 2.5% para H2-B, mientras que en H1-B dicha fracción tenía una composición del 18%. Para el fraccionamiento de H1-B, se usó una secuencia de membranas de 8 y 4 kDa. Para H2-B sólo se empleó una membrana de 4 kDa. Al ultrafiltrar H1-B por la membrana de 8 kDa hasta un VRF de 8.6 se obtuvo un rechazo del 52.4%. Este permeado (H1-P1) se filtró por la membrana de 4 kDa hasta un VRF de 4.6 y se alcanzó un factor de retención del 63.9%. H2-B fue concentrado empleando una membrana de 4 kDa hasta alcanzar un VRF de 6.5 y una retención del 70.2%. El flux final obtenido con este último hidrolizado, fue 10 veces menor que aquel obtenido para la misma membrana con la muestra H1-P1, lo cual se atribuyó a que el hidrolizado H2-B no fue pre-filtrado por la membrana de 8 kDa.

En cuanto a los perfiles de peso molecular, en cada paso de fraccionamiento se obtuvo un permeado y un retenido en los cuales la composición peptídica varió alrededor de un valor (punto pivote) localizado en la intersección de los cromatogramas. Dichos puntos están por debajo del MWCO de las membranas empleadas. Por ejemplo, cuando se ultrafiltró H1-B1 por la membrana de 8 y 4 kDa, el punto pivote observado fue de 3 kDa y 1 kDa respectivamente. Al ultrafiltrar H2-B2 por la membrana de 4 kDa, el punto pivote fue de 1.5 kDa.

Al igual que el trabajo mencionado anteriormente, Bourseau *et al.* (2009) observaron que el efecto del MWCO, y por lo tanto su selección, depende fuertemente de la composición peptídica inicial de la alimentación. Empleando una membrana de 4 kDa, al ultrafiltrar el hidrolizado FPH2 (péptidos entre 7-1.5 kDa) se obtuvo un permeado casi totalmente libre de péptidos mayores a 4 kDa y rico en péptidos menores a 750 Da. Al comparar los cromatogramas de FPH2 antes y después de UF, se observa que hubo un fraccionamiento efectivo. Al comparar el cromatograma del hidrolizado FPH1 (péptidos entre 0.35-4 kDa) y su permeado, se observa que su composición es casi la misma, ya que, la composición peptídica del hidrolizado inicial, estaba por debajo del MWCO de la membrana.

1.2.2.4. Efecto del pH

Cambios en el pH afectan la solubilidad y conformación de las proteínas, lo que puede afectar la interacción entre la membrana y los solutos. Por ejemplo, el ensuciamiento ocasionado por las proteínas y las sales minerales en el suero de queso se puede minimizar ajustando el pH de la solución lejos del punto isoeléctrico de las proteínas (Singh & Cheryan, 1997).

Das *et al.* (2009) ultrafiltraron hidrolizado de semilla de ajonjolí empleando una membrana de PES de 5 kDa. El efecto del pH fue observado en tres diferentes valores: 3, 4.9 y 7, donde 4.9 es el punto isoeléctrico del hidrolizado de proteína. El mayor flux se presentó al trabajar con un pH de 3. Al fraccionar en el PI del hidrolizado, se presentó el menor flux, ya que la repulsión entre los péptidos fue mínima, por lo que su agregación y adsorción en la superficie de la membrana fue mayor, conllevando así, a un menor rendimiento del proceso. Saidi *et al.* (2013) ultrafiltraron una solución de Prolastina (hidrolizado de proteína de pescado comercial) con una membrana cerámica tubular de

8 kg mol⁻¹. Trabajaron a pH de 3, 5 y 8, encontrando que el flux de permeado fue tres veces mayor cuando el valor de pH aumentó de 3 a 8. Esto, debido a un incremento en las cargas negativas de los péptidos presentes, lo que limitó el ensuciamiento debido a la repulsión entre los solutos y la superficie de la membrana.

El pH también tiene influencia en la selectividad del proceso, lo cual se puede ver en el trabajo de Fernández y Riera (2013). Estos autores estudiaron la influencia del pH sobre el fraccionamiento de hidrolizado de β -Lactoglobulina, empleando dos membranas de 5 y 1 kDa y dos valores de pH 8 y 4, siendo este último el punto isoeléctrico de las membranas empleadas. Encontraron que, para ambas membranas, al trabajar a pH 4, las interacciones de atracción y repulsión son minimizadas, por lo que la transferencia de los péptidos estuvo solo gobernada por el mecanismo de exclusión de tamaño. Sin embargo, a pH 8, para la membrana de 5 kDa, el principal mecanismo responsable de la transferencia de péptidos fue la interacción entre la membrana cargada negativamente y los péptidos. En el caso particular del hidrolizado obtenido en dicho trabajo, la mayoría de los péptidos con un MW menor a 950 Da, estaban cargados positivamente a pH 8, mientras que la mayoría de los péptidos más largos, eran especies aniónicas bajo estas condiciones de pH. Debido a lo anterior, la transferencia de los péptidos cargados negativamente (mayores a 950 Da) no fue favorable. Debido al menor MWCO de la membrana de 1 kDa, no se observaron diferencias entre trabajar a pH 4 y 8.

Se pudo observar que durante la UF, el mecanismo de transferencia de los péptidos a través de las membranas, es el resultado de una combinación de efectos de carga y tamaño. Por ello, se puede concluir que la selectividad del proceso, el flux y los fenómenos de ensuciamiento, son factores que son afectados por el pH al que se trabaje.

1.2.3. Flux crítico y flux sostenible

En los procesos de filtración, la variación típica del flux respecto al tiempo presenta un descenso inicial rápido, seguido de una disminución gradual y lenta, causada por la polarización de la concentración o el ensuciamiento de la superficie de la membrana. La polarización por concentración es una consecuencia natural de la selectividad de la membrana. El ensuciamiento de la membrana se puede dar de diferentes formas (Bacchin *et al.*, 2006):

- Adsorción: Se da cuando hay interacciones de atracción entre la membrana y el soluto, formándose una monocapa de las partículas que conduce a una resistencia hidráulica adicional.
- Bloqueo de poro: Cierre (o cierre total) de los poros, lo que lleva a una reducción en el flux.
- Acumulación: Una acumulación de partículas puede crecer capa a capa en la superficie de la membrana. Comúnmente se refiere a este tipo de ensuciamiento como polarización de la concentración o formación de la película o “torta”.
- Gel: Un alto nivel de polarización por concentración, puede llevar a la formación de un gel para ciertas macromoléculas como las proteínas.

En la Fig. 1.5 se muestra una representación esquemática del proceso de ensuciamiento, el cual debe ser controlado para que el proceso de separación sea viable tanto económica como técnicamente. Una fase clave en los procesos de separación por membranas es la transición de la polarización por concentración al ensuciamiento. Esta fase ocurre en el flux crítico (J_c) (Benhabiles *et al.*, 2012).

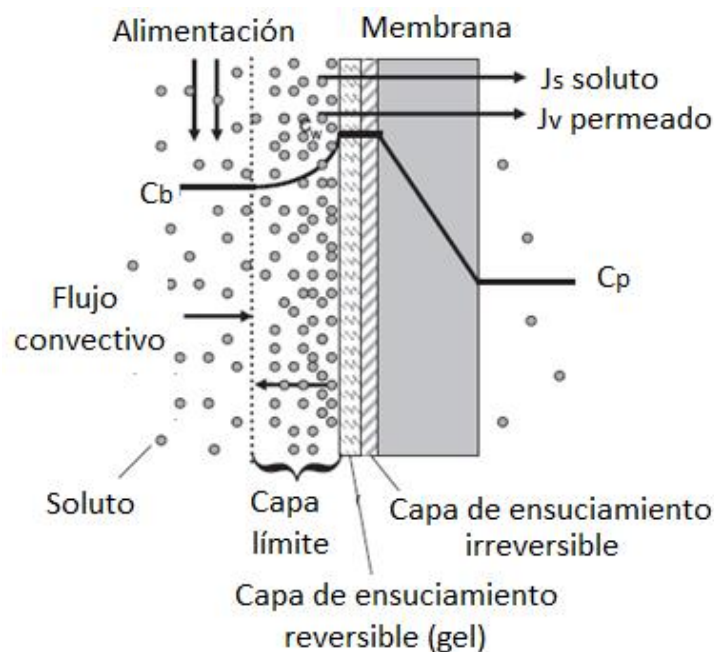


FIGURA 1.5. Representación esquemática de la polarización por concentración y el ensuciamiento en la superficie de la membrana (Benhabiles *et al.*, 2012).

El flux crítico es definido como el flux por debajo del cual no hay un descenso del permeado a través de tiempo, es el punto a partir del cual el ensuciamiento comienza a ser notable o el flux en el que se observa la primera desviación de la dependencia lineal de flux *versus* TMP (Fig. 1.6a).

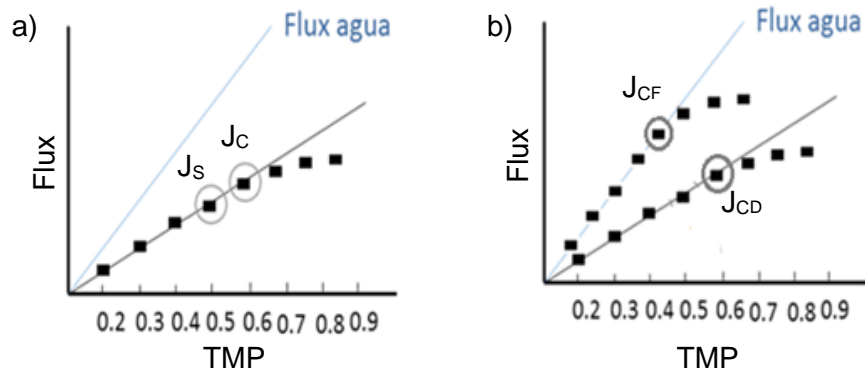


FIGURA 1.6. Descripción gráfica a) del flux crítico (J_c), el flux sostenible (J_s) b) flux crítico fuerte (J_{cF}) y flux crítico débil (J_{cD}).

El flux crítico puede hacerse presente de dos maneras: fuerte o débil. El flux crítico fuerte (J_{cF}) es el valor de flux por debajo del cual, se requiere la misma TMP para filtrar una solución como para filtrar agua limpia. El flux crítico débil (J_{cD}) se da cuando la relación flux-TMP se encuentra por debajo del flux de agua pura, por lo que el J_{cD} es el valor donde dicha relación deja de ser lineal (Fig 1.6b).

El flux que se encuentra inmediatamente por debajo del J_c , en el cual el grado de ensuciamiento de la superficie de la membrana es mínimo, se le denomina flux sostenible (J_s) (Fig. 1.6a). Los conceptos de flux crítico y sostenible se encuentran estrechamente ligados con la sostenibilidad económica y operativa de los procesos de filtración, ya que, los fenómenos de ensuciamiento no influirán de manera drástica en el proceso, lo que implica un menor gasto promedio causado por la disminución en el flux y en los ciclos de limpieza requeridos. Por otro lado, se ha encontrado, que el aumentar la velocidad de alimentación, sólo causa un pequeño incremento en el valor de flux crítico, si la caída de presión a lo largo de la membrana es significativa. Esto se debe a que exista un “flux de permeado local” el cual puede ser superior al valor de flux crítico, lo que conlleva al ensuciamiento local de la membrana. La porosidad y la carga de la membrana, también juegan un rol importante en la determinación de dicho valor. Por ejemplo, una membrana

con mayor porosidad tiene una mejor distribución del flux de permeado en la superficie porosa, lo que conlleva a un aumento en el flux crítico global (Bacchin *et al.*, 2006). Entre los métodos más utilizados para la determinación del flux crítico, se encuentra la observación de la variación del perfil de flux vs presión. En dicho protocolo, se incrementa la TMP durante determinados periodos de tiempo y se mide la permeabilidad. Un indicativo de la presencia de ensuciamiento durante este procedimiento, es el descenso del flux (Fig. 1.7).

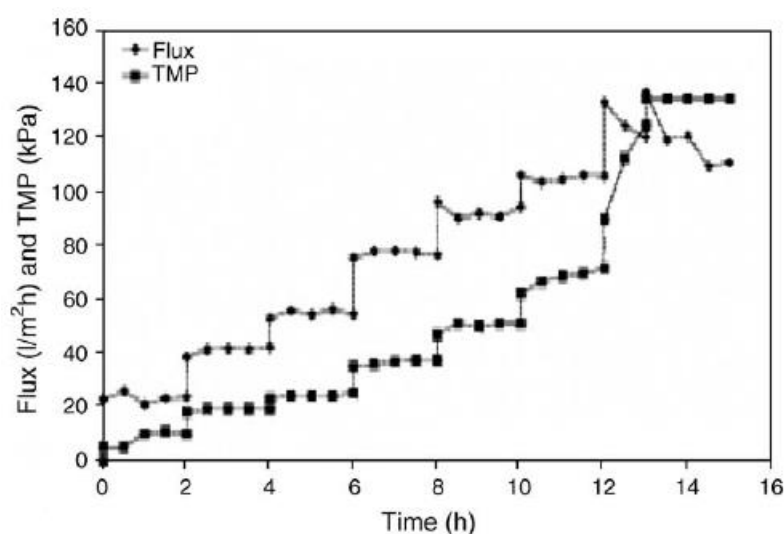


FIGURA 1.7. Relación de Flux-TMP para la microfiltración de un caldo de fermentación de ácido láctico. (Bacchin *et al.*, 2006)

Es importante resaltar que las propiedades de la solución de alimentación, así como la membrana a utilizar tienen un efecto en la determinación del flux crítico. Metsämuuronen *et al.* (2002) encontraron un incremento en el flux crítico de 60 a 105 L h⁻¹ m⁻² al aumentar el pH de 7 a 8 durante la ultrafiltración de soluciones diluidas de mioglobina, cuyo punto isoeléctrico es 7. Además de lo anterior, al trabajar a pH 6 se observó que el flux crítico se hacía presente de la forma débil, mientras que a pH 7 y 8 se hacía presente de manera fuerte. Dichos autores también reportaron que un aumento en la concentración de la solución de alimentación, conllevó a una disminución del flux crítico. Por ejemplo, a pH 7, al variar la concentración de mioglobina de 100 a 400 mg L⁻¹, el valor de flux crítico disminuyó de 60 a 40 L h⁻¹ m⁻².

Manning *et al.* (2016) determinaron el flux crítico aplicando incrementos escalonados del flux durante la filtración de goma arábica al 2%w/v. Para ello emplearon membranas de PES de 0.1, 0.2 y 0.8 µm. Los valores de flux crítico encontrados fueron 27, 10 y 22 L m⁻²

$^2 \text{ h}^{-1}$ respectivamente. El menor flux crítico fue obtenido con la membrana de $0.2 \mu\text{m}$, ya que este MWCO es similar al tamaño de las partículas de goma arábica, lo que ocasionó que dicha membrana fuese más susceptible a bloqueo de poro. La membrana de $0.1 \mu\text{m}$ tuvo un flux crítico superior al esperado. Esto es debido a que los poros de dicha membrana fueron muy pequeños para permitir la intrusión de partículas en la estructura interna. Para la membrana de $0.1 \mu\text{m}$, cuando se operó por debajo del flux crítico (20 LMH), no se observó aumento alguno de la TMP después de 4 h de filtración. Sin embargo, al operar por encima de este (40 LMH) se observó un rápido incremento de la TMP los primeros 30 min. Para las otras dos membranas se observó la misma tendencia: no hubo un aumento de la TMP al operar por debajo del flux crítico; sin embargo, al operar por encima de este, se observó un rápido aumento en la TMP, debido a la polarización por concentración y a la adsorción de especies en la superficie de la membrana, seguido de un aumento lento de esta, causado por la formación de la torta.

En la literatura se encuentran reportes de fraccionamiento de hidrolizados de proteína en donde el flux crítico es determinado. Benhabiles *et al.* (2012) fraccionaron hidrolizados de proteína de pescado usando un bioreactor acoplado a una unidad de UF, la cual tenía una membrana de $0.05 \mu\text{m}$. La concentración inicial de proteína fue de aproximadamente 13.5% y el bioreactor fue operado en modo recirculación del permeado durante 4 horas, hasta que un DH deseado fue alcanzado. Posteriormente, la recirculación fue detenida y procedieron a la determinación del flux crítico variando la TMP entre 1 y 5 bar, encontrando que J_c se encontraba cuando se aplicaba una TMP de 2 bar. Chabeaud *et al.* (2009 b) fraccionaron hidrolizados de proteína de pescado empleando una membrana de 4 kDa. Usaron concentraciones iniciales de proteína de 5 a 150 g L^{-1} y variaron la TMP de 10 a 30 bar, reportando que para todas las concentraciones iniciales de proteína estudiadas, el J_c se presentó cuando una TMP de 15 bar fue aplicada. En ambos trabajos, se observó que el factor de retención aumentó con la TMP, lo cual fue atribuido a una mayor polarización por concentración en la superficie de la membrana. Esta nueva capa dinámica, fue la que limitó la transferencia de las moléculas pequeñas y redujo el MWCO aparente de la membrana.

Cabe resaltar que, en los dos trabajos anteriormente señalados, el RF reportado se midió durante la etapa de determinación de flux crítico. Posteriormente, llevaron a cabo una etapa de concentración (con el fin de observar la variación del flux y el factor de retención a través del tiempo). Sin embargo, en el trabajo de Benhabiles *et al.* (2012), dicha etapa

de concentración fue llevada a cabo con un gradiente de presión, que se encontraba por encima del valor de TMP donde se presentaba J_c . Al final de dicho trabajo, fue señalado que el proceso de concentración debería ser operado por debajo del flux crítico, con el fin de reducir el ensuciamiento irreversible. Por otro lado, Chabeaud *et al.* (2009 b), empleó una concentración inicial baja (42 g L^{-1}) durante la concentración de los hidrolizados, llegando hasta un factor de reducción de 4.5 y 5 para una TMP de 10 y 30 bar respectivamente; se había reportado que el J_c se presentaba a una TMP de 15 bar. La membrana se recuperó en 90% después de haber trabajado a la menor TMP; sin embargo, a 30 bar sólo se recuperó en 76%. En cuanto a la selectividad, ésta también fue modificada por la TMP. Al trabajar a 10 bar, el retenido se enriqueció en péptidos cuyo peso molecular fue mayor a 0.7 kDa. A 30 bar, los péptidos retenidos tuvieron un peso molecular $> 0.4 \text{ kDa}$.

En otro trabajo de Chabeaud *et al.* (2009 a), estudiaron el efecto del MWCO y el material de la membrana durante el fraccionamiento de hidrolizados de proteína de pescado. Para esto, emplearon membranas de PES, m-PES y PS con MWCO que oscilaron entre 4 y 9 kDa y una concentración inicial de proteína baja (5 g L^{-1}), para evitar el ensuciamiento. En dicho trabajo determinaron el J_c para cada uno de los casos estudiados y los datos de RF reportados, fueron obtenidos durante la medición del flux en estado estacionario. Para todas las membranas, los perfiles de J vs TMP se dieron en la región controlada por la presión, encontrando que el flux estuvo principalmente influenciado por el MWCO y se vio afectado en menor proporción por el material de la membrana.

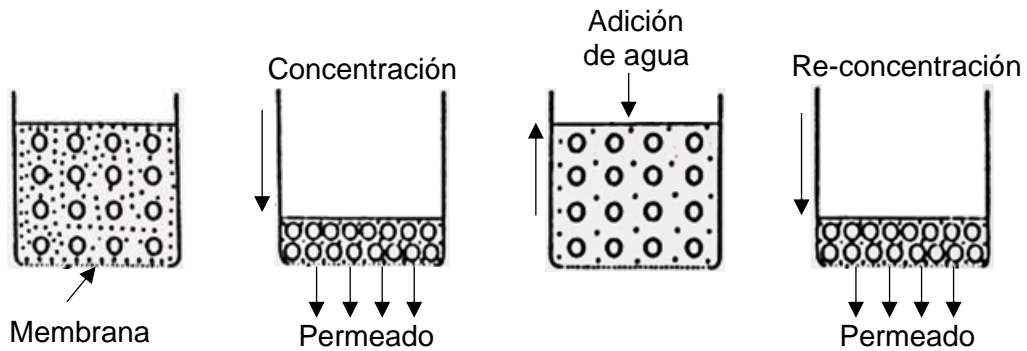
Estos trabajos sugieren que operar los procesos de UF por debajo de J_c , permite maximizar el rendimiento del proceso, mientras se minimiza el ensuciamiento de la membrana. Aunque existen reportes en donde se ha determinado el flux crítico durante el fraccionamiento de hidrolizados de proteína, el proceso de concentración se ha realizado con hidrolizados con un contenido de proteína inicial bajo o en condiciones de TMP, que conllevan al ensuciamiento irreversible.

1.2.4. Diafiltración

En los procesos de UF, el principal objetivo es la obtención de altos rendimientos empleando el menor tiempo de procesamiento. La diafiltración incrementa los rendimientos de recuperación de los compuestos de interés. Esta operación consiste en

la adición de buffer o agua pura para recuperar los solutos de interés que fueron retenidos durante la filtración y como se muestra en la Fig. 1.8, existen dos modos de operación: diafiltración discontinúa (DD) y diafiltración continua (DC).

a) Diafiltración discontinúa (DD):



b) Diafiltración continua (DC):

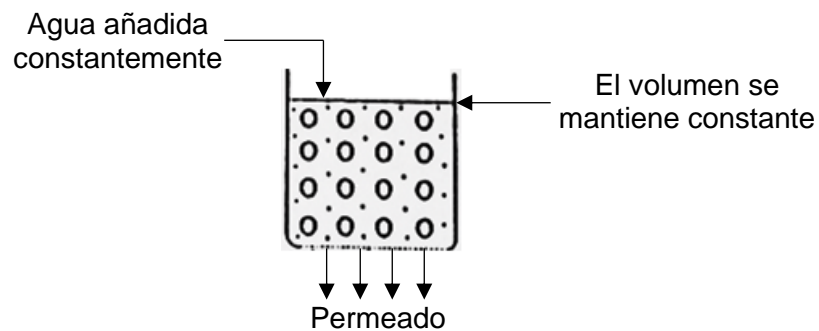


FIGURA 1.8. Representación esquemática de la diafiltración discontinúa (a) y continua (b). (Cheryan, 1998)

En la diafiltración discontinúa (Fig. 1.8a), el permeado es recolectado hasta completar cierta reducción en el volumen del tanque de alimentación. Posteriormente, hay una re-dilución del retenido con agua, hasta completar el volumen inicial, continuando así, con un proceso de re-ultrafiltración. Este proceso se repite hasta obtener el rendimiento deseado. En la diafiltración continua (Fig. 1.8b), el agua se añade al tanque a la misma velocidad que el flux de permeado, manteniendo el volumen de alimentación constante durante el proceso. Este modo de DF es particularmente útil cuando la concentración de solutos en el retenido es muy alta como para permitir una UF o una DD efectiva (Cheryan 1998). El efecto de la diafiltración se analiza determinando el número de diavolumen (N_D) necesarios, para alcanzar el mejor compromiso entre la selectividad del proceso y el rendimiento de dichos compuestos. El diavolumen es definido como (Ec. 3):

$$N_D = \frac{V_b}{V_0} \quad (\text{Ec. 3})$$

En donde V_b es el volumen de agua agregado durante la diafiltración y V_0 es el volumen inicial de la alimentación.

Saidi *et al.* (2013) fraccionaron hidrolizados de proteínas obtenidos de subproductos de atún mediante un proceso de dos etapas. La primera etapa consistió en la ultrafiltración del hidrolizado con una membrana cerámica de 8 kg mol^{-1} y posteriormente el permeado recogido fue nanofiltrado con una membrana de PES de 1 kg mol^{-1} . Se ensayaron tres modos de funcionamiento diferentes (Fig. 1.9) con el fin de estudiar el efecto de la diafiltración durante el desempeño del proceso. En el primer modo (configuración A) se llevó a cabo un proceso de concentración por UF. En el segundo modo de funcionamiento (configuración B), la etapa de UF se llevó a cabo en modo de diafiltración continua. En el último arreglo (configuración C), se llevó a cabo la concentración y posteriormente se hizo una diafiltración discontinúa. Cabe resaltar que, en todas las configuraciones mencionadas, el permeado obtenido después del fraccionamiento fue sometido a un proceso de nanofiltración (NF).

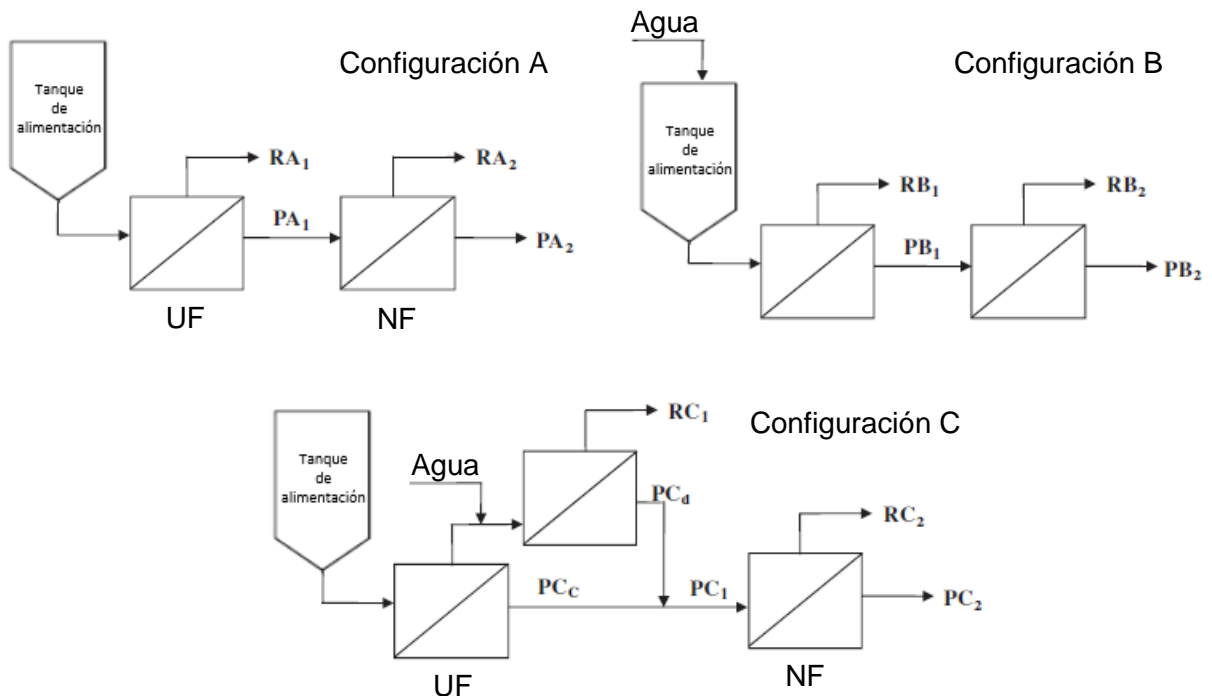


FIGURA 1.9. Esquemas de las diferentes configuraciones empleadas por Saidi *et al.* (2014), durante el fraccionamiento por membranas de hidrolizados de proteína de atún.

Encontraron que durante la etapa de UF, tanto para la configuración A como para la C, el flux disminuyó lentamente hasta alcanzar un valor estable, cerca de los $10 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$, en contraste con la configuración B, donde el flux alcanzó un valor de $22 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$, confirmando que al trabajar en modo DF continúa, los fenómenos de ensuciamiento son minimizados debido a la continua adición de agua. Cuando se llevó a cabo la DF discontinúa (configuración C), el valor de flux medido durante esta etapa fue de $9 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Este valor de flux indica que el ensuciamiento presentado durante la etapa de UF fue irreversible, ya que la adición de agua no conllevó a un aumento del flux causado por la disminución en la polarización por concentración.

En cuanto al fraccionamiento peptídico, este fue dependiente de la configuración usada. Las configuraciones B y C (modo diafiltración) fueron más eficientes en comparación con la configuración A ya que, en esta última, el 80% de la proteína total permaneció en el retenido (RA_1), mientras que en las configuraciones B y C, la proteína total en el retenido de la UF fue menos del 60%. Estos resultados demuestran que el operar en modo DF permite elevar los rendimientos de recuperación en el producto final. También es importante señalar la importancia de llevar a cabo el fraccionamiento, en condiciones que permitan el menor ensuciamiento, ya que, como se mostró en el trabajo citado anteriormente, la formación de un depósito irreversible durante la UF, también afecta de manera negativa, la productividad de la DF discontinúa.

En diferentes investigaciones se han encontrado altos porcentajes de pureza y rendimiento para sistemas de diafiltración continua empleando diagramas de optimización. Estos diagramas utilizan una familia de curvas, representadas por dos números adimensionales los cuales son graficados en coordenadas de rendimiento vs factor de purificación (diagramas P-Y), como se muestra en la Fig. 1.10. Estos diagramas son elaborados mediante la inclusión de parámetros experimentales como el flux de permeado, el número de diavómenes y los coeficientes de separación observados (Van Reis & Saksena, 1997).

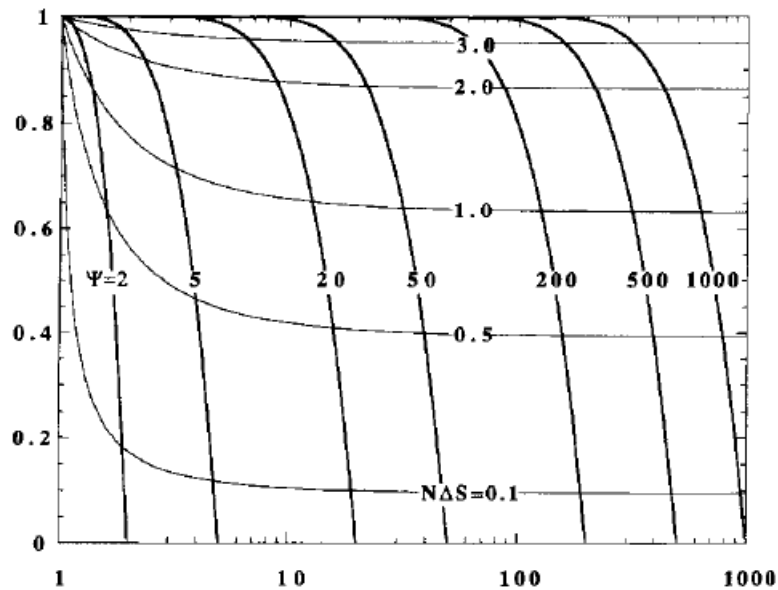


FIGURA 1.10. Diagrama de optimización, cuando el producto deseado se encuentra en el permeado: el rendimiento como función del factor de purificación para diferentes valores de selectividad (ψ) y $N_D\Delta S$ (Van Reis & Saxena, 1997).

Van Reis *et al.* (1999) dieron el nombre de filtración tangencial de alto rendimiento (HPTFF) a aquellos procesos por membranas que alcanzan una selectividad alta. La HPTFF explora diferentes estrategias para operar en el régimen dependiente de la presión y el uso de la diafiltración, con el fin de mejorar el rendimiento del proceso. Dicho concepto se ha utilizado para la purificación de proteínas y se deben explorar diferentes efectos como la carga de la membrana, el pH y la fuerza iónica.

Van Reis *et al.* (1999) estudiaron el efecto de la carga de la membrana, así como el pH del buffer durante la separación de dos proteínas (BSA y Fab) usando HPTFF. Para ello emplearon dos membranas de PES, una cargada positivamente y otra cargada de manera negativa, ambas con un MWCO de 100 kDa. Con la membrana cargada negativamente, la mayor selectividad alcanzada para el BSA fue obtenida a pH 8.4 (cerca al punto isoeléctrico de Fab el cual es de 8.5). El BSA fue casi completamente rechazado, obteniéndose un coeficiente de separación (S) de 0.004 mientras que el Fab pasó a través de la membrana ($S=0.8$).

Bajo estas mismas condiciones de pH, pero empleando la membrana que estaba cargada positivamente, la selectividad estuvo más de un orden de magnitud por debajo, lo cual se debió principalmente a un incremento en la transferencia del BSA ($S=0.15$) mientras que el coeficiente de separación del Fab no cambió. Con esta misma

membrana, la mayor selectividad obtenida para el Fab fue a pH 5, cercano al pI del BSA el cual es 4.8, dando un $S=0.006$ para Fab y $S=0.7$ para BSA. Dicho comportamiento es casi completamente inverso al visto empleando la membrana cargada negativamente a pH 8.4. De la misma manera, al trabajar con esta última membrana a pH 5, se observó una reducción en un orden de magnitud de la selectividad.

Estos datos indican claramente que el coeficiente de separación de las proteínas se reduce drásticamente cuando la proteína está altamente cargada (es decir, a un pH lejos del pI) y tiene el mismo signo de la carga que la membrana, condiciones que maximizan el volumen efectivo de la proteína, mientras se mejora la exclusión electrostática asociada con las interacciones directas carga-carga. La separación se mejora cuando el pH está próximo al punto isoeléctrico de la proteína, es decir, cuando el volumen hidrodinámico efectivo es mínimo.

El operar en el régimen dependiente de la presión, puede conllevar a una UF efectiva, sin fenómenos de ensuciamiento que resulten en una disminución del rendimiento en términos de flux o a un cambio en el diámetro de poro aparente de la membrana que pueda afectar la selectividad del proceso. Esta técnica, combinada con el proceso de DF, puede resultar en un mejoramiento del rendimiento de recuperación de los péptidos de interés, así como en el flux.

2. SINTESIS DE ANTECEDENTES

- Ríos (2016) llevó a cabo un estudio para estudiar el efecto de las diferentes condiciones de hidrólisis (T, pH, E/S y [P]) de la proteína de yema de huevo libre de lecitina con Alcalasa 2.4L a nivel laboratorio (V=100 mL). Sin embargo, a altas concentraciones de proteínas existen problemas serios de mezclado que limitan el desarrollo de la hidrólisis.
- Existen diversos reportes donde la UF se emplea como una herramienta útil para el fraccionamiento de diferentes hidrolizados, sin embargo, la mayoría de estos están enfocados principalmente al aislamiento de fracciones con actividades biológicas.
- Los estudios encontrados acerca del efecto de las variables de operación, se centran en el efecto del pH, la TMP y la [P] durante la UF. En ninguno de estos reportes se fraccionan hidrolizados de proteína de yema de huevo.
- No se ha estudiado el efecto de la presencia de grasa sobre la selectividad de las membranas de UF durante el fraccionamiento, ni sobre las propiedades de las fracciones obtenidas.
- Los estudios donde se aplica el concepto de flux sostenible y la DF en el fraccionamiento de hidrolizados son limitados.

3. HIPÓTESIS

Si se usan membranas cerámicas para el fraccionamiento de hidrolizados de proteínas de yema de huevo y se opera el proceso en condiciones de flux sostenible, se obtendrán valores de flux y rendimientos de recuperación elevados, así como fracciones ricas en péptidos con mejores propiedades funcionales que el hidrolizado inicial

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Establecer condiciones de proceso para el fraccionamiento de hidrolizados obtenidos de mezclas concentradas de proteína de yema de huevo empleando membranas de ultrafiltración.
- Objetivos específicos:
 - Estudiar el efecto de la concentración de grasa sobre el flux y la selectividad de membranas poliméricas de UF (celulosa regenerada, polietersulfona, triacetato de celulosa) de diferentes cortes de peso molecular, durante el fraccionamiento de los hidrolizados de proteína de yema de huevo en un sistema de flujo pistón.
 - Proponer un esquema de separación basado en membranas que asegure la máxima separación y recuperación de péptidos solubles de la mezcla de hidrólisis.
 - Establecer las condiciones para operar en el flux sostenible y comparar el desempeño de membranas poliméricas y cerámicas durante el fraccionamiento del hidrolizado por ultrafiltración tangencial.
 - Evaluar el desempeño del proceso de diafiltración (DF) durante el fraccionamiento del hidrolizado en términos de flux y eficiencia de separación de los péptidos de interés.
 - Caracterizar los permeados y retenidos obtenidos durante el proceso de UF, en función de peso molecular, proteína soluble y estabilidad térmica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para llevar a cabo los objetivos planteados anteriormente se trabajó en los dos modos de UF: flujo pistón y tangencial. El primero nos permitió obtener un panorama de la eficacia de la UF como método de fraccionamiento de los hidrolizados de proteína de yema de huevo. El segundo fue evaluado con el fin de emplearlo a escala industrial.

Por lo anterior, la estrategia experimental constó de dos etapas (Fig. 5.1). En la primera se realizó el estudio con membranas poliméricas planas de diferente naturaleza y corte de peso molecular, usando un sistema que opera en flujo pistón. Se prepararon 200 mL de hidrolizado y las variables de respuesta durante el fraccionamiento fueron el flux, el porcentaje de proteína en el permeado, el contenido de proteína soluble en dicha fracción y el índice de ensuciamiento (*IF*). La definición del *IF* se hace en la descripción de la primera etapa.

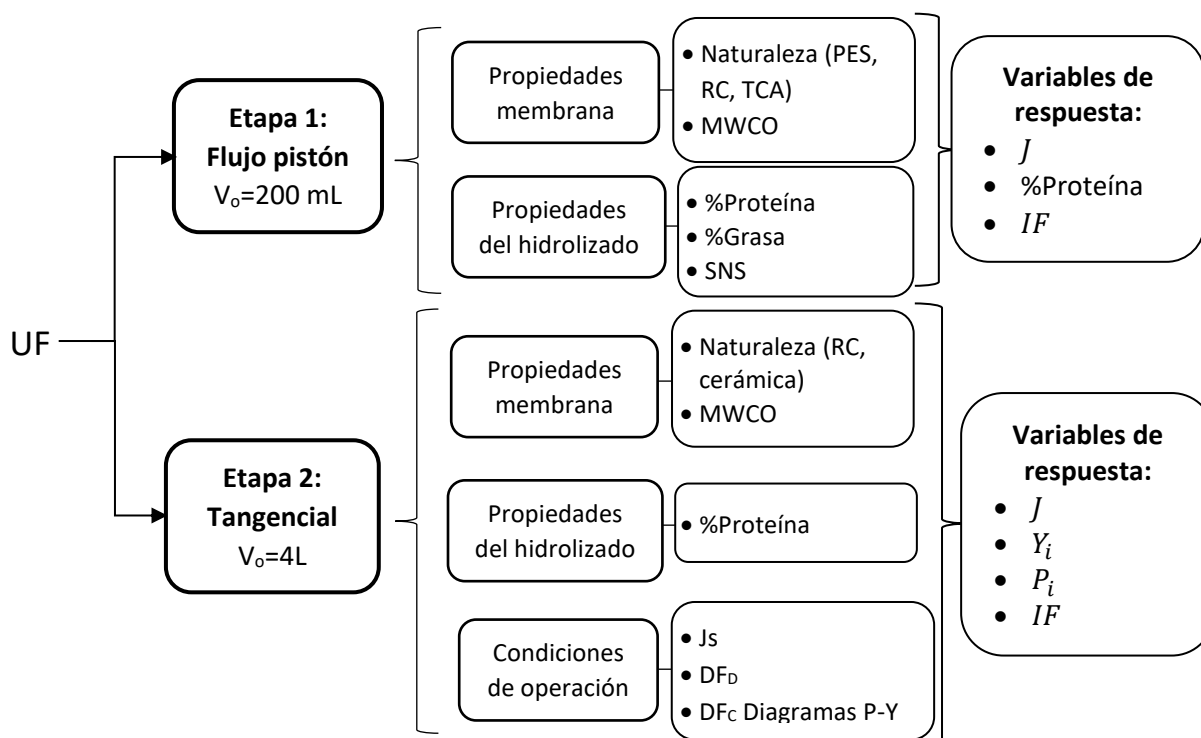


FIGURA 11. Modos de UF y las variables de estudio en cada uno de estos.

En la segunda etapa se llevó a cabo el proceso de hidrólisis usando un volumen de 4 L y el fraccionamiento de los hidrolizados empleando filtración tangencial. Las variables de respuesta en dicha etapa fueron el flux, el *IF* y el rendimiento (Y_i). Con la membrana que

presentó el mejor desempeño, se llevó a cabo una etapa de diafiltración discontinua (DD) para obtener la mayor recuperación de los péptidos de interés en el lado del permeado. Posteriormente, se compararon los resultados experimentales obtenidos durante la diafiltración discontinua, con datos teóricos obtenidos para la diafiltración continua (DC) empleando los diagramas de purificación (P_i) y rendimiento (Y_i). Estos parámetros serán definidos en la descripción de la segunda etapa.

5.1. ETAPA 1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GRASA Y PROTEÍNA DURANTE LA UF EMPLEANDO MEMBRANAS DE DISCO.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo empleando un reactor de 300mL acoplado a un agitador helicoidal (Fig. 5.2). Antes de agregar la enzima, la materia prima se dispersó en una solución amortiguadora de fosfatos (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4) pH 8, usando el mezclador TURBOLAB. La hidrólisis se llevó a cabo empleando las condiciones de pH, T y E/S establecidas por Ríos (2016).

En esta etapa se estudió el efecto de la concentración de grasa y proteína durante la UF, así como el efecto de la naturaleza del material de la membrana sobre el flux, el contenido de proteína en el permeado, el contenido de proteína soluble en dicha fracción y el índice de ensuciamiento. Para ello se llevaron a cabo diferentes hidrólisis con una concentración inicial de proteína de 10 y 20% con un contenido de grasa de 0, 10 y 46%, empleando un volumen de operación de 200 mL.

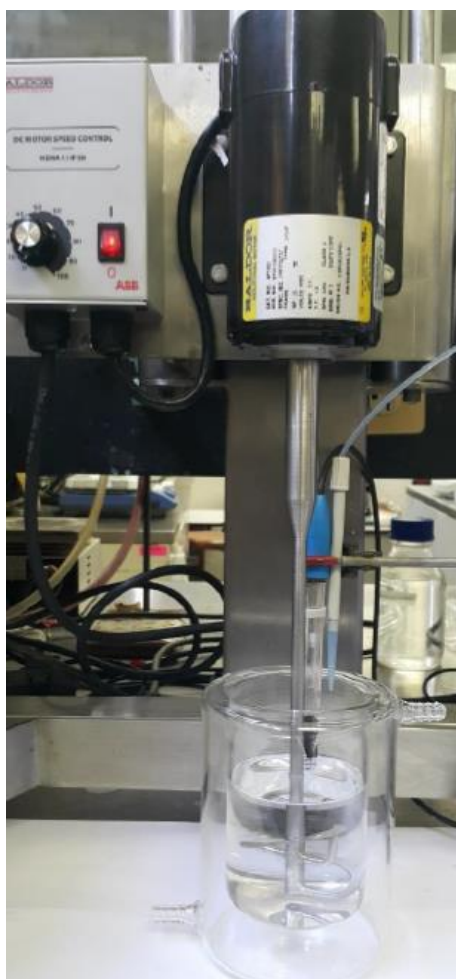


FIGURA 12. Mezclador TURBOLAB equipado con un impulsor helicoidal ($V_T=300$ mL)

5.1.1. Extracción de grasa en la yema de huevo libre de lecitina.

Se llevó a cabo el protocolo de extracción reportado por Ríos (2016) para alcanzar un contenido de grasa en la materia prima del 10%. En este, se empleó una relación materia prima:hexano 1:4, una temperatura de proceso de 30°C y un tiempo total de extracción de 30 minutos dividido en 3 etapas. En la primera etapa se adicionó el 50% del solvente y después de 10 minutos de extracción se dejó reposar dos minutos. En la segunda y tercera etapa se agregó el 25% del volumen de solvente con intervalos de 10 minutos. El desgrasado total de la materia prima (0% grasa) se realizó por el método de extracción Soxhlet con un tiempo de 12 horas (Ríos, 2016).

Para alcanzar una concentración de grasa del 2%, la materia prima se sometió a un proceso de extracción con hexano de dos etapas, usando una relación 1:4 de FLEY:n-

hexano, temperatura de 45°C y un tiempo de contacto de 10 minutos, según lo reportado por Prada (2018).

5.1.2. Estimación del grado de hidrólisis (DH)

El DH se define como la relación porcentual del número de enlaces peptídicos rotos (h) y el número total de enlaces en el sustrato por unidad de masa (h_{hot}). Se reporta que h_{hot} tiene un valor aproximado de 8 eq/kg proteína para la mayoría de las proteínas, considerando que el MW de los aminoácidos es aproximadamente de 125 g mol⁻¹ (Adler-Nissen, 1986). Uno de los métodos utilizados para estimar el grado de hidrólisis es el método pH-Stat. En este, el DH se calcula a partir de la normalidad (N_B) y el volumen de base añadida (B) para mantener constante el pH, de acuerdo a la siguiente relación dada por Adler-Nissen (1986) (Ec. 4):

$$DH (\%) = \frac{B N_B}{\alpha m_p h_{hot}} 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde M_p es la masa de la proteína y α el grado de disociación de los enlaces α -NH₂. Este último viene dado por la relación (Ec. 5):

$$\alpha = \frac{10^{(\text{pH}-\text{pK})}}{1+10^{(\text{pH}-\text{pK})}} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde (Ec. 6):

$$\text{pK} = 7.8 + \frac{298-T}{298 T} 240 \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde T es la temperatura a la cual se lleva a cabo la hidrólisis.

La hidrólisis se llevó a cabo empleando el equipo Titroline 7000 (Fig. 5.3). Este consta de un sensor de pH que va sumergido en el reactor, un recipiente en donde se almacena la base y una unidad de recolección de datos en donde se registra la cantidad de base utilizada a lo largo de la hidrólisis.

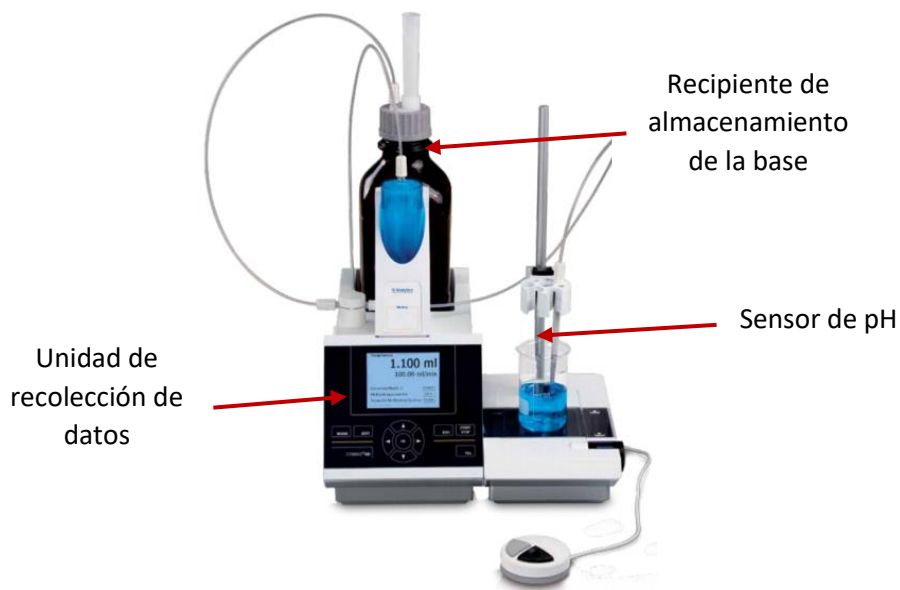


FIGURA 13. Titulador automático Titroline 7000 empleado para llevar a cabo el estudio de desempeño de la hidrólisis de proteína de yema de huevo

5.1.3. Ultrafiltración en flujo pistón

El hidrolizado obtenido se ultrafiltró usando membranas de 10, 5 y 1 kDa de manera sucesiva. Durante la ultrafiltración se emplearon membranas de celulosa regenerada (RC), polietersulfona (PES) y triacetato de celulosa (TCA).

El fraccionamiento se llevó a cabo mediante un equipo de filtración Millipore (Fig. 5.4). La celda cuenta con un volumen máximo de operación de 80 mL, un puerto de entrada de la alimentación, una salida de permeado y una entrada para presurizar empleando nitrógeno. Con el fin de calcular el flux a lo largo del proceso de fraccionamiento, el permeado obtenido se recolectó en un vaso precipitado y se registró el cambio de peso a través del tiempo usando una computadora conectada a la balanza.



FIGURA 14. Equipo de filtración Millipore.

También se llevaron a cabo mediciones de flux de agua antes y después del fraccionamiento, con el fin de estimar el índice de ensuciamiento (IF). Este índice es una medida del grado de ensuciamiento que puede ocurrir en la membrana después del proceso y se define como (Ec. 7):

$$IF = \frac{J_{wo} - J_{wf}}{J_{wo}} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde J_{wo} es el flux de agua antes del experimento y J_{wf} es el flux de agua después del experimento. Si $IF=0$, la membrana se recuperó completamente. Pero si el $IF>0$, el ensuciamiento irreversible se ha hecho presente.

5.1.4. Modelo de polarización por concentración

El modelo de polarización por concentración fue ajustado a los datos experimentales obtenidos, con el fin de observar el efecto de las propiedades de la alimentación, concentración de proteína, grasa y presencia de los solutos no solubles, en el coeficiente de transferencia de masa (Ec. 8) (Sablani. *et al.*, 2001):

$$J = k \ln \left(\frac{c_g}{c_b} \right) \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde J es el flux de permeado, (k) el coeficiente de transferencia de masa, C_g la concentración de saturación y C_b la concentración en el seno del líquido del lado de la alimentación, la cual es conocida. Para el ajuste de los datos experimentales, la Ec. 8 se linealizó obteniendo la Ec. 9:

$$J = k \ln C_g - k \ln C_b \quad (\text{Ec. 9})$$

Al graficar J vs $\ln C_b$, se obtiene una línea recta con pendiente negativa, de donde se obtiene k .

5.2. ETAPA 2. PRODUCCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS HIDROLIZADOS EMPLEANDO UF TANGENCIAL (V=5 L)

5.2.1. Reactor enzimático usado en la hidrólisis

En esta etapa, la hidrólisis enzimática se llevó a cabo en un reactor de 5 L (Fig. 5.5 a). Para asegurar la homogeneidad de dispersiones concentradas de proteína durante la hidrólisis, se usó un reactor acoplado con un agitador helicoidal (Fig. 5.5 b).

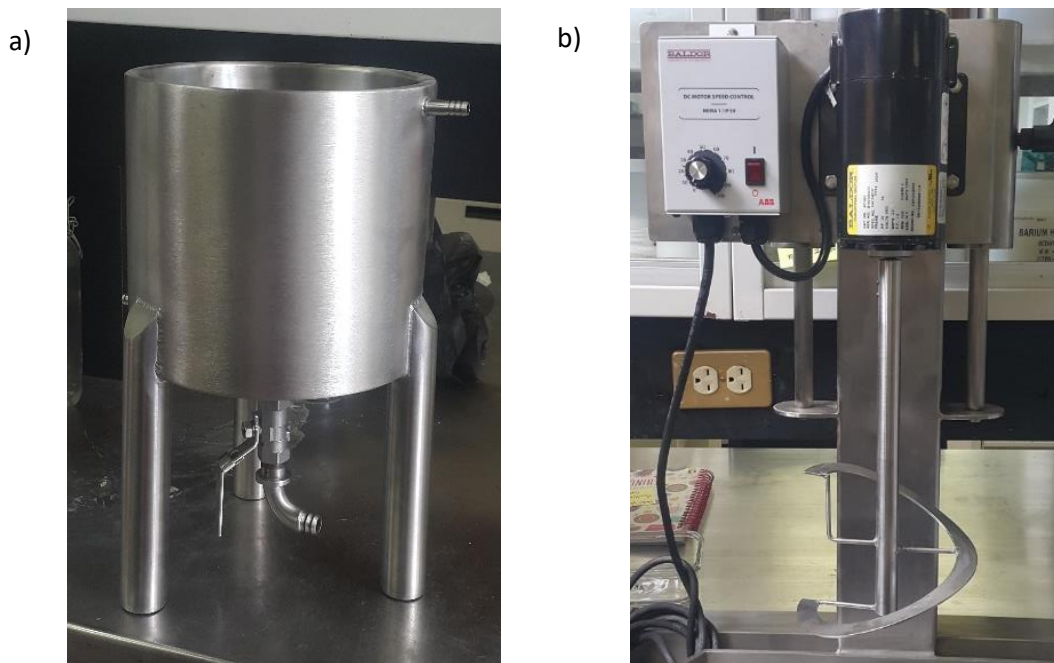


FIGURA 15. a) Reactor de 5 L en acero inoxidable empleado para la hidrólisis enzimática b) Agitador helicoidal a utilizado.

5.2.2. Sistemas de filtración tangencial empleados durante la UF de los hidrolizados.

Durante esta etapa se estudió el efecto del material y el corte de peso molecular de la membrana durante el fraccionamiento en sistemas que operaron en flujo tangencial. Se emplearon dos membranas planas de RC (10 y 5 kDa) con un área superficial de 0.1 m². El desempeño de estas fue comparado con tres membranas cerámicas, de las cuales dos cuentan con 7 canales (50 y 10 kDa), un área de 0.031 m² y una membrana de un canal (5 kDa) con un área de 0.009 m².

El sistema de filtración tangencial que se utilizó para llevar a cabo el fraccionamiento de los hidrolizados con membranas cerámicas se muestra en la Fig. 5.6. Este equipo de filtración SIVA-TAMI, consta de un tanque de alimentación de 14 L; una bomba, la cual provee la presión del sistema con la velocidad de circulación del fluido y cuenta con un variador de frecuencia para modificar dicho parámetro; un módulo para la membrana de acero inoxidable con una sola salida para el permeado; un intercambiador de calor ubicado a la salida del retenido para regular la temperatura y una válvula en el lado del permeado, para realizar contrapresión. Las temperaturas y presiones fueron determinadas empleando sensores ubicados en la alimentación, permeado y retenido.

Al momento de emplear las membranas planas, se usó el equipo de filtración mostrado en la Fig. 5.7. Este consta de un tanque de alimentación de 5 L de acero inoxidable, el cual se encuentra enchaquetado para el control de la temperatura; un módulo para la membrana plana de acero inoxidable (Millipore Pellicon 2, el cual cuenta con dos salidas de permeado (una de ellas se sella para llevar a cabo la UF); manómetros para monitorear la presión, los cuales se encuentran ubicados a la entrada y salida de la alimentación, así como en el lado del permeado; una bomba peristáltica la cual cuenta con variador de frecuencia incorporado para controlar la velocidad del fluido y una válvula en el lado del permeado. En ambos sistemas de filtración, se recolectó el permeado obtenido en un recipiente y con el fin de calcular el flux, la ganancia de peso de este fue monitoreada en línea empleando una balanza conectada a una computadora.

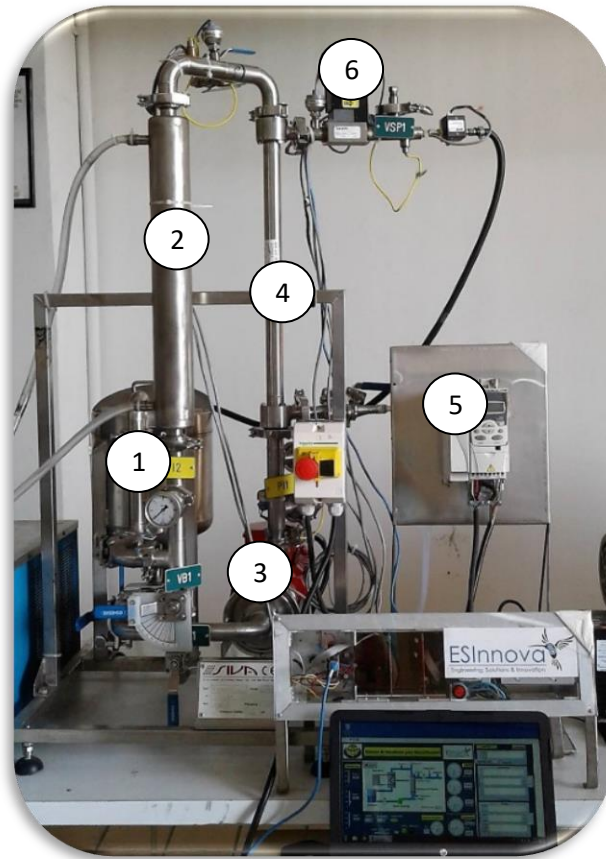


FIGURA 16. Equipo de filtración tangencial para membranas cerámicas. (1) Tanque de alimentación, (2) intercambiador de calor, (3) Bomba centrífuga, (4) Módulo de membrana, (5) Variador de frecuencia, (6) Válvula de permeado.

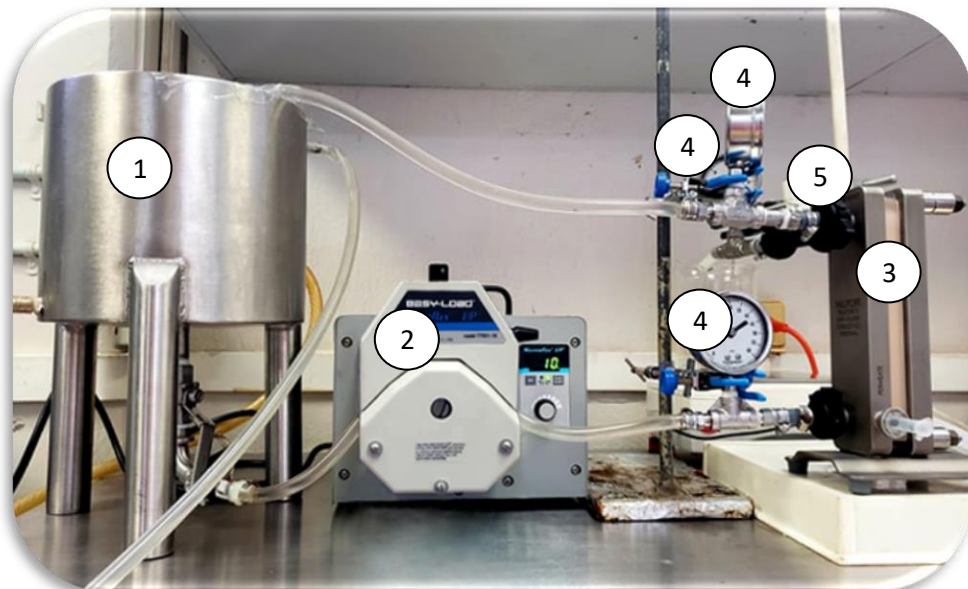


FIGURA 17. Equipo de filtración tangencial para membranas planas. (1) Tanque de alimentación, (2) Bomba centrífuga, (3) Módulo de membrana, (4) Manómetros, (5) Válvula de permeado.

5.2.3. Método para establecer el flux sostenible

Se realizó la determinación del flux sostenible mediante el protocolo de incrementos en la TMP. Este consiste en realizar incrementos sucesivos en la presión, por el mismo intervalo de tiempo, para monitorear el flux en el estado estacionario (Fig. 5.8). Por lo tanto, como se muestra en la Figura 5.8, una tendencia lineal será registrada hasta alcanzar el umbral en el cual el grado de ensuciamiento es más rápido y el incremento del flux será mínimo en función del gradiente de presión transmembrana. Es importante mencionar que en este protocolo la TMP se estableció mediante un aumento en el flujo de alimentación.

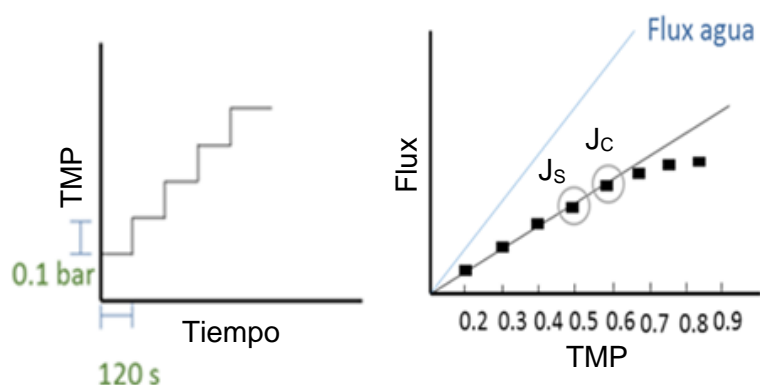


FIGURA 18. Determinación del flux sostenible mediante el protocolo de incrementos en el ΔP

5.2.4. Separación de los péptidos

En esta parte se evaluó el desempeño del fraccionamiento usando una sola etapa de UF y un proceso combinado UF/DF. Se comparó el rendimiento en términos de flux y de la recuperación de la proteína soluble, así como la separación de los péptidos.

5.2.4.1. Fraccionamiento por ultrafiltración

El desempeño del fraccionamiento se evaluó en términos de flux, selectividad y rendimiento de recuperación. Los coeficientes de separación se calcularon de la siguiente manera (Ec. 10):

$$S_{o,i} = \frac{C_{i,p}}{C_{i,r}} \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde $C_{i,p}$ y $C_{i,r}$ son las concentraciones másicas del compuesto i en el permeado y el retenido respectivamente. En cuanto al rendimiento del compuesto i en el permeado se define como (Ec. 11):

$$Y_i = \frac{M_p C_{i,p}}{M_r C_{i,r}} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde M_p es la masa de permeado acumulado y M_r la del retenido.

El flux se calculó mediante a partir de los datos recolectados por la balanza a través del tiempo mediante la siguiente ecuación (Ec. 12):

$$J = \frac{W_2 - W_1}{(t_2 - t_1) * Am} \quad (\text{Ec.12})$$

Donde Am es el área de la membrana, W_2 y W_1 son los pesos del permeado en el tiempo 2 (t_2) y tiempo 1 (t_1), respectivamente.

5.2.4.2. Evaluación de la diafiltración discontinúa.

Posterior al fraccionamiento, se realizó una etapa de diafiltración discontinúa. Dicha diafiltración se llevó a cabo con la membrana que presentó el mayor flux durante los experimentos de concentración y el menor ensuciamiento. Aquí, el rendimiento de recuperación de la proteína se expresó en función del número de dia-volumenes, definido como (Ec. 13):

$$N_D = \frac{V_b}{V_o} \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde V_o es el volumen inicial de alimentación y V_b es el volumen de agua añadido durante el proceso de diafiltración.

5.2.4.3. Evaluación teórica de la diafiltración continua empleando diagramas de pureza vs rendimiento (diagramas P-Y).

Para el uso de los diagramas P-Y es necesario definir dos familias de curvas de purificación-rendimiento, donde cada una de estas familias es función de un solo parámetro (Van Reis & Saksena, 1997). La selectividad, también llamada eficiencia de

separación, es el primer parámetro adimensional que se emplea y se calcula mediante la relación de los coeficientes de separación de los solutos (Ec. 14):

$$\psi = \frac{S_{o,i}}{S_{o,im}} \quad (\text{Ec. 14})$$

Donde $S_{o,i}$ y $S_{o,im}$ son los coeficientes de separación del soluto de interés, que se enriquece en el permeado, y el soluto que se quiere eliminar, que se queda en el retenido, respectivamente.

El N_D en modo diafiltración continua se define como (Ec. 15):

$$N_D = \frac{JAt}{V} \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde J es el flux de permeado, A el área de la membrana, t el tiempo de operación y V el volumen de retenido, el cual permanece constante a lo largo de todo el proceso. El segundo parámetro empleado para determinar los límites de purificación y rendimiento es (Ec. 16):

$$N\Delta S = \frac{JAt}{V} (S_{o,i} - S_{o,im}) \quad (\text{Ec. 16})$$

El balance de masa para el compuesto i se puede escribir en función de los coeficientes de separación. Al integrar dicho balance, se obtiene que para diafiltración continua, la concentración de i se define como (Ec. 17):

$$C_{i,r} = C_{i,o} e^{(-N_D S_{o,i})} \quad (\text{Ec. 17})$$

Donde $C_{i,o}$ es la concentración de i en $t=0$. El rendimiento en el permeado se define como (Ec. 18):

$$Y_i = \frac{V_p C_{i,p}}{V_r C_{i,o}} \quad (\text{Ec. 18})$$

Donde $C_{i,p}$ es la concentración de i en el filtrado al final de la diafiltración. Y_i se puede expresar en términos de N y $S_{o,i}$. Para ello se emplea el balance de masa general de i (Ec. 19):

$$V_r C_{i,o} = V_r C_{i,r} + V_p C_{i,p} \quad (\text{Ec. 19})$$

Reacomodando la ecuación anterior, sustituyendo el $V_p C_{i,p}$ obtenido de la ecuación 18 y empleando la ecuación 17 (Ec. 20):

$$Y_i = 1 - e^{(-N_D S_{o,i})} \quad (\text{Ec. 20})$$

El factor de purificación del compuesto i en el permeado se expresa como (Ec. 21):

$$P_i = \left(\frac{V_p C_{i,p}}{V_r C_{i,o}} \right) / \left(\frac{V_p C_{im,p}}{V_r C_{im,o}} \right) \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde $C_{im,p}$ y $C_{im,o}$ corresponden la concentración de los compuestos no deseados en el permeado y en el retenido en $t=0$ respectivamente. El factor de purificación puede ser expresado en función de N y los coeficientes de separación, obteniéndose (Ec. 22):

$$P_i = \frac{1 - e^{(-N_D S_{o,i})}}{1 - e^{(-N_D S_{o,im})}} \quad (\text{Ec. 22})$$

La ecuación anterior puede ser escrita en términos de selectividad empleando la definición de esta última y la expresión de rendimiento obtenida con anterioridad (Ec. 23):

$$P_1 = \frac{Y_1}{1 - (1 - Y_1)^{1/\psi}} \quad (\text{Ec. 23})$$

Obteniéndose así la primera relación para la construcción de los diagramas P-Y. La segunda relación se obtiene empleando la definición de factor de purificación, rendimiento y ΔS (Ec. 24):

$$P_1 = \frac{Y_1}{1 + (Y_1 - 1)e^{(N_D \Delta S)}} \quad (\text{Ec. 24})$$

5.3. MÉTODOS EXPERIMENTALES Y DE ANÁLISIS:

5.3.1. PROPIEDADES FUNCIONALES: PROTEÍNA SOLUBLE ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO

Se hizo la determinación del contenido de proteína soluble (%PS) en el hidrolizado y las fracciones obtenidas. Para esto las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos. El contenido de proteína soluble se define de la siguiente manera (Klompong *et al.*, 2007) (Ec. 25):

$$\text{Proteína soluble (\%)} = \frac{\text{Contenido de proteína en el sobrenadante}}{\text{Contenido de proteína total en la muestra}} 100 \quad (\text{Ec. 25})$$

Se evaluó el efecto de un tratamiento térmico en la estabilidad de los hidrolizados y de las fracciones. Las muestras se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos, posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos y la proteína soluble después del tratamiento térmico fue calculada con la siguiente relación (Ec. 26):

$$\text{Proteína soluble después del tratamiento térmico (\%)} = \frac{\text{Contenido de proteína en el sobrenadante después del tratamiento térmico}}{\text{Contenido de proteína total en la muestra antes del tratamiento térmico}} 100 \quad (\text{Ec. 26})$$

La cantidad de proteína se determinó empleando el método de Kjeldahl. Para esto, las muestras se pesaron en los tubos digestores y se agregaron a cada tubo dos tabletas de catalizador y 12 mL de ácido sulfúrico. La digestión se llevó a cabo durante dos horas y las muestras digeridas se procedieron a destilar. Para ello, 50 mL de una solución de hidróxido de sodio al 40% fue añadida al tubo y el destilado obtenido fue recolectado en un Erlenmeyer, el cual contenía una solución de ácido bórico al 4%. La destilación fue llevada a cabo hasta que ≥ 180 mL de destilado fuese recolectado. La titulación se llevó a cabo con HCl y el contenido de proteína se calculó mediante la Ec. 27:

$$\text{Contenido de proteína} = \frac{(v_s - v_B) m 14.01}{Pm 10} * F \quad (\text{Ec. 27})$$

Donde v_s y v_B corresponden a los volúmenes de HCl utilizados para titular la muestra y el blanco respectivamente, m es la molaridad del HCl y F es un factor empleado para convertir contenido de nitrógeno a contenido proteico, en el caso de la yema de huevo F tiene un valor de 6.62.

5.3.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: DECOLORACIÓN DEL CATION ABTS⁺.

La decoloración del catión ABTS⁺ fue llevada a cabo con el fin de evaluar la capacidad de eliminación radicales libres. Dicho ensayo está basado en la reducción de los radicales libres ABTS (ABTS⁺) mediante antioxidantes. Este fue llevado a cabo de acuerdo a lo reportado por Alashi *et al.* (2014) con ligeras modificaciones. 7 mM de ABTS y 2.45 mM de persulfato de potasio fueron disueltos en un buffer salino de fosfatos (PBS), pH 7.4. La solución fue dejada en la oscuridad a temperatura ambiente (25°C) durante

12-16 horas con el fin de obtener el catión ABTS⁺. Para el análisis ABTS⁺, fue diluido con el PBS hasta que una absorbancia de 0.7 (±0.02) a 734 nm fue obtenida. Las muestras (previamente liofilizadas) fueron reconstituidas en el PBS hasta alcanzar una concentración de proteína de 0.04%. La actividad antioxidante fue medida mezclando 1.5 mL de la solución de ABTS⁺ con 200 µL de las muestras y la disminución en la absorbancia fue observada después de 6 minutos a una longitud de onda de 734 nm. El PBS fue usado como blanco. El porcentaje del catión ABTS⁺ reducido fue calculado mediante la siguiente ecuación (Ec. 28):

$$\text{Porcentaje del catión ABTS}^+ \text{ scavenged} = \frac{A_B - A_S}{A_B} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 28})$$

Donde A_B y A_S son las absorbancias del blanco y de la muestra, respectivamente.

5.3.3. DETERMINACIÓN DE RANGO DE PESO MOLECULAR POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO.

La distribución de peso molecular de los péptidos en las muestras fue analizada por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se empleó un HPLC equipado con un detector de diodos (la absorbancia fue monitoreada a 220 nm) usando la columna PL-Aquagel-OH 20. Se utilizó agua MilliQ como fase móvil (elusión isocrática). La calibración de la columna fue establecida mediante el uso de péptidos de peso molecular conocido como Citocromo C (12327 kDa), cadena B de Insulina (3495.89 kDa) y la mezcla de péptidos (Sigma-Aldrich) conformada por acetato de angiotensina II (1046 kDa), acetato de metionina-encefalina (0.573 kDa), leucina-encefalina (0.555 kDa) y mezclas de aminoácidos: VAL-TYR-VAL (0.379 kDa) y GLY-TYR (0.238 kDa). En la Fig. 5.9 se muestra la curva de calibración obtenida con los diferentes estándares.

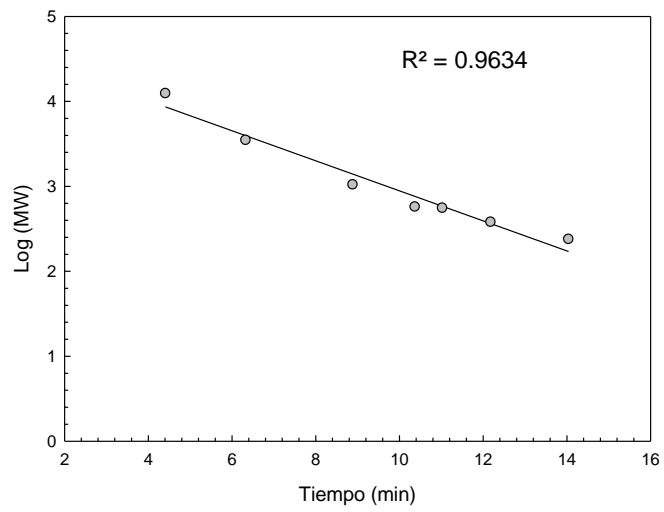


FIGURA 19. Curva estándar obtenida durante la calibración de la columna con los diferentes estándares de peso molecular conocido.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. SISTEMA FLUJO PISTÓN

Se llevó a cabo el fraccionamiento en un sistema flujo pistón con membranas poliméricas de celulosa regenerada (RC) polietersulfona (PES) y triacetato de celulosa (TCA) y se estudió el efecto de la concentración de grasa y proteína en el hidrolizado. Para esta etapa los hidrolizados se prepararon en un reactor de 300 mL acoplado a un impulsor helicoidal.

6.1.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EMPLEANDO UN REACTOR ACOPLADO A UN IMPULSOR HELICOIDAL ($V_T=300$ mL).

Se emplearon concentraciones iniciales de proteína de 10 y 20%, concentraciones iniciales de grasa en la materia prima de 0, 10 y 46%, un volumen de hidrolizado de 200 mL y un impulsor helicoidal. Las hidrólisis se llevaron a cabo bajo condiciones establecidas por Ríos (2016) en un reactor de 100 mL. Se observó que el mezclado fue homogéneo cuando se empleó un impulsor helicoidal en el reactor para las dos dispersiones de proteína (10 y 20%) utilizadas.

En la Fig. 6.1 se muestra el efecto de la concentración de grasa (0, 10 y 46%) en la materia prima sobre el grado de hidrólisis para las dos concentraciones de proteína evaluados.

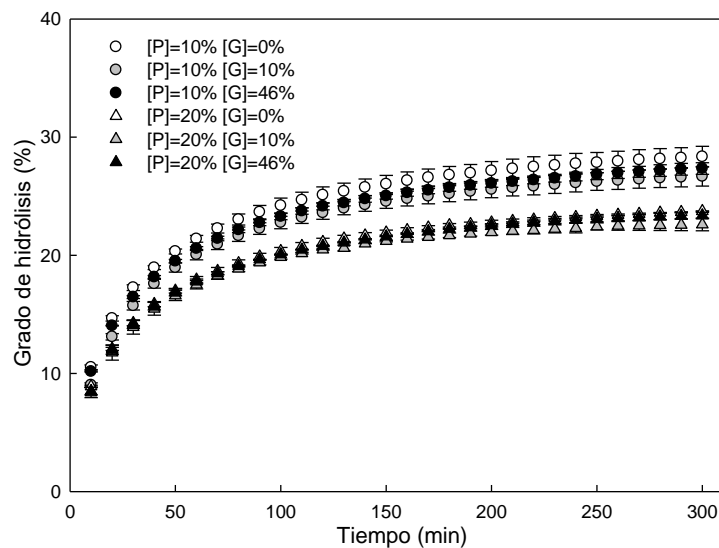


FIGURA 20. Grado de hidrólisis a través del tiempo para una concentración de proteína de 10% y 20% en un reactor de 300 mL.

En la gráfica se observa que, para las dos concentraciones de proteína empleadas, el grado de hidrólisis alcanzado en mezclas con una concentración de grasa del 0, 10 y 46% fue el mismo. Al trabajar al 10% de proteína el DH alcanzado con una concentración de grasa del 0, 10 y 46% fue de 28.35, 26.68 y 27.34% respectivamente. En el caso del 20% el DH fue de 23.74, 22.91 y 23.37% al emplear una concentración de grasa de 0, 10 y 46% respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ríos (2016) al emplear el reactor de 100 mL, donde se observó que la grasa no tenía un efecto significativo en el grado de hidrólisis y se alcanzó un DH de aproximadamente un 28.5 % para una concentración de proteína del 10%. Sin embargo, al emplear una concentración de proteína del 20% en el reactor de 100 mL, el grado de hidrólisis reportado fue del 20.9%. En el presente trabajo, se alcanzó un DH aproximadamente del 23% debido al uso del impulsor helicoidal, el cual permitió la homogenización adecuada del sustrato y la difusión apropiada de la enzima, por lo que se pudo alcanzar un DH ligeramente superior al obtenido en el reactor de 100 mL, donde se emplea agitación magnética.

Cabe mencionar que los hidrolizados presentaron un cambio en el color a lo largo de la reacción. En la Fig. 6.2, se muestra dicho cambio a lo largo de la reacción enzimática, al emplear un contenido de proteína y grasa del 20 y 0% respectivamente. De aquí se puede observar que, antes del proceso de hidrólisis, la dispersión tiene un color amarillo pálido y a lo largo de la reacción se va tornando más oscuro, siendo el cambio de color más drástico durante la primera hora.

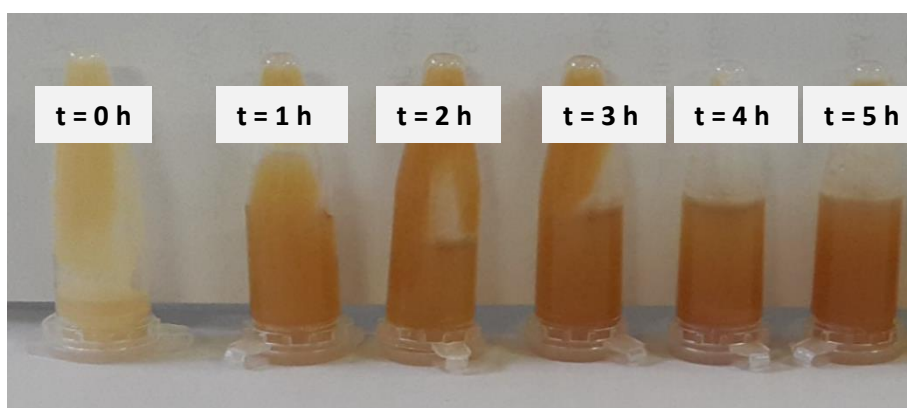


FIGURA 21 Imágenes de las muestras tomadas cada hora a lo largo de la hidrólisis enzimática.

Estos resultados coinciden con lo encontrado en la literatura, donde se ha reportado que el color de los hidrolizados se ve afectado por el tratamiento enzimático. Por ejemplo, Ben Salem *et al.* (2017) reportaron una pérdida en la luminosidad de los hidrolizados de proteína de pescado a lo largo de la reacción, obteniendo al final, un hidrolizado marrón oscuro. En dicho trabajo, el oscurecimiento del hidrolizado fue atribuido a la oxidación de la mioglobina presente en la materia prima durante la hidrólisis enzimática.

Antes de llevar a cabo el proceso de hidrólisis, se determinó el contenido de proteína soluble antes y después del tratamiento térmico en las dispersiones preparadas y dichos valores oscilaron entre un 2 y 4 % para todos los casos. En la Tabla 6.1, se muestra el contenido de proteína soluble para cada uno de los hidrolizados obtenidos. El contenido de proteína soluble incrementó después del proceso de hidrólisis, debido a la reducción de peso molecular de las proteínas y probablemente a la disminución de su carácter hidrofóbico; esto último causado por la mayor exposición de los grupos polares presentes en el ambiente acuoso (Chabanon *et al.*, 2007).

De la Tabla 6.1 se observa que al incrementar el contenido de proteína inicial, los valores de proteína soluble disminuyen cerca del 20%. Tal vez, la menor solubilidad de los hidrolizados con un contenido de proteína del 20%, puede ser atribuida a la presencia de un mayor número de residuos hidrofóbicos. Estos péptidos hidrofóbicos con poca solubilidad, pueden condensarse en pequeñas partículas y formar una especie de plasteina insoluble (Adler-Nissen, 1986). También se puede observar que, para un contenido de proteína inicial dado, la grasa no tuvo un efecto significativo (según la prueba de Tukey) en el contenido de proteína soluble antes y después del tratamiento térmico. Estos resultados coinciden con lo observado por Ríos (2016) en un reactor de 100 mL, quién reportó que el contenido de grasa no tenía influencia alguna en las propiedades funcionales de los hidrolizados obtenidos.

TABLA 6.1. Contenido de proteína soluble antes (%PS) y después del tratamiento térmico (%EPS) para cada uno de los hidrolizados obtenidos.

% [P]	%PS			%EPS		
	% [G]=0	% [G]=10	% [G]=46	% [G]=0	% [G]=10	% [G]=46
10	93.18 ^a	93.20 ^a	94.87 ^a	92.90 ^a	92.10 ^a	94.87 ^a
20	73.10 ^b	73.30 ^b	72.31 ^b	72.84 ^b	73.43 ^b	73.43 ^b

6.1.2. EFECTO DEL MATERIAL DE LA MEMBRANA Y EL MWCO.

Para observar el efecto del material de la membrana durante la UF, se emplearon hidrolizados a una concentración inicial de proteína y grasa del 10 y 0% respectivamente, los cuales fueron fraccionados por membranas de RC, PES y TCA de 10 kDa en el sistema flujo pistón. Los datos de flux *versus* tiempo obtenidos para las diferentes membranas se muestran en la Fig. 6.3.

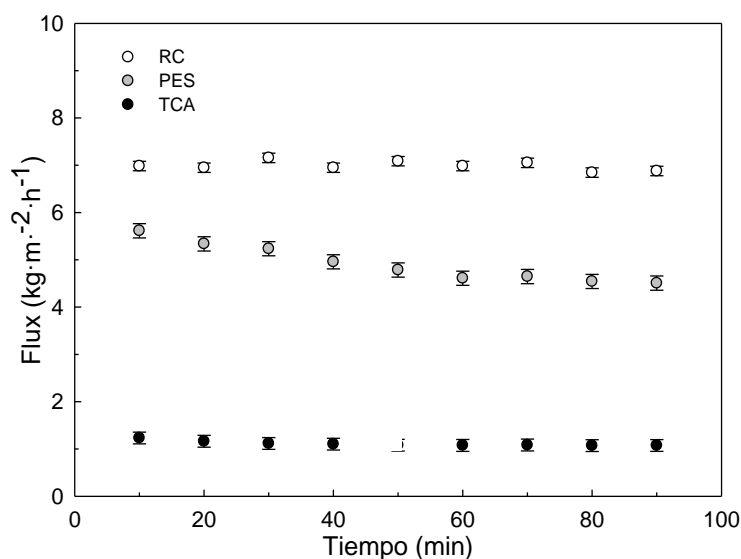


FIGURA 22. Flux de permeado durante la UF de hidrolizados con concentraciones de proteína y grasa del 10 y 0% respectivamente, empleando membranas de RC, PES y TCA de 10 kDa y una presión de 0.5 bar.

Se puede observar que la membrana que presentó el mayor flux fue la de RC, seguida por la de PES y el menor desempeño fue obtenido por la membrana de TCA. El rendimiento de esta última fue inferior hasta en 86.13%, en comparación con la membrana de RC, y su bajo desempeño fue atribuido a su mayor resistencia intrínseca (Tabla 6.2). El desempeño de la membrana de PES fue 34.14% inferior a la de RC, a pesar que esta última mostró una mayor resistencia hidráulica (Tabla 6.2). El menor rendimiento obtenido con la membrana de PES, fue atribuido, como se puede observar en la Tabla 6.2, a que el índice de ensuciamiento después del experimento (IF_{UF}), fue mayor a cero, lo que indica que la membrana se ensució durante el proceso de UF, mientras que para la membrana de RC, el IF_{UF} tuvo un valor de cero. Sin embargo, el índice de ensuciamiento después del lavado (IF) fue de cero para todas las membranas, indicando que estas se recuperaron por completo. El contenido de proteína no se vio afectado por el material de la membrana y la solubilidad y estabilidad térmica de los permeados obtenidos fue casi del 100%.

TABLA 6.2. Resistencia intrínseca (R_M) de las diferentes membranas, índice de ensuciamiento después del fraccionamiento (I_{UF}) y del lavado (IF) y propiedades de los permeados obtenidos durante la UF de los hidrolizados.

MWCO	Material	R_M	I_{UF}	IF	%P	%PS	%EPS
10 kDa	RC	7.8×10^9	0.02 ± 0.040	0.04 ± 0.030	9.54 ^a	99.57 ^a	100 ^a
	PES	5.1×10^9	0.35 ± 0.002	0.01 ± 0.006	9.57 ^a	100 ^a	100 ^a
	TCA	4.3×10^{10}	0.03 ± 0.010	0.02 ± 0.030	10.32 ^a	97.78 ^a	99.75 ^a
5 kDa	RC	3.2×10^{10}	0.01 ± 0.020	0.01 ± 0.005	9.10 ^a	97.48 ^a	98.74 ^a
	PES	4.3×10^{10}	0.39 ± 0.008	0.01 ± 0.010	9.90 ^a	95.24 ^a	96.32 ^a
1 kDa	RC	1.6×10^{11}	0.01 ± 0.020	0.01 ± 0.030	7.34 ^b	96.62 ^b	98.06 ^b

Como las membranas de 10 kDa de RC y PES presentaron los mejores valores de flux, se prosiguió al fraccionamiento de los permeados obtenidos por una membrana de 5 kDa. Los perfiles de flux obtenidos durante la UF se muestran en la Fig. 6.4. En esta se puede apreciar que hubo una disminución en el flux en 89.23% al emplear la membrana de PES. Esta membrana también mostró un ensuciamiento después del proceso de UF, con un I_{UF} de 0.39 (Tabla 6.2).

Resultados similares fueron reportados por Saidi *et al.* (2013), quienes durante la UF de hidrolizados de proteína de atún al 1%, compararon tres membranas de PES de diferentes proveedores y una de RC, todas con un MWCO de 10 kDa. Encontraron que el porcentaje de ensuciamiento era mayor para las membranas de PES, obteniendo valores de ensuciamiento entre un 42-71%, lo que conllevó a que presentaran un menor rendimiento durante la UF. Dicho fenómeno fue atribuido a la mayor hidrofobicidad presentada por las membranas de PES. Se ha reportado que entre más hidrofílica sea una superficie, se reduce la adherencia de especies orgánicas en esta (Saidi *et al.*, 2013), por lo tanto, la hidrofiliidad puede ser vista como un factor clave para el evitar el ensuciamiento durante la UF.

En cuanto a la caracterización de los permeados, en la Tabla 6.2 se puede observar que no hay diferencia significativa entre los contenidos de proteína en el permeado final obtenido por ambas membranas y que dicha proteína es totalmente soluble (%PS=100%) y estable térmicamente (%EPS=100%) .

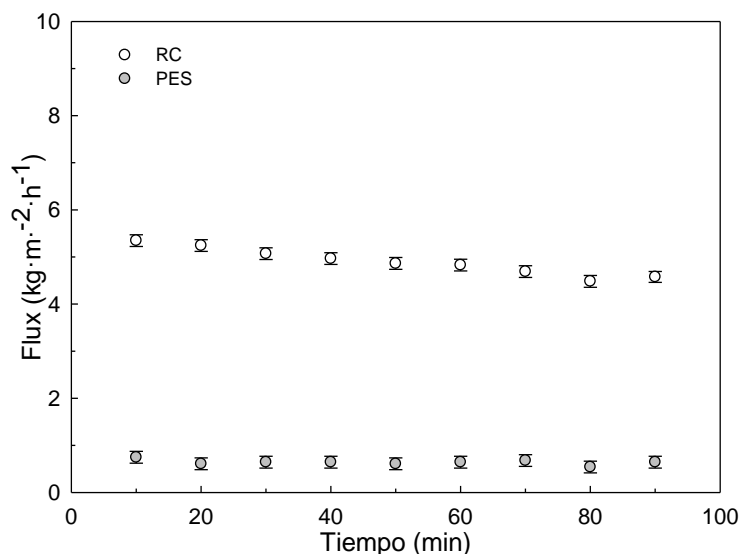


FIGURA 23. Flux durante la UF de hidrolizados empleando membranas de RC y PES de 5 kDa y una presión de 1.5 bar.

Como la membrana de RC de 5 kDa produjo los mejores resultados, se prosiguió al fraccionamiento del permeado de esta por la membrana de 1 kDa. En la Fig. 6.5 se muestra el flux a través del tiempo para las 3 membranas de RC: 10, 5 y 1 kDa. En comparación con la membrana de 10 kDa, hubo una disminución del flux en 32.4 y 76% al emplear las membranas de 5 y 1 kDa respectivamente, lo cual es debido a la mayor resistencia de la membrana causada por la disminución del diámetro de poro (Tabla 6.2). De aquí cabe resaltar que, al igual que con las membranas de 10 y 5 kDa, la membrana de 1 kDa no mostró un ensuciamiento después del fraccionamiento, como se puede observar con el valor de IF_{UF} obtenido en la Tabla 6.2. Los permeados obtenidos con la membrana de 1 kDa tuvieron una solubilidad y estabilidad térmica casi del 100% y el contenido de proteína disminuyó a 7.34%.

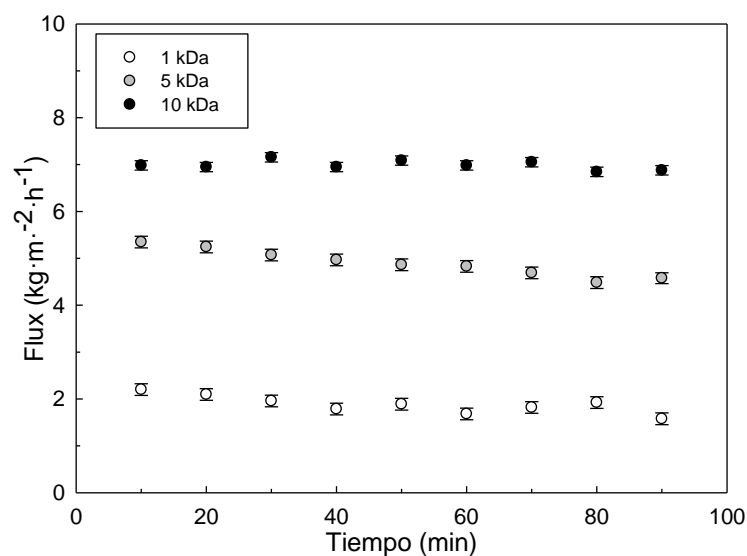


FIGURA 24. Flux durante la UF secuencial de hidrolizados empleando membranas de RC de con diferentes MWCO 10, 5 y 1 kDa.

6.1.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE PROTEÍNA Y GRASA EN EL FLUX DE PERMEADO DURANTE EL FRACCIONAMIENTO.

Con el fin de estudiar el efecto de la concentración inicial de proteína y grasa durante la UF, se prepararon hidrolizados con un contenido de proteína del 10 y 20% con diferentes contenidos de grasa (0, 10 y 46%). Los hidrolizados obtenidos (Fig. 6.6) se fraccionaron por una membrana de celulosa regenerada de 10 kDa, ya que esta fue la que tuvo el mejor desempeño en términos de flux y no desarrolló ensuciamiento.

En la Fig. 6.7 se muestra el flux a través del tiempo para los diferentes hidrolizados obtenidos. De aquí se puede observar que el aumentar el contenido de proteína en un 10%, conllevó a una disminución del flux para todos los hidrolizados trabajados. Por ejemplo, cuando se fraccionaron los hidrolizados obtenidos sin grasa y se aumentó la proteína inicial de 10 a 20%, el flux disminuyó en un 44%. Resultados similares fueron reportados por Das *et al.* (2009) quienes durante el fraccionamiento de hidrolizados de ajonjolí empleando una membrana de PES con un MWCO de 5 kDa, al pasar de una concentración de 400 a 100 ppm, obtuvieron un aumento en un 43% del flux de permeado. Lo anterior demuestra la existencia del fenómeno de polarización por concentración, el cual aumentó al incrementar la concentración de proteína inicial.

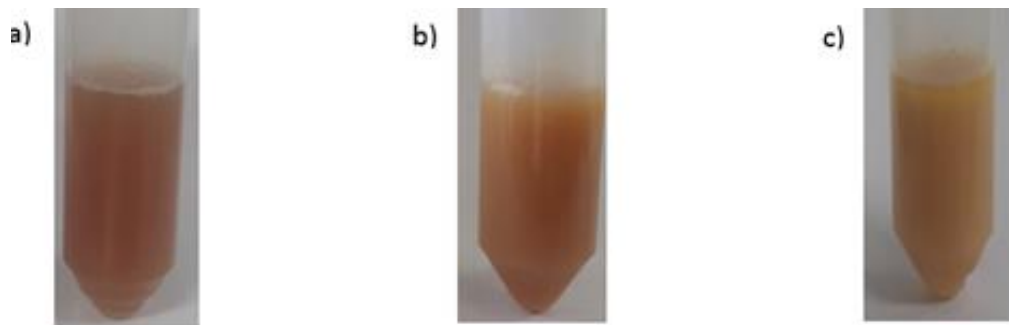


FIGURA 25. Hidrolizados obtenidos en suspensiones con diferentes concentraciones de proteína (P) y grasa (G): a) P=10% G=0% b) P=10% G=10% c) P=10% G=46%

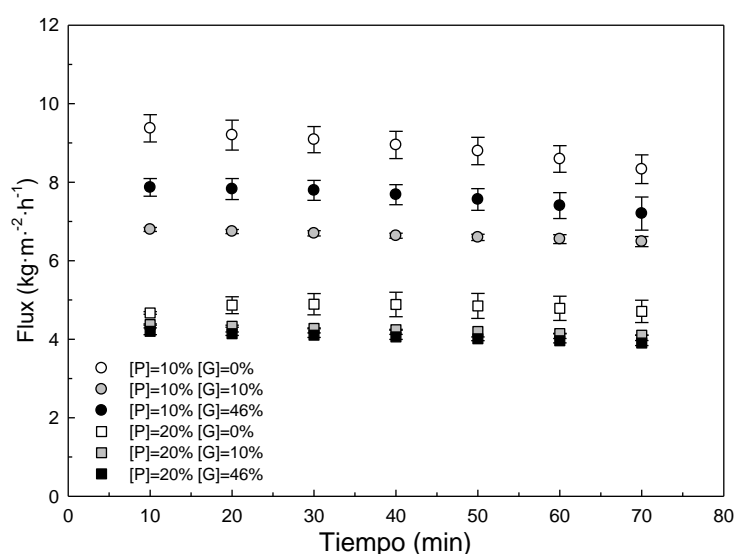


FIGURA 26. Flux de permeado empleando una membrana de 10 kDa, una presión de 0.5 bar a diferentes concentraciones de proteína y grasa.

En la Tabla 6.3 se muestran los valores de flux y los coeficientes de transferencia de masa obtenidos al ajustar el modelo de polarización por concentración a los datos experimentales. En cuanto al contenido de grasa inicial, la presencia de esta disminuye significativamente el flux de permeado (según la prueba de Tukey), en dispersiones de proteína del 10% conteniendo 10 % de grasa. Para esta concentración de proteína el mayor flux de permeado se obtuvo al trabajar con una concentración de 0 % de grasa. Aparentemente, la presencia de grasa incrementa el fenómeno de polarización por concentración, lo cual contribuye a una disminución en el coeficiente de transferencia de masa (Tabla 6.3) y por lo tanto una disminución en el flux de permeado. Sin embargo, este efecto es menor al aumentar la concentración de grasa a 46%. En la Tabla 6.3 se observa que el coeficiente de transferencia de masa es mayor, cuando se trabaja con una concentración de grasa del 46%, en comparación con el k obtenido al trabajar con

una [G] del 10%, indicando que la capa de polarización formada en la superficie de la membrana al trabajar con un 10% de grasa es mayor. Posiblemente esto se deba a que la capa de polarización formada en la superficie de la membrana al trabajar con un 10% de grasa se adhiere a la superficie de esta y forma una película compacta que no puede ser re-suspendida por el agitador. Por otro lado, con una concentración de grasa del 46% se forman agregados más densos que pueden ser arrastrados por la agitación, y/o se forma una capa menos compacta (con cierta porosidad) en la superficie de la membrana que permite el paso de una mayor cantidad de permeado.

TABLA 6.3. Valores de flux, coeficientes de transferencia de masa (k) y porcentaje de proteína obtenidos para los diferentes hidrolizados fraccionados.

%Proteína	%Grasa	Flux ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	k ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	%Proteína en el permeado
10	0	8.66 ^c	21.44	8.86 ^a
	10	6.57 ^b	17.04	9.17 ^a
	46	7.46 ^{bc}	20.17	8.63 ^a
20	0	4.81 ^a	12.39	14.21 ^b
	10	4.17 ^a	11.89	15.42 ^b
	46	3.98 ^a	12.17	15.21 ^b

En la Fig. 6.8 se muestran cada uno de los hidrolizados antes y después de centrifugar. De aquí se puede confirmar que los agregados formados en presencia de 46% de grasa son más compactos y pueden ser arrastrados más fácilmente por el agitador. Por otro lado, los agregados obtenidos al trabajar con un contenido de 10 % de grasa son menos densos. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 6.3, la concentración de proteína en el permeado no fue afectada por la presencia de grasa.

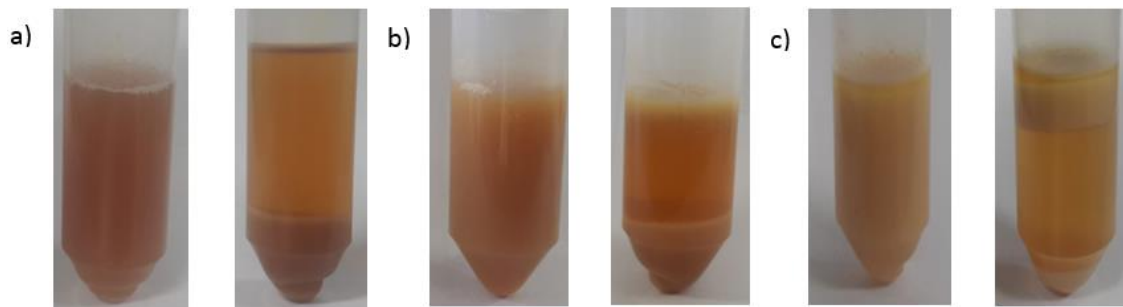


FIGURA 27. Hidrolizados obtenidos en suspensiones con diferentes concentraciones de proteína (P) y grasa (G): a) P=10% G=0% b) P=10% G=10% c) P=10% G=46% antes y después del proceso de centrifugación.

El coeficiente de transferencia de masa disminuyó al incrementar la concentración de proteína de un 10 a un 20%, indicando una mayor polarización causada por el incremento en el contenido de proteína inicial. La disminución del flux de permeado debido a la presencia de grasa fue menor cuando se procesaron hidrolizados obtenidos a partir de una concentración de proteína del 20%. Al incrementar el contenido de grasa de 0 a 10 y 46% en la mezcla de hidrólisis, el flux disminuyó en 13.2 y 17.1% respectivamente. Posiblemente el efecto de la grasa sea atenuado por la polarización por concentración causado por el aumento en la concentración inicial de proteína, siendo este último el que controla la resistencia a la transferencia de masa del proceso. En la literatura no fue encontrado reporte alguno en el cual se estudie el efecto del contenido de grasa durante la UF de hidrolizados.

Con el fin de estudiar si los solutos no solubles (SNS) tenían un efecto sobre el desempeño del proceso y ya que se observó que el contenido de grasa disminuye un poco el flux, los diferentes hidrolizados fueron sometidos a un proceso de centrifugación y posteriormente se fraccionaron. Puede verse en la Fig. 6.8 que al centrifugarse los hidrolizados que poseen grasa éste se separa en 3 fases: la grasa que queda en la parte superior, los SNS que se precipitan y una fase líquida (la cual queda en medio) que contiene la proteína soluble. Esta última es la que se toma para llevar a cabo el proceso de fraccionamiento. En cuanto a los hidrolizados que no poseen grasa, se forman sólo dos fases: el precipitado y la fase líquida.

Los resultados obtenidos al filtrar los hidrolizados después de centrifugar se pueden observar en la Fig. 6.9. Puede verse que cuando se trabajó con un contenido de proteína del 10% se pudo observar un mayor impacto del proceso de centrifugación. Para todos

los hidrolizados bajo esta concentración de proteína, hubo una disminución del rendimiento del proceso después del proceso de centrifugación.

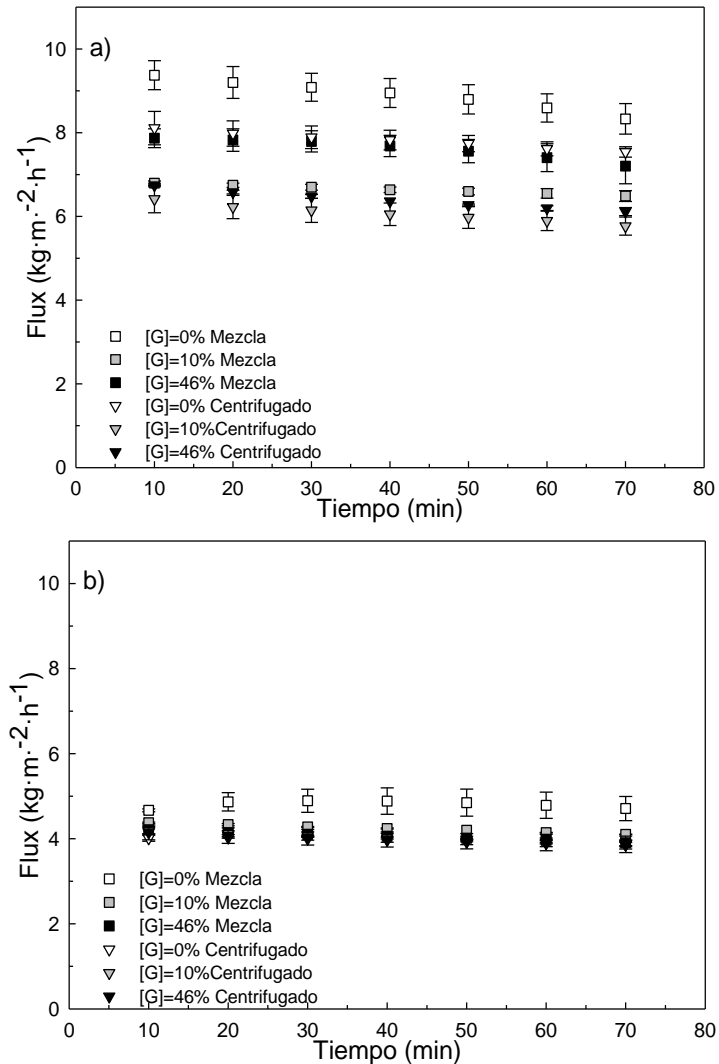


FIGURA 28. Efecto del proceso de centrifugación de los hidrolizados en el desempeño de la ultrafiltración. a) P=10% b) P=20%

Al parecer la presencia de los SNS contrarresta la acumulación de los solutos de menor tamaño en la superficie de la membrana (Fig. 6.10 a.), evitando así la formación de una capa de polarización más compacta, la cual es la causante de la disminución del rendimiento del proceso (Fig. 6.10 b).

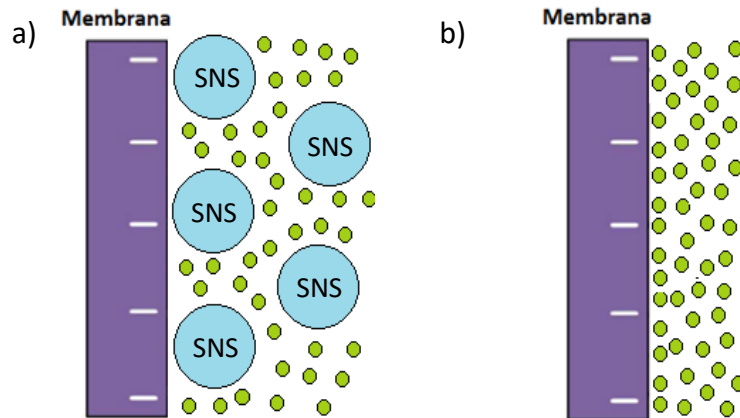


FIGURA 29. Descripción gráfica del fenómeno de polarización presente durante la UF de los hidrolizados sin centrifugar (a) y centrifugados (b)

Al trabajar con una concentración de proteína del 20%, la disminución del flux de permeado sólo tuvo un efecto significativo cuando se centrifugó aquel hidrolizado que no tenía grasa. Para el resto de los casos, la centrifugación no tuvo un efecto sobre el rendimiento del proceso. En la Tabla 6.4 se muestra que el coeficiente de transferencia de masa no se vio afectado por el proceso de centrifugación cuando se trabajó con esta concentración inicial de proteína. Se puede concluir que con una $[P]$ del 20%, los fenómenos de polarización están controlados por la proteína soluble presente.

En cuanto al porcentaje de proteína soluble en el permeado, éste no se vio afectado por el proceso de centrifugación para ninguno de los hidrolizados fraccionados. Dichos resultados se pueden observar en la Tabla 6.4.

Antes y después del proceso de fraccionamiento se realizó la prueba de permeabilidad de agua. Como se puede ver en la Tabla 6.4, para todos los casos la membrana se recuperó totalmente, ya que los IF tuvieron un valor de cero.

TABLA 3.4. Porcentaje de proteína en el permeado, coeficientes de transferencia de masa (k) y valores de índice de ensuciamiento (IF) obtenidos para los hidrolizados sin centrifugar (SCF) y centrifugados (CCF).

%[P]	%[G]	%[P] en el permeado		k (kg m ⁻² h ⁻¹)		IF	
		SCF	CCF	SCF	CCF	SCF	CCF
10	0	8.86 ^a	8.99 ^a	21.44	18.15	0.01±0.050	0.01±0.027
	10	9.17 ^a	9.27 ^a	17.04	14.44	0.02±0.020	0.01±0.040
	46	8.63 ^a	9.14 ^a	20.17	16.98	0.03±0.006	0.01±0.030
20	0	14.21 ^b	14.18 ^b	12.39	12.48	0.01±0.003	0.001±0.020
	10	15.42 ^b	16.02 ^b	11.89	12.10	0.01±0.008	0.01±0.040
	46	15.21 ^b	14.48 ^b	12.17	12.18	0.01±0.020	0.01±0.020

6.2. SISTEMA TANGENCIAL

6.2.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EMPLEANDO UN REACTOR ACOPLADO A UN IMPULSOR HELICOIDAL ($V_T=5$ L).

Durante el fraccionamiento empleando el sistema flujo pistón, la presencia de grasa tuvo un efecto negativo en el rendimiento de la UF, especialmente cuando se trabajó con un contenido de proteína del 10%. Por ello, se prosiguió a hacer la hidrólisis enzimática en el reactor de 5 L, con concentraciones de proteína del 10 y 20% y una concentración de grasa del 2%, que es el mínimo valor de grasa alcanzado después de una extracción de dos etapas empleando hexano. También, para esta escala, los tiempos de hidrólisis se acortaron de 5 a 3 horas, ya que, como se puede observar en la Fig. 6.1, el grado de hidrólisis no aumentó de manera significativa, a un máximo de 1.5% en las últimas dos horas de hidrólisis al emplear el reactor de 300 mL. Las curvas de grado de hidrólisis obtenidas en el reactor de 5 L se muestran en la Fig. 6.11.

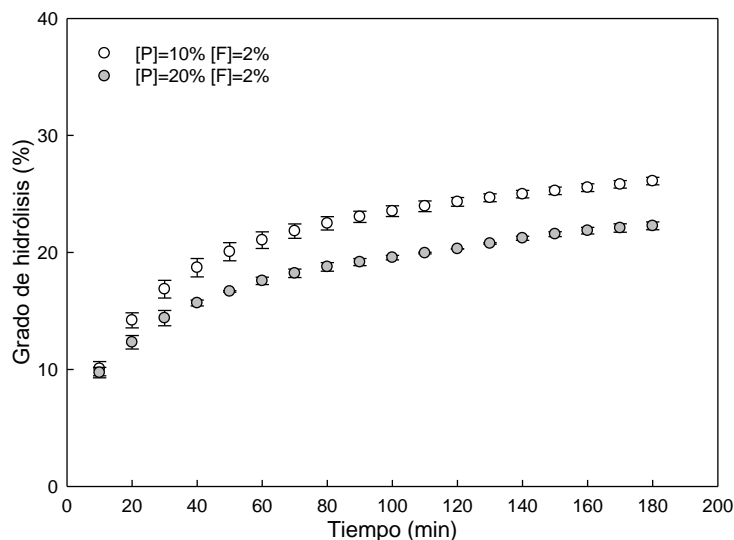


FIGURA 30. Grado de hidrólisis a través del tiempo para una concentración de proteína de 10% y 20%.

En dichas curvas se puede apreciar que el máximo grado de hidrólisis obtenido para un contenido de proteína del 10 y 20% fue de 26.09 y 22.27% respectivamente. En cuanto al contenido de proteína soluble antes y después del tratamiento térmico para el hidrolizado de 10% fue de 94.79 y 93.2%. Al igual que en el reactor de 300 mL, el aumentar al contenido de proteína al 20%, el valor de proteína soluble antes y después del tratamiento térmico disminuyó, obteniéndose valores de 76.02 y 73.62%, respectivamente. En la Tabla 6.5 se comparan los resultados obtenidos en el reactor de 5 L y el de 300 mL. De aquí se puede observar que, para un contenido de proteína fijo, no hubo diferencia significativa en ninguna de las variables evaluadas entre el reactor de 300 mL y el de 5 L según la prueba de Tukey.

TABLA 6.5. Grados de hidrólisis (%DH), proteína soluble antes (%PS) y después del tratamiento térmico (%EPS) obtenidos en los reactores de 300 mL y 5 L.

%Proteína	Volumen del reactor	%DH	%PS	%EPS
10%	300 mL	26.8 ^a	93.20 ^c	90.10 ^c
	5 L	26.09 ^a	94.79 ^c	93.20 ^c
20%	300 mL	22.54 ^b	73.31 ^d	73.43 ^d
	5 L	22.27 ^b	76.02 ^d	73.62 ^d

Los hidrolizados se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y los cromatogramas obtenidos se muestran en la Fig. 6.12. En ambos hidrolizados, el 90% de los péptidos se encuentran entre los 12 y 1 kDa; sin embargo, aquellos hidrolizados con un contenido de proteína del 20%, contienen péptidos más pequeños (MW<3.5 kDa) que los hidrolizados con un contenido de proteína del 10%.

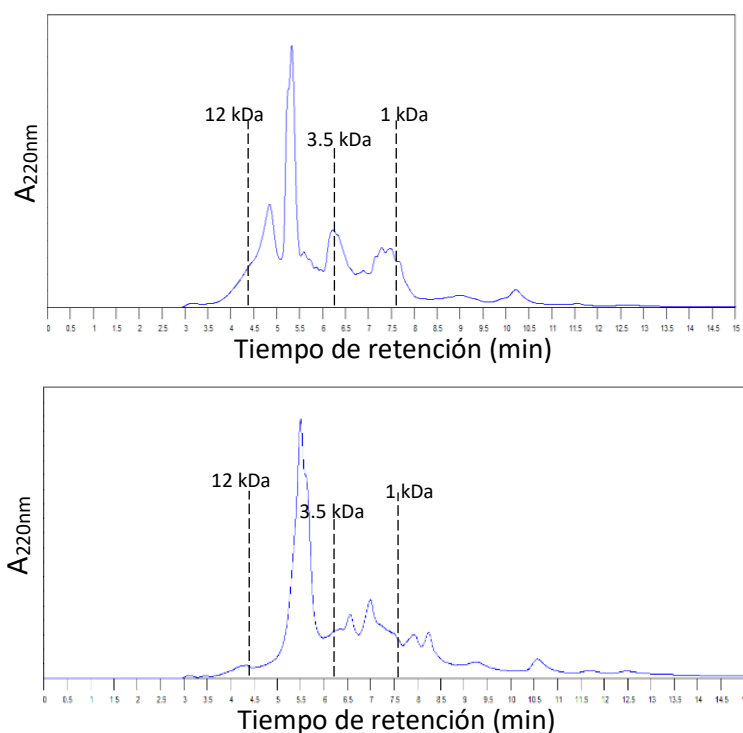


FIGURA 6.12. Cromatogramas de los hidrolizados de proteína de yema de huevo con una concentración de proteína de 10 (a) y 20% (b).

La teoría de Linderstrom-Lang, postula que, basados en la existencia de proteína desplegadas y plegadas durante la hidrólisis enzimática, dos escenarios extremos se pueden presentar: el mecanismo tipo cierre “*zipper*” y el uno por uno “*one by one*”. Cuando las proteínas están totalmente desplegadas, la afinidad de la enzima hacia la proteína intacta es la misma que hacia los péptidos, a lo que se le ha llamado el mecanismo “*zipper*”. Para las proteínas plegadas, la afinidad de la enzima hacia la proteína intacta es muy pequeña en comparación con su afinidad hacia los péptidos intermedios, a lo cual se le ha llamado como el mecanismo “*one by one*”. En las reacciones proteolíticas reales, se encuentran intermedios de estos dos tipos de mecanismos (Adler-Nissen, 1986). Los resultados encontrados en el presente trabajo, señalan que un aumento en la concentración inicial de proteína, conduce a una mayor

tendencia hacia el mecanismo “one by one”, causando así una composición peptídica diferente para cada uno de los hidrolizados.

Estos resultados van acorde con lo encontrado por Butré *et al.* (2012) quienes, durante la hidrólisis enzimática de aislado de proteína de suero, variaron la concentración de proteína de 1 a 30%, encontrando que, la afinidad de la enzima cambiaba al cambiar la concentración del sustrato. Para ello, graficaron la cantidad intacta de β -lactoglobulina, determinada mediante SEC vs el grado de hidrólisis para las diferentes concentraciones de proteína. Observaron que a bajas concentraciones de proteína (1-10%) la cantidad de β -lactoglobulina intacta disminuía a 30% con un DH de 3%. Empleando concentraciones de 20 y 30%, para alcanzar el 30% de β -lactoglobulina intacta, el grado de hidrólisis fue de 4.5%. Dichos resultados indican que, a mayores concentraciones de sustrato, la enzima muestra una actividad ligeramente mayor hacia los fragmentos que hacia la proteína intacta.

6.2.2. FRACCIONAMIENTO DE LOS HIDROLIZADOS BAJO FLUX SOSTENIBLE

Los hidrolizados con concentraciones de proteína de 10 y 20% fueron fraccionados usando cinco membranas, dos de celulosa regenerada (material polimérico que demostró tener el mejor desempeño en el sistema flujo pistón) de 10 y 5 kDa y tres membranas tubulares cerámicas de 50, 10 y 5 kDa.

Antes de llevar a cabo el proceso de fraccionamiento, el flux de agua fue determinado para cada una de las membranas probadas. Los valores de permeabilidad al agua (J_w) obtenidos se muestran en la Tabla 6.6. De aquí cabe resaltar que J_w fue mayor para las membranas cerámicas que para las de celulosa regenerada. Además, no se observó correlación alguna entre el MWCO y el J_w en las membranas cerámicas, lo cual puede deberse a diferencias en la porosidad de dichas membranas. Este fenómeno también fue observado por otros autores (Saidi *et al.*, 2013).

Con el fin de determinar las condiciones hidrodinámicas que permitieran trabajar en flux sostenible, un rango de TMP entre los 25 y 150 kPa fue estudiado para todas las membranas. En la Fig. 6.13, se muestra que hubo una dependencia lineal entre el flux y la TMP en el rango estudiado, lo cual señala que, para todas las membranas probadas, el flux es sostenible bajo las condiciones estudiadas.

TABLA 6.6. Índice de ensuciamiento (IF) y coeficiente de separación (S) de las membranas estudiadas durante la ultrafiltración de hidrolizados obtenidos con dispersiones de proteína de 10 y 20%.

Membrana	Celulosa regenerada		Óxido de titanio (TiO_2)		
	10	5	50	10	5
MWCO (kDa)	10	5	50	10	5
Flux de agua ($kg\ m^{-2}\ h^{-1}\ kPa^{-1}$)	1.18	0.19	3.80	9.46	4.44
IF for [P]=10%	0.26	0	0.07	0.69	0.06
IF for [P]=20%	0	0	0.04	0.25	0
S for [P]=10%	0.80	0.70	0.90	0.83	0.89
S for [P]=20%	0.90	0.77	0.85	0.86	0.89

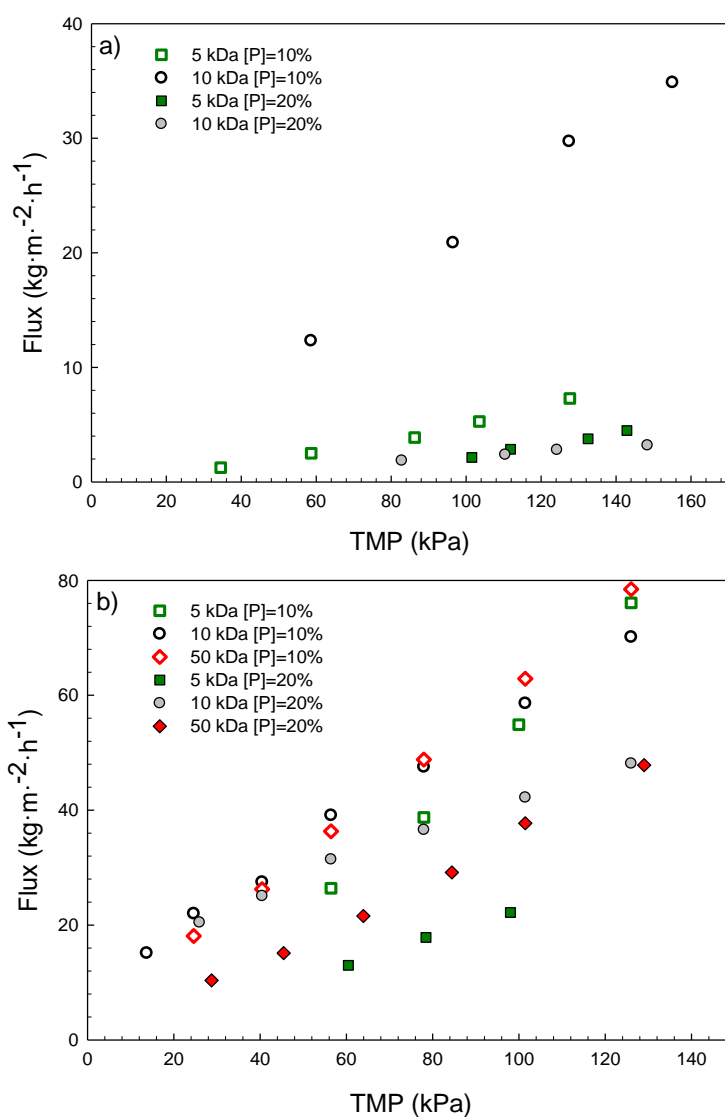


FIGURA 6.13. Dependencia del flux con la presión transmembrana para las membranas de celulosa regenerada (a) y cerámicas (b).

Posteriormente, los hidrolizados fueron fraccionados bajo las condiciones hidrodinámicas que presentaron el mayor flux. Los resultados de la Fig. 6.14 confirman que las membranas de celulosa regenerada tuvieron un desempeño mucho menor que las membranas cerámicas con ambos hidrolizados (10 y 20%). Las diferencias obtenidas pueden ser atribuidas a diferencias en la morfología de las membranas. Por esta razón, las membranas no pueden seleccionarse basándose sólo en las especificaciones suministradas por el proveedor (por ejemplo, MWCO), algunos experimentos deben ser llevados a cabo para seleccionar la mejor. Para todas las membranas probadas, un incremento en el contenido de proteína conllevó a una disminución del flux, confirmando el mayor efecto de la polarización por concentración.

Se observó una fuerte disminución en el flux cuando se procesaron los hidrolizados de proteína al 10% con la membrana de celulosa regenerada de 10 kDa (Fig. 6.14 a). Cuando se emplearon las membranas cerámicas para ultrafiltrar este mismo hidrolizado, la membrana de 5 kDa mostró un mejor desempeño que la membrana de 10 kDa (Fig. 6.14 b) a pesar de que esta última, tuvo un flux de agua mayor (Tabla 6.6). En la Tabla 6.6 se puede observar también que un mayor *IF* fue obtenido con las membranas de 10 kDa probadas. Estos resultados sugieren que los hidrolizados contienen algunos péptidos que son retenidos dentro de la estructura de la membrana de 10 kDa, sugiriendo que este tamaño de poro es inadecuado para el proceso de fraccionamiento.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Chabeaud *et al.* (2009 a), quienes durante la UF de hidrolizados de pescado carbonero y empleando membranas de polisulfona y polietersulfona con diferentes MWCO (4,6,8 y 9 kDa), cuantificaron la adsorción de péptidos en la membrana (en términos de reducción del flux de agua), y lo relacionaron con el MWCO. Obtuvieron que la adsorción incrementaba a mayor MWCO, siendo la membrana de 9 kDa, la que tuvo la mayor reducción en el flux de agua determinado después del proceso de UF.

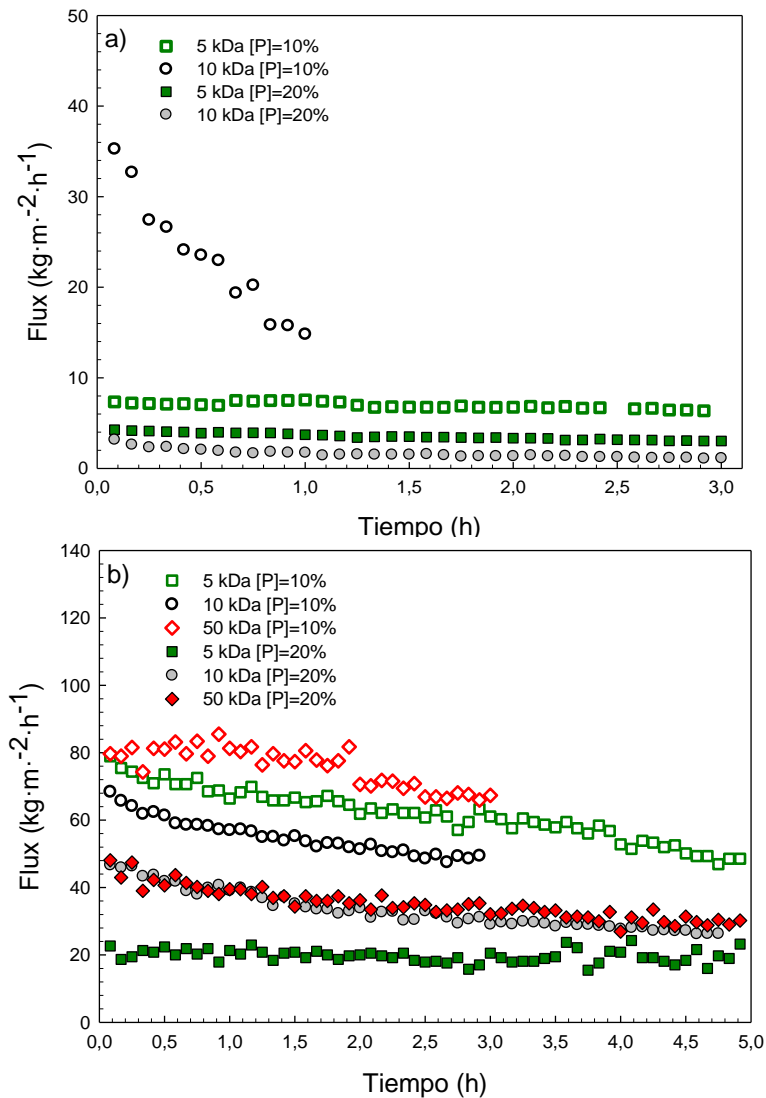


FIGURA 6.14. Flux durante la ultrafiltración de hidrolizados con un contenido de proteína del 10 (símbolos blancos) y 20% (símbolos rellenos), usando membranas de celulosa regenerada (a) y cerámicas (b).

Debido al ensuciamiento observado con la membrana de 10 kDa en este trabajo, se seleccionó una membrana cerámica con un MWCO superior (50 kDa) para llevar a cabo el fraccionamiento de los hidrolizados. En la Fig. 6.14 b se observa que para un hidrolizado con un contenido de proteína del 10%, la membrana de 50 kDa mostró un flux superior que la de 5 kDa. Cuando el hidrolizado de 20% fue fraccionado, la membrana de 50 y 5 kDa presentaron comportamientos similares. Cabe resaltar que la membrana de 50 kDa tuvo un *IF* cercano a cero (Tabla 6.6), indicando, por lo tanto, que no desarrolló ensuciamiento durante el proceso de UF. El trabajar con un diámetro de poro mayor (50 kDa), posiblemente permitió el paso de los péptidos de peso molecular >5kDa a través de los poros de la membrana, evitando que estos quedaran retenidos dentro de su estructura.

En la Tabla 6.7 se puede observar el contenido de proteína soluble antes y después del tratamiento térmico en los hidrolizados y los permeados obtenidos con las diferentes membranas. Se puede observar que antes del fraccionamiento, el hidrolizado producido con una dispersión de proteína del 10%, tuvo un contenido de proteína soluble cerca del 95% y dicha concentración disminuyó ligeramente después del tratamiento térmico. El incrementar el contenido de proteína inicial a un 20% durante la hidrólisis enzimática, conllevó a un hidrolizado con un menor contenido de proteína soluble y estable al tratamiento térmico, con valores de 76 y 73%, respectivamente. Los permeados en todos los casos, fueron totalmente solubles y estables térmicamente, por lo que se puede concluir que todas las membranas remueven de manera eficiente la proteína insoluble presente en los hidrolizados. Todas las membranas mostraron un coeficiente de separación superior a 0.8, excepto la membrana de 5 kDa de RC (Tabla 6.7). Esto significa que más del 80% de la proteína permeó a través de las membranas probadas.

TABLA 6.7. Contenido de proteína soluble antes (%PS) y después del tratamiento térmico (%EPS), para los hidrolizados y los permeados obtenidos después de la UF con las diferentes membranas estudiadas.

Concentración inicial de proteína (% w/w)	MWCO	Membrana/ Muestra	%PS	%EPS
10	--	Hidrolizado	94.79 ± 0.203	93.20 ± 0.2
	50 kDa	TiO ₂	98.50 ± 1.5	98.57 ± 1.43
	10 kDa	RC	99.10 ± 0.9	100 ± 0
		TiO ₂	97.05 ± 2.95	100 ± 0
5 kDa	RC	97.71 ± 2.28	95.93 ± 3.07	
	TiO ₂	100 ± 0	97.50 ± 2.5	
20	--	Hidrolizado	76.02 ± 3.01	73.62 ± 2.19
	50 kDa	TiO ₂	99.09 ± 0.91	98.15 ± 1.85
	10 kDa	RC	98.36 ± 1.64	98.36 ± 1.64
		TiO ₂	97.27 ± 2.73	98.30 ± 1.7
5 kDa	RC	100 ± 0	98.27 ± 1.73	
	TiO ₂	97.5 ± 2.5	98.11 ± 1.89	

6.2.3. DIAFILTRACIÓN DISCONTINÚA (DD)

Para incrementar la recuperación de los péptidos solubles presente en los hidrolizados, se llevó a cabo una etapa de diafiltración con la membrana de 50 kDa, la cual evitó el ensuciamiento durante la UF y produjo el mejor rendimiento en términos de flux. La diafiltración se llevó a cabo cuando la mitad del volumen inicial fue recuperado en el lado del permeado. En la Fig. 6.15 se muestra el flux durante el proceso de UF/DD y el rendimiento de recuperación de proteína total y de proteína soluble, en cada una de las etapas para los hidrolizados fraccionados.

De esta figura se puede observar que la máxima recuperación de proteína soluble obtenida después de la UF fue de 42.4% para ambos hidrolizados (10 y 20%). También se puede apreciar que hubo una mayor caída del flux durante la concentración de los hidrolizados conteniendo 20 % de proteína (de 48 a 22 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) en comparación con los hidrolizados con contenido de proteína del 10% (79.66 a 65.96 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Durante la diafiltración, con $N_D=2$, el flux aumentó a 133.55 y 60.85 para los hidrolizados con contenido de proteína de 10 y 20% respectivamente. Estos resultados confirman que al operar bajo condiciones de flux sostenible se evitó el ensuciamiento en la superficie de la membrana y la polarización por concentración fue reversible durante la DD.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son superiores a los reportados por Saidi *et al.* (2014) durante la UF/DD de hidrolizados de sub-productos de atún, con una concentración de proteína del 7% y empleando una membrana de 8 kDa. Estos autores reportaron al final de la UF, un flux de 10 $\text{L h}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ y cuando la etapa de DD fue llevada a cabo, el flux se mantuvo en 9 $\text{L h}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. También se trabajó en DC y reportaron un flux de 22 $\text{L h}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. La diferencia observada en los valores de flux obtenidos en ambos modos de operación, fue atribuida a que el ensuciamiento presentado durante la etapa de concentración previa a la DD fue irreversible.

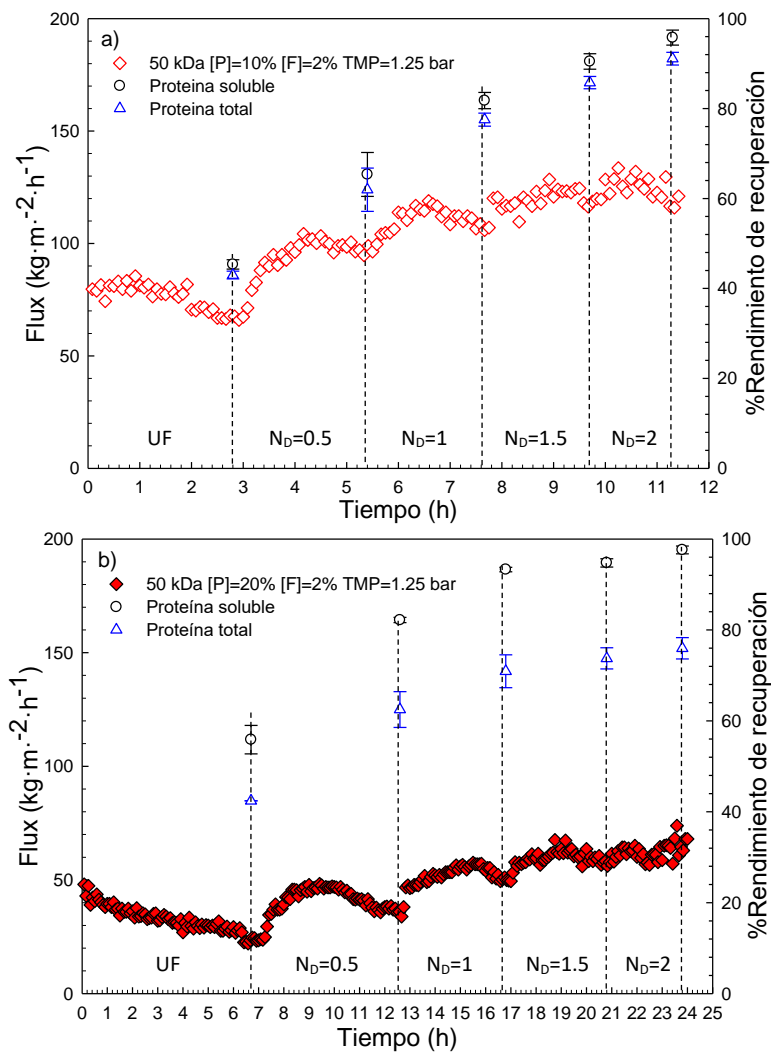


FIGURA 31. Rendimiento de recuperación de proteína total (Δ), proteína soluble (\circ) y perfiles de flux (\diamond) obtenidos durante el fraccionamiento de los hidrolizados con concentraciones de proteína del 10% (a) y 20%(b) durante el proceso de ultrafiltración/diafiltración

Los resultados de la Fig. 6.15, también muestran que la máxima recuperación de la proteína soluble (96%) para ambos hidrolizados, se obtiene con 2 dia-volumenes. Sin embargo, para los hidrolizados con un contenido de proteína del 20%, el 91% de la proteína soluble fue recuperada con 1 dia-volumen, mientras que, un $N_D=1.5$ fue necesario para recuperar el 90% de la proteína soluble durante la diafiltración de los hidrolizados con un contenido de proteico del 10%. Esto se debe a las diferencias en el contenido de proteína soluble presente en los dos hidrolizados al final de la hidrólisis (Tabla 6.8), siendo los hidrolizados con 10% de proteína, los que tienen mayor concentración de péptidos solubles.

Los porcentajes de recuperación de proteína obtenidos en el presente trabajo son superiores a los reportados por Saidi *et al.* (2013) durante la UF/DF de hidrolizados de proteína de atún con un contenido inicial del 7%. En la etapa de UF, dichos autores recuperaron menos del 20% de proteína total en el permeado final y no estimaron el número de dia-volumenes que garantizara el mayor porcentaje de recuperación en el permeado final, obteniendo entonces un porcentaje de recuperación de proteína total después del proceso de DD de aproximadamente un 55%, empleando un N_D de 0.6.

El contenido de proteína soluble de los hidrolizados y las fracciones fue evaluado antes y después de proceso de UF/DF con la membrana de 50 kDa. El contenido de proteína soluble también fue cuantificado después del tratamiento térmico a 121 °C durante 20 minutos. Los valores obtenidos después del proceso de UF cuando se recuperó el 90% de la proteína soluble total durante la DF en el lado del permeado, se muestran en la Tabla 6.8.

En la Tabla 6.8, se puede observar como a lo largo del proceso de DF de ambos hidrolizados, el contenido de proteína soluble en el retenido va disminuyendo, alcanzando una concentración del 60.9 y 21.76% al final de la diafiltración de los hidrolizados con un contenido de proteína del 10 y 20% respectivamente. Cabe resaltar que, el aparente alto contenido de proteína soluble en el retenido final al fraccionar el hidrolizado del 10% (cerca del 60%), se debe al poco contenido de proteína insoluble presente del hidrolizado inicial. Además de lo anterior, estos resultados confirman que los péptidos insolubles fueron removidos durante el proceso de UF/DF ya que los permeados obtenidos después del proceso de DF, fueron 100% solubles y estables al proceso térmico.

El rango de peso molecular de los péptidos presentes en los hidrolizados y las fracciones obtenidas después del proceso de UF y al final del proceso de DF, fueron determinados por cromatografía de exclusión por tamaño. En las Figs. 6.16 y 6.17 se muestran los cromatogramas de los retenidos a lo largo del proceso de UF/DF, para los hidrolizados con un contenido de proteína del 10 y 20% respectivamente, hasta lograr una recuperación del 90% de la proteína soluble total en el permeado.

TABLA 6.8 Proteína soluble antes (%*PS*) y después del tratamiento térmico (%*EPS*) en los hidrolizados y las fracciones obtenidas del proceso UF/DF usando una membrana de 50 kDa

Concentración de proteína	Muestra	% <i>PS</i>	% <i>EPS</i>
10	Hidrolizado	94.79 ± 0.20	93.20 ± 0.20
	UF-Retenido	87.40 ± 1	86.20 ± 0.16
	UF-Permeado	98.50 ± 1.50	98.57 ± 1.43
	Retenido de DF/N _D =0.5	75.58 ± 3.58	75.85 ± 3.60
	Permeado de DF/N _D =0.5	97.92 ± 2.09	97.92 ± 2.09
	Retenido de DF/N _D =1	65.85 ± 4.74	65.68 ± 0.98
	Permeado de DF/N _D =1	100 ± 0	97.62 ± 2.38
	Retenido de DF/N _D =1.5	60.90 ± 0.63	62.58 ± 1.50
Permeado de DF/N _D =1.5	97.05 ± 2.95	97.64 ± 2.35	
20	Hidrolizado	76.02 ± 3.01	73.62 ± 2.19
	UF-Retenido	61.78 ± 2.11	63.62 ± 2.51
	UF-Permeado	99.09 ± 0.91	98.15 ± 1.85
	Retenido de DF/N _D =0.5	40.76 ± 1.74	43.23 ± 1.77
	Permeado de DF/N _D =0.5	100 ± 0	98.65 ± 1.35
	Retenido de DF/N _D =1	21.76 ± 1.76	24.60 ± 1.80
Permeado de DF/N _D =1	98.44 ± 1.56	98.21 ± 1.78	

En la Figura 6.16, se puede ver como a lo largo del proceso de DF del hidrolizado con una concentración de proteína del 10%, el contenido de péptidos en el retenido con un peso molecular mayor de 12 kDa aumenta, mientras que aquellos por debajo de los 3.5 kDa van siendo removidos gracias a la etapa de DF. En cuanto al hidrolizado con un contenido de proteína del 20%, la cantidad de péptidos con un peso molecular mayor a 12 kDa aumenta ligeramente a lo largo del proceso de DF.

En la Tabla 6.9 se muestra la distribución de peso molecular de los hidrolizados con un contenido de proteína del 10 y 20%, así como la composición peptídica de sus respectivos retenidos y permeados después del proceso de DF. Estos resultados sugieren que después del proceso de diafiltración de los hidrolizados con un contenido de proteína del 10%, con un ND de 1.5, cerca del 27% de los péptidos con un peso molecular mayor a 12 kDa quedaron en el retenido, mientras que la concentración de péptidos con un peso molecular entre 3.5 y 1 kDa disminuyó de 27.25 a

aproximadamente el 10%. Por lo tanto, el permeado al final de la DF fue enriquecido con péptidos con un peso molecular menor a 12 kDa, y una composición del 65.26% para los péptidos con un peso molecular entre 12 y 3.5 kDa y un porcentaje de 25.08% para los péptidos con MW entre 3.5 y 1 kDa.

Estos resultados remarcan la importancia de la diafiltración para incrementar la recuperación de los péptidos pequeños. Por otro lado, después del proceso de UF/DF para el hidrolizado con un contenido de proteína del 20%, la concentración de péptidos con un peso molecular mayor a 12 kDa incrementó de 2.77 a 8.43% en el retenido. El permeado al final de la DF tuvo una composición del 46.39% de péptidos con un peso molecular entre 12 y 3.5 kDa y un 39.61% de péptidos con un peso molecular entre los 3.5 y 1 kDa. Las diferencias entre las fracciones obtenidas con los hidrolizados se deben principalmente a la composición inicial de estos obtenida a partir de las dos concentraciones usadas durante la reacción de hidrólisis.

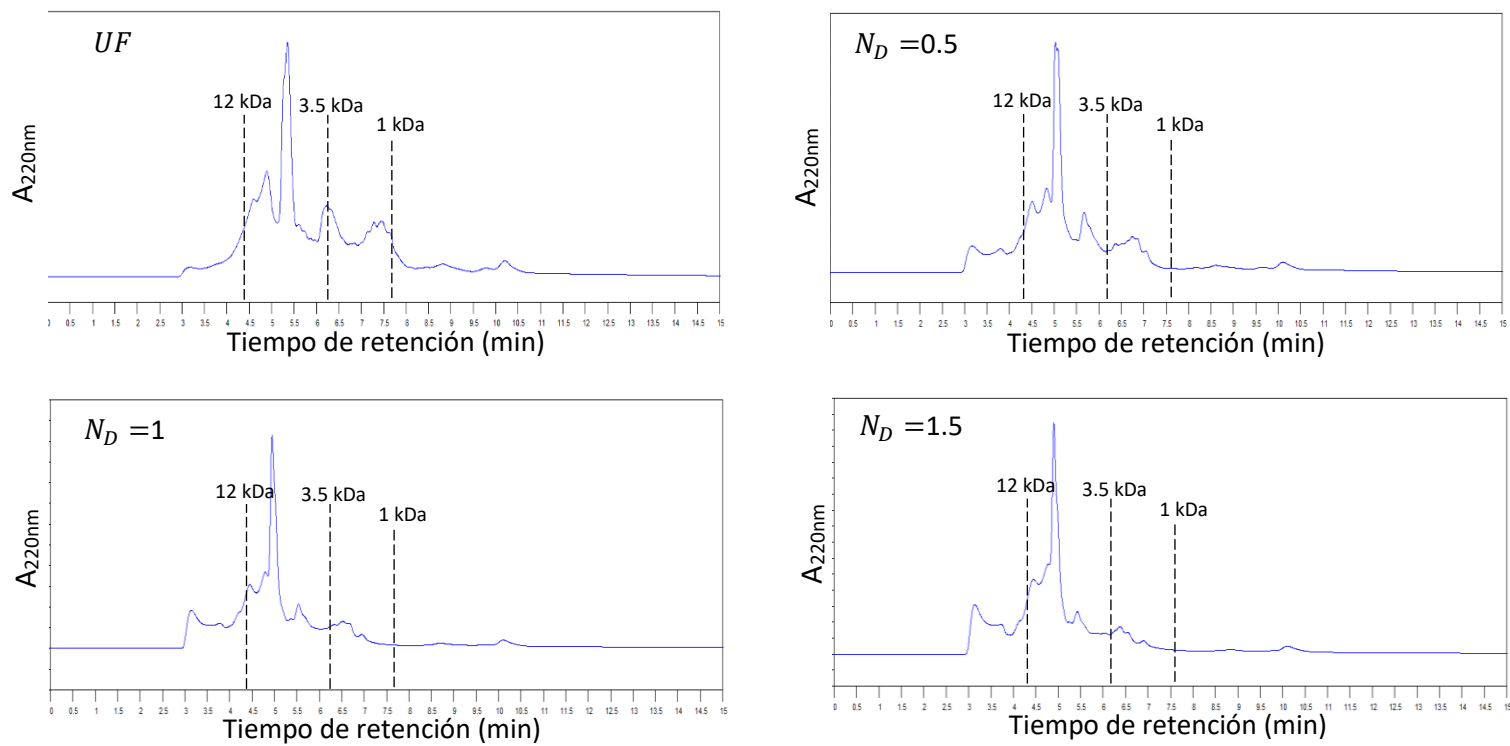


FIGURA 32. Cromatogramas de los retenidos obtenidos a lo largo del proceso de UF/DF de los hidrolizados con un contenido de proteína del 10%.

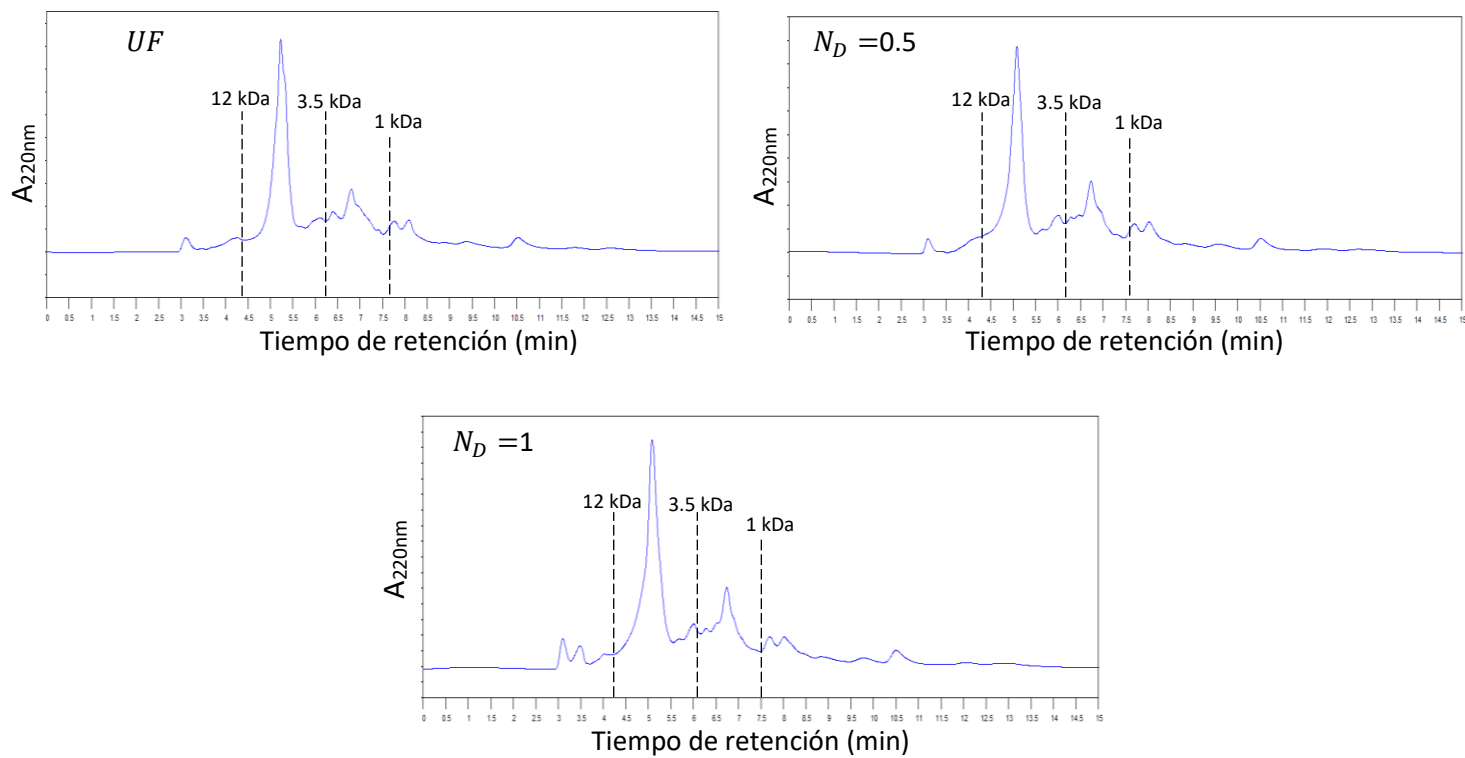


FIGURA 33. Cromatogramas de los retenidos obtenidos a lo largo del proceso de UF/DF de los hidrolizados con un contenido de proteína del 20%.

TABLA 4 Distribución de tamaño (%) de la alimentación y las fracciones obtenidas después del proceso de UF/DF.

Fracción peptídica (kDa)	UF/DF de los hidrolizados con 10% de proteína					UF/DF de los hidrolizados con 20% de proteína				
	Alimentación (%)	UF retenido (%)	UF permeado (%)	$N_D = 1.5$ retenido (%)	$N_D = 1.5$ permeado (%)	Alimentación (%)	UF retenido (%)	UF permeado (%)	$N_D = 1$ retenido (%)	$N_D = 1$ permeado (%)
> 12	7.71	9.03	3.24	27.54	2.45	2.77	5.59	1.80	8.43	2.05
12-3.5	61.19	57.15	57.05	57.34	65.26	48.28	49.98	47.27	49.95	46.39
3.5-1	26.33	27.25	32.14	10.49	25.08	38.07	33.90	40.19	30.64	39.61
< 1	4.77	6.57	7.57	4.63	7.22	10.87	10.53	10.73	10.97	11.94

6.2.4. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL HIDROLIZADO Y SUS FRACCIONES

Las propiedades antioxidantes de los hidrolizados fueron evaluadas en términos de inhibición del catión $ABTS^+$. Cabe mencionar, que las muestras de los hidrolizados, fueron liofilizadas y posteriormente reconstituidas, a diferentes concentraciones de proteína. En la Fig. 6.18, se muestra que la inhibición al radical $ABTS^+$, aumentó al incrementar la cantidad de proteína de 0.0012 a 0.04%. También se puede observar, que la máxima inhibición para los hidrolizados obtenidos con una dispersión de proteína del 10 y 20% fue del 62 y 64% respectivamente, al emplear una concentración de proteína del 0.04%. Sakanaka & Tachibana (2006) también reportaron que la actividad antioxidante de los hidrolizados de proteína de yema de huevo obtenidos en su trabajo, mostraron una dependencia con la concentración de proteína, observando que el porcentaje de inhibición del catión DPPH, aumentó del 15% al 83.15%, al incrementar la concentración de proteína de 0.0625 a 0.5%. Las diferencias en el porcentaje de inhibición obtenidas en el presente trabajo, pueden estar relacionadas con los péptidos liberados durante la hidrólisis enzimática.

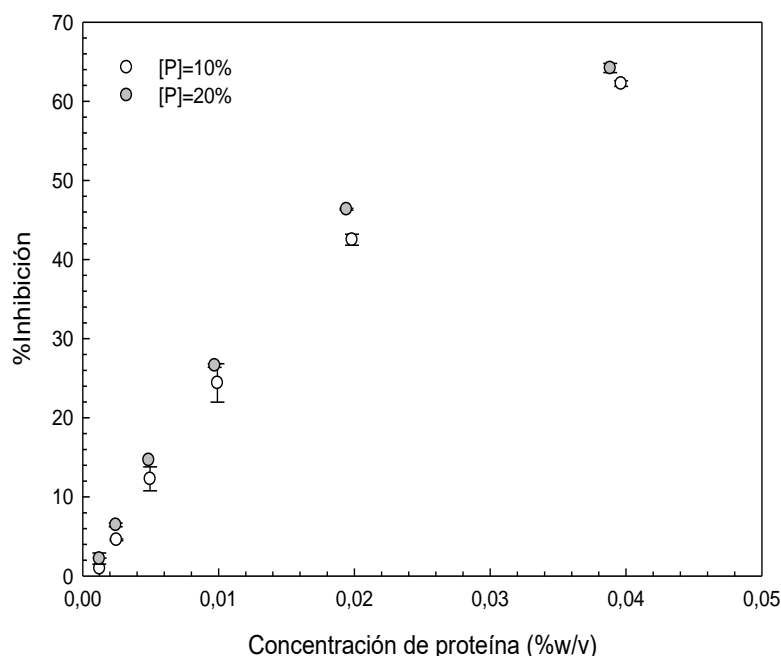


FIGURA 34 Efecto de la concentración de proteína en la reducción del radical $ABTS^+$. Hidrolizados obtenidos de una dispersión de proteína de yema de huevo del 10 (○) y 20% (●).

Las propiedades antioxidantes de las fracciones obtenidas durante la UF/DF se muestran en la Tabla 6.10. Estas fueron evaluadas empleando una concentración de proteína del 0.04%, donde ambos hidrolizados exhibieron su máxima actividad antioxidante. Se observó un incremento en la inhibición del catión en los permeados obtenidos a partir de ambos hidrolizados (10 y 20%). Dicho porcentaje de inhibición permaneció constante a lo largo del proceso de DF. El incremento en la inhibición del catión después del fraccionamiento, puede ser atribuido al incremento de los péptidos con un peso molecular pequeño (<3.5 kDa) y a la remoción de la proteína no soluble después del proceso de UF. Se ha sugerido que la actividad antioxidante de los péptidos depende de su secuencia de aminoácidos y de su peso molecular (Park *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014). Park *et al.* (2001), estudió la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas durante la UF de hidrolizados de proteína de yema de huevo libre de lecitina, empleando tres membranas de 10, 5 y 1 kDa, encontrando que las fracciones con MW<5 kDa, exhibieron la mayor actividad.

TABLA 5 Porcentaje de inhibición de los permeados obtenidos durante el proceso de UF/DF con la membrana de 50 kDa.

Proteína en los hidrolizados [%]	Etapas	%Inhibición del catión ABTS ⁺ de los permeados (%)
10	UF	66.34 ± 0.90
	$N_D=0.5$	67.70 ± 0.34
	$N_D=1$	68.05 ± 0.17
	$N_D=1.5$	67.79 ± 0.42
20	UF	70.27 ± 0.24
	$N_D=0.5$	70.17 ± 0.93
	$N_D=1$	70.93 ± 0.68

6.2.5. ANALISIS TEÓRICO DEL PROCESO DE DIAFILTRACION EMPLEANDO LOS DIAGRAMAS DE PURIFICACIÓN Y RENDIMIENTO

Para la determinación del número de dia-volumenes teóricos, que garanticen la mejor relación entre el rendimiento de recuperación de los péptidos menores a 12 kDa y su purificación durante la DC, se hizo uso de los diagramas de P-Y, los cuales son dos familias de curvas definidas por las ecuaciones 23 y 24, que están en función de parámetros del proceso: el número de dia-volumenes, los coeficientes de separación, la selectividad y el rendimiento. En la Fig. 6.19 se muestran los factores de purificación obtenidos para los hidrolizados con concentraciones de 10 y 20%, contra el rendimiento predicho para la diafiltración, empleando la membrana de 50 kDa.

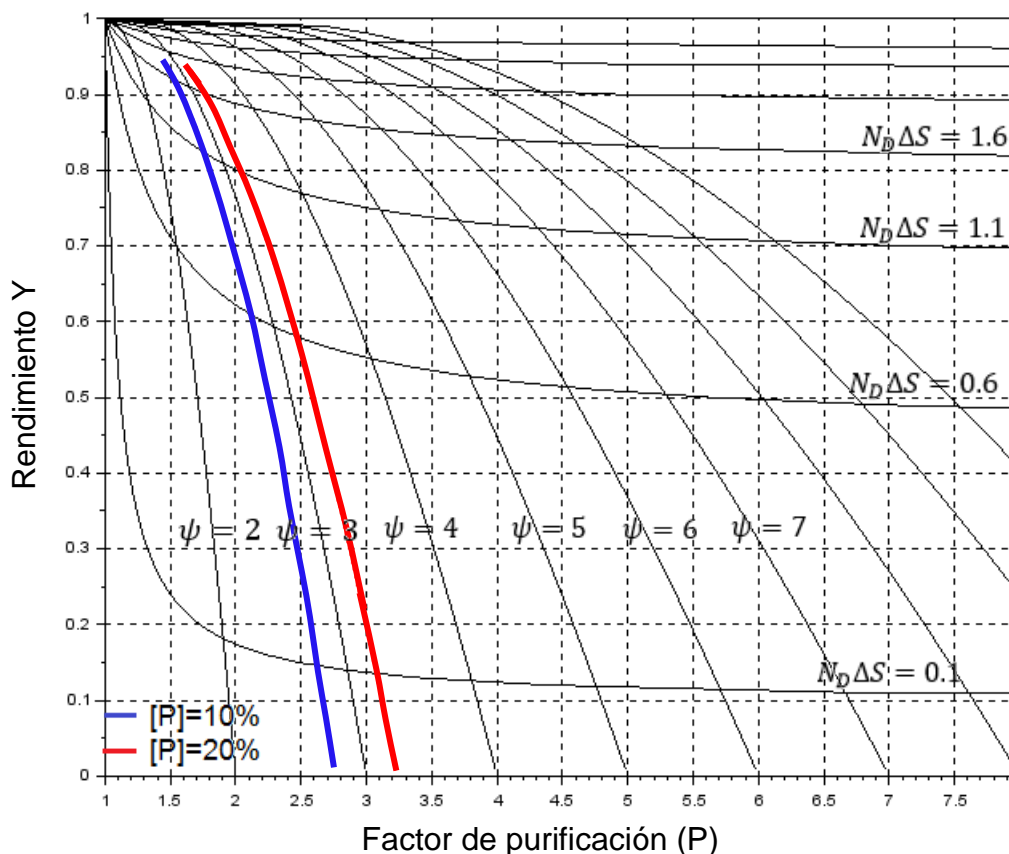


FIGURA 35. Diagrama de rendimiento vs factor de purificación para los hidrolizados con contenidos de proteína de un 10 y 20% empleando una membrana de 50 kDa.

Como se puede observar en la Fig. 6.19, el rendimiento y el factor de purificación, durante el curso de la filtración, son rastreados moviéndose desde el punto inicial del producto a lo largo de una curva de selectividad constante. Estos valores de selectividad fueron

determinados a partir de los datos obtenidos después de la UF, bajo las condiciones de operación seleccionadas.

El rendimiento del proceso, es aquel valor obtenido después de un número de N_D durante la UF y fue determinado por la intersección entre la curva de selectividad constante con la curva de $N_D \Delta S$ adecuada. En la Fig. 6.19, se puede observar que se obtiene un rendimiento superior al 90%, cuando la curva de selectividad intercepta con la curva $N_D \Delta S$ igual a 1.6, lo cual correspondería a un dia-volumen de 2.5 y 2.3, para los hidrolizados con un contenido de proteína de 10 y 20% respectivamente. En la sección anterior, al emplear la DD, se obtuvieron rendimientos de recuperación superiores al 90%, empleando $N_D=1.5$ y 1, durante la UF de hidrolizados con un contenido de proteína del 10 y 20%. Se puede observar que, para alcanzar rendimientos similares a los obtenidos en la DD, es necesario una mayor cantidad de agua en la DC.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Saidi *et al.* (2013), quienes durante la UF de hidrolizados de proteína de atún, compararon los dos modos de DF, encontrando que para recuperar aproximadamente el 55% de la proteína total, un dia-volumen de 1.4 y 0.6 fueron necesarios en la DC y DD respectivamente. Cabe resaltar que, además del mayor manejo de agua durante el fraccionamiento al emplear la DC, se obtiene un permeado y un retenido más diluidos, lo cual se debe tener bajo consideración para el posterior manejo y disposición de las fracciones obtenidas. Aunque el flux durante la DD debería ser menor que durante la DC, esto puede que no compense el procesamiento extra que se requiere durante esta última. Por lo anterior, se recomienda usar la DC durante el fraccionamiento de una alimentación con un contenido de solutos tan alto, que no permite llevar a cabo de manera eficaz una UF o DD (Cheryan, 1998).

6.3. COMPARACIÓN DE COSTOS ENTRE LA PRODUCCIÓN DE LOS DIFERENTES HIDROLIZADOS.

Con el fin de determinar cuál es el contenido de proteína inicial (10 ó 20%) que permite la obtención de una fracción peptídica soluble y estable térmicamente más costea-ble, se hizo un análisis del costo de producción parcial. Para esto, se determinó el precio de producción del hidrolizado tomando como base únicamente el costo de la enzima y el

costo del fraccionamiento de acuerdo a la energía consumida durante el proceso de UF/DF.

En la Figura 6.20, se puede observar el esquema general del proceso (hidrólisis enzimática + UF/DF) empleando concentraciones de proteína del 10 y 20%. El emplear una concentración de proteína del 10%, trae como ventaja el uso de una menor cantidad de enzima en el proceso de hidrólisis y un tiempo de UF/DF menor: 7.4 horas menos, en comparación con el fraccionamiento del hidrolizado con un contenido de proteína del 20%. Por otro lado, el emplear una concentración de proteína del 20%, permite obtener una mayor cantidad de proteína soluble en el permeado final, además de un menor uso de agua en el proceso de diafiltración.

Sabiendo que 25 kg de Alcalasa 2.4 L grado alimenticio tiene un costo de 1316.6 \$USD y una densidad de 1.25 g·mL⁻¹, para la producción de 15 kg de hidrolizado con un contenido de proteína del 10%, la cantidad de enzima usada tendrían un costo (C_E) de:

$$C_E = 119 \text{ mL de enzima} * \frac{1.25 \text{ g}}{1 \text{ mL}} * \frac{1316.6 \text{ $USD}}{25000 \text{ g}} * \frac{20.11 \text{ $MXN}}{1 \text{ $USD}} = 157.54 \text{ $MXN}$$

En cuanto a la obtención de 15 kg de un hidrolizado al 20%, se emplearían 238 mL de enzima, los cuales tendrían un costo de 315.08 \$MXN.

Para la determinación del consumo de energía durante el fraccionamiento, se midió el amperaje consumido por la bomba de alimentación y el baño termostático usado para el intercambiador de calor. Se encontró que el baño termostático consumía aproximadamente 7.27 A y la bomba 8.6 A, lo que corresponde a una potencia de 1.6 y 1.9 kW respectivamente. Sabiendo que el precio del kWh es 1.53 \$MXN en tarifa DIST (demanda industrial en sub-transmisión), se tiene que el costo del consumo de energía (E_C) sería:

$$E_C = (P_B + P_I) * t_{UF/DF} * p_{kW}$$

Donde P_B es la potencia de la bomba, P_I es la potencia del intercambiador, $t_{UF/DF}$ es el tiempo de operación del proceso de UF/DF y p_{kW} es el precio del kWh. Para un proceso de fraccionamiento con un contenido del 10%, el E_C sería:

$$E_C = (1.9 + 1.6) * 9.7 * 1.53 = 51.94 \text{ $MXN}$$

Para un proceso de UF/DF con un contenido de proteína del 20%, el E_C sería:

$$E_C = (1.9 + 1.6) * 17.1 * 1.53 = 91.57 \text{ \$MXN}$$

Entonces, el costo total de producción (C_T), por kg de proteína soluble obtenido al final del proceso de fraccionamiento sería:

$$C_T = \frac{C_E + E_C}{w_p}$$

Donde w_p es la cantidad de proteína soluble obtenida en el permeado al final del proceso de UF/DF en kg, Para un hidrolizado con un contenido del 10% de proteína, el costo total de producción es:

$$C_T = \frac{157.54 + 51.94}{1.13} = 185.38 \frac{\text{\$MXN}}{\text{kg}}$$

Para un hidrolizado con un contenido de proteína del 20%, el C_T sería:

$$C_T = \frac{315.08 + 91.57}{1.5} = 271.1 \frac{\text{\$MXN}}{\text{kg}}$$

Como se puede observar en los resultados anteriores, el aumentar el contenido de proteína inicial, conlleva a que el precio del kg de proteína soluble obtenido, aumente cerca del 46%. Por lo tanto, sólo basándose en los costos parciales obtenidos en el presente trabajo (hasta el proceso de fraccionamiento), es más recomendable trabajar con un contenido de proteína inicial del 10%. Cabe resaltar que, el objetivo final es un hidrolizado en polvo, por lo que hay que tener en cuenta los costos generados durante la etapa de secado que se llevaría posteriormente ya que, la fracción final obtenida con el hidrolizado del 10% (la cual presentó el menor costo hasta ahora) se encuentra más diluida (Fig. 6.20).

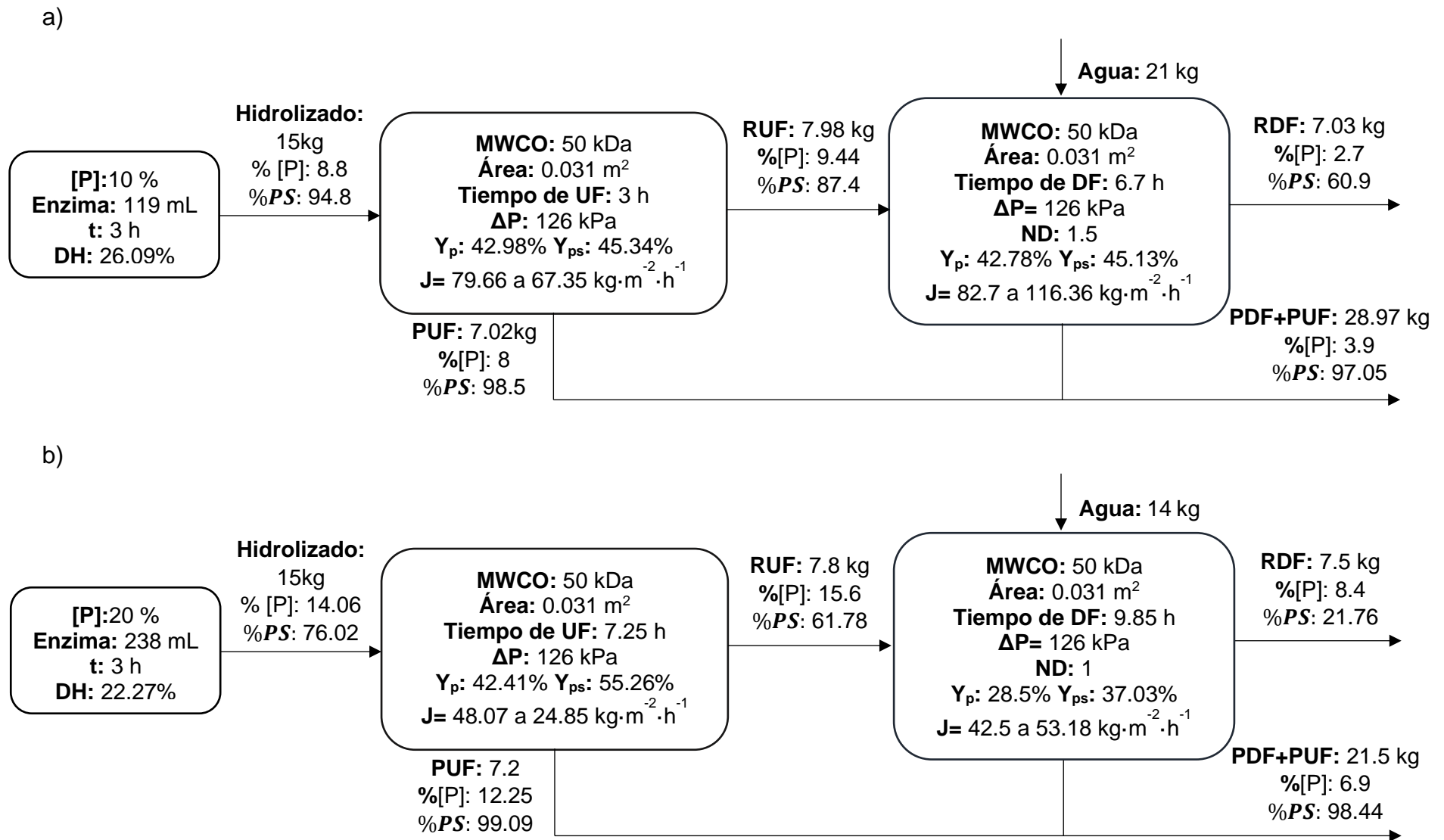


FIGURA 36. Esquema de producción y fraccionamiento de hidrolizados de proteína de yema de huevo con una concentración de inicial del 10 (a) y 20% (b).

CONCLUSIONES

- Al incrementar la concentración de proteína del 10 a 20% durante la hidrólisis enzimática, se obtuvo un menor DH, pero se formaron péptidos más pequeños, lo que sugiere que un aumento en la concentración de proteína conduce a una mayor tendencia hacia el mecanismo “*one-by-one*”.
- De las tres membranas poliméricas estudiadas (RC, PES y TCA) en el sistema flujo pistón, la membrana de RC mostró el mayor flux y el menor ensuciamiento; esto se debió posiblemente al mayor carácter hidrofílico de dicho material.
- La concentración de grasa afectó el rendimiento de la UF durante el fraccionamiento, cuando se trabajó a una concentración de proteína del 10%. Al fraccionar los hidrolizados con un contenido de proteína del 20%, la presencia de grasa afectó no tuvo un efecto significativo en el desempeño del proceso.
- Se establecieron condiciones para mantener el flux sostenible durante el fraccionamiento, con todas las membranas probadas en el proceso de UF tangencial; sin embargo, las membranas cerámicas tuvieron un rendimiento superior (hasta un 93%) a las membranas de RC. Esto se atribuyó a diferencias en las propiedades estructurales de las membranas.
- La membrana de 50 kDa no mostró ensuciamiento y tuvo el mejor desempeño en términos de flux. Durante el proceso de diafiltración, el 90% de la proteína soluble fue recuperada con 1 día-volumen para los hidrolizados con un contenido de proteína del 20% y un $N_D=1.5$ para los hidrolizados con un contenido proteico del 20%.
- En todos los casos, los permeados obtenidos fueron solubles, estables térmicamente y presentaron actividad antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Estados Unidos: Elsevier Applied Science Publishers.

Alashi, A.M., Blanchard, C.L., Mailer, R.J., Agboola, S.O., Mawson, A.J., He, R., Girgih, A. & Aluko, R. 2014. Antioxidant properties of Australian Canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 146, 500–506.

Bacchin, P., Aimar, P. & Field, R. W. 2006. Critical and Sustainable Fluxes: theory, experiments and applications. *Journal of Membrane Science*, 281(1-2), 42-69.

Battaner Arias, E. 2012. *Biomoléculas: una introducción estructural a la bioquímica*. 1ra edición. España: Ediciones Universidad de Salamanca.

Benhabiles, M., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., Goosen, M. & Nameri, N. 2012. Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Materials Science and Engineering C*, 32, 922-928.

Benítez, R., Ibarz, A. & Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42, 227-237.

Bourseau, P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain, M., Massé, A., Guérard, F., Chabeaud, A., Fouchereau, M., Le Gal, Y., Ravallec, R., Bergé, J., Picot, L., Piot, J., Batista, I., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G. & Johansson, I. 2009. Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. *Desalination*, 243, 303-320.

Brito de la fuente, E., Choplin, L., & Tanguy, P. 1997. Mixing with helical ribbon impellers: effect of highly shear thinning behaviour and impeller geometry. *Chemical Engineering Research and Design*, 75, 45-52.

Butré, C., Wierenga, P., & Gruppen, H. 2012. Effects of ionic strength on the enzymatic hydrolysis of diluted and concentrated whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5644-5651.

Carreau, P. & Patterson, I. 1976. Mixing of viscoelastic fluids with helical ribbon agitators I- Mixing time and flow patterns. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 54, 135-142.

- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., & Marc, I. 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*, 42, 1419–1428.
- Chabeaud, A., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P. & Guérard, F. 2009 a. Fractionation by ultrafiltration of a saithe protein hydrolysate (*Pollachius Virens*): Effect of material and molecular weight cut-off on the membrane performances. *Journal of Food Engineering*, 91, 408-414.
- Chabeaud, A., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P., Chaplain, M. & Guerard, F. 2009 b. Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Separation and Purification Technology*, 66, 463–471.
- Cheryan, M. 1998. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Segunda edición. Estados Unidos: CRC Press.
- Chi, C., Wang, B., Wang, Y., Zhang, B. & Deng, S. 2015. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of Functional Foods*, 12, 1-10.
- Chisti, Y. 2007. Principles of membrane separation processes. In *Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook*. Editorial G. Subramanian.
- Das, R., Bhattacharjee C., & Ghosh S. 2009. Effects of operating parameters and nature of fouling behavior in ultrafiltration of sesame protein hydrolysate. *Desalination*, 237, 268–276.
- Delaplace, G., Leuliet, J. & Relandeau, V. 2000. Circulation and mixing times for helical ribbon impellers. Review and Experiments. *Experiments in Fluids*, 28, 170-182.
- Eckert, E., Zambrowickz, A., Pokora, A., Setner, B., Dabrowska, A., Szoltysik, M., Szewczuk, Z., Polanowski, A., Trziszka, T & Chrzanowska, J. 2014. Egg-yolk protein by-product as a source of ACE-inhibitory peptides obtained with using unconventional proteinase from Asian Pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *Journal of Proteomics*, 110, 107-116.
- Farvin, K. H., Andersen, L., Otte, J., Nielsen, H., Jessen, F. & Jacobsen, C. 2016. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, 204, 409-419.

- Fernández, A. & Riera, F. 2013. Influence of ionic strength on peptide membrane fractionation. *Separation and Purification Technology*, 119, 129-135.
- Gennaro, A. R. 2003. *Remington Farmacia*. 20va edición. Argentina: editorial medica panamericana.
- Holder, A., Birke, A., Eisele, T., Klaiber, I., Fischer, L. & Hinrichs, J. 2013. Selective isolation of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides from micellar casein and β -casein hydrolysates via ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 31, 34-40.
- Huopalahti, R., López Fandño, R., Anton, M. & Schade, R. 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Berlín: Springer.
- Kim, K.J., Fane, A.G., Fell, C.J.D., Joy, D.C. 1992. Fouling mechanisms of membranes during protein ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 68, 79–91.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. & Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 1317-1327.
- Laca, A., Paredes, B. & Díaz, M. 2010. A method of egg yolk fractionation. Characterization of fractions. *Food Hydrocolloids*, 24, 434-443.
- Liu, J., Jin, Y., Lin, S., Jones, G. & Chen, F. 2015. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 175, 258-266.
- Luo, H., Wang, B., Li, Z., Chi, C., Zhang, Q. & He, G. 2013. Preparation and evaluation of antioxidant peptide from papain hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle protein. *LWT - Food Science and Technology*, 51, 281-288.
- Mahmoud, M. & Cordle, C. 2000. Protein hydrolysates as special nutritional ingredients. *Novel Macromolecules in Food Systems*, 41, 181-215.
- Manning, H., Chong, T., Carr, D. & Bird, M. 2016. Critical flux of gum arabic: Implications for fouling and fractionation performance of membranes. *Food and Bioprocess Processing*, 97, 41-47.
- Meléndez, A., Vicario, I. & Heredia, F. 2004. Estabilidad de los pigmentos carotenoides

en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54, 28-34.

Metsämuuronen, S., Howell, J. & Nyström, M. 2002. Critical flux in ultrafiltration of myoglobin and baker's yeast. *Journal of Membrane Science*, 196, 13-25.

Muinde, B., Zhao, L., Biao, Y., Ma, G., Yang, W., Pei, F. & Hu, Q. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. *Food Chemistry*, 230, 58-67.

Orue, C., Bouhallab, S. & Garem, A. 1998. Nanofiltration of amino acid and peptide solutions: mechanisms of separation. *Journal of Membrane Science* 142, 225-233.

Park, P., Jung, W., Nam, K., Shahidi, F. & Kim, S. 2001. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of Lecithin-Free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 651-656.

Prada Albarracín, V. 2018. *Desarrollo de un proceso para la extracción de grasa de la yema de huevo libre de lecitina*. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Qi, B., Luo, J., Chen, G., Chen, X. & Wan, Y. 2012. Application of ultrafiltration and nanofiltration for recycling cellulase and concentrating glucose from enzymatic hydrolyzate of steam exploded wheat straw. *Bioresource Technology*, 104, 466-472.

Quist, E., Phillips, R., Saalia, F. 2009. The effect of enzyme systems and processing on the hydrolysis of peanut (*Arachis hypogaea L.*) protein. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1717-1721.

Ranamukhaarachchi, S., Meissner, L. & Moresoli, C. 2013. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 429, 81-87.

Ríos, S. 2016. *Producción y caracterización parcial de hidrolizados de proteínas de yema de huevo libre de lecitina*. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Robinson, M. & Cleary, P. 2012. Flow and mixing performance in helical ribbon mixers. *Chemical Engineering Science*, 84, 382-398.

Rutherford, S. 2010. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC International*, 93, 1515-1522.

Sablani, S., Goosen, M., Al-Belushi, R. & Wilf, M. 2001. Concentration polarization in

ultrafiltration and reverse osmosis: a critical review. *Desalination*, 141, 269-289.

Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. & Amar, R. 2014. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, 65, 453-461.

Saidi, S., Deratani, A., Amar, R. & Belleville, M. 2013. Fractionation of a tuna dark muscle hydrolysate by a two-step membrane process. *Separation and Purification Technology*, 108, 28-36.

Sakanaka, S. & Tachibana, Y. 2006. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chemistry*, 95, 243-249.

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N. & Juneja, L. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86, 99-103.

Singh, N. & Cheryan, M. 1997. Fouling of a ceramic microfiltration membrane by corn starch hydrolysate. *Journal of Membrane Science*, 135, 195-202.

Salem, R., Bkhairia, I., Abdelhedi, O. & Nasri, M. 2017. *Octopus vulgaris* protein hydrolysates: characterization, antioxidant and functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1442-1454.

Soufi, E., Derouiniot, M., Amar, R., Jaouen, P. & Berge, J. 2016. Fractionation of cuttlefish protein hydrolysates by ultrafiltration: Impact on peptidic populations. *Comptes Rendus Chimie*, 20, 975-985.

Thamnarathip, P., Jangchud, K., Nitisinprasert, S. & Vardhanabhuti, B. 2016. Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity. *Journal of Cereal Science*, 69, 329-335.

Valencia, P., Pinto, M. & Almonacid, A. 2014. Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49, 258-264.

Van Reis, R., Brake, J., Charkoudian, J., Burns, D. & Zydney, A. 1999. High-performance tangential flow filtration using charged membranes. *Journal of Membrane Science*, 159(1-2), 133-142.

Van Reis, R. & Saksena, S. 1997. Optimization diagram for membrane separations.

Journal of Membrane Science, 129, 19-29.

Vandanjon, L., Grignon, M., Courois, E., Bourseau, P. & Jaouen, P. 2009. Fractionating white fish fillet hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 95, 36-44.

Wang, J., Zhao, M., Yang, X. & Jiang, Y. 2006. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*, 44, 93-100.

Wang, X., Zheng, X., Kopparapu, N., Cong, W., Deng, Y., Sun, X. & Liu, X. 2014. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate. *Process Biochemistry*, 49, 1562-1569.

Wiriyaphan, C., Xiao, H., Decker, E. & Yongsawatdigul, J. 2015. Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus spp.*) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. *Food Chemistry*, 167, 7-15.

Yee, K., Wiley, D. & Bao, J. A unified model of the time dependence of flux decline for the long-term ultrafiltration of whey. 2009. *Journal of Membrane Science*, 332, 69–80.

Zambrowicz, A., Pokora, M., Setner, B., Dabrowska, A., Szoltysik, M., Babij, K., Szewczuk, Z., Trziszka, T., Lubec, G. & Chrzanowska, J. 2015. Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization. *Amino acids*, 47, 369-380.

Zambrowicz, A., Pokora, M., Eckert, E., Szoltysik, M., Dabrowska, A., Chrzanowska, J. & Trziszka, T. 2012. Antioxidant and antimicrobial activity of lecithin free egg yolk protein preparation hydrolysates obtained with digestive enzymes. *Functional Foods in Health and Disease*, 2, 487-500.

Zhang, M., Mu, T. & Sun, M. 2014. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*, 7, 191-200.

Zhou, K., Canning, C. & Sun, S. 2013. Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation. *LWT-Food Science and Technology*, 50, 331-335.

Zhou, K., Sun, S. & Canning, C. 2012. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Food Chemistry*, 135, 1192-1997.



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Bioproducts Processing

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbp


Fractionation of hydrolysates from concentrated lecithin free egg yolk protein dispersions by ultrafiltration

A.L. Peñaranda-López^a, Edmundo Brito-de la Fuente^b, Beatriz Torrestiana-Sánchez^{a,*}

^a Tecnológico Nacional De México/IT-Veracruz, Av. M. A. De Quevedo # 2779, Veracruz, 91897, México

^b Product & Process Engineering Center, Global Pharmaceuticals, Pharmaceuticals Division, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Siemenstraße 27, D-61352 Bad Homburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2020

Received in revised form 16 June 2020

Accepted 1 July 2020

Available online 9 July 2020

Keywords:

Lecithin-free egg yolk hydrolysates

Ultrafiltration

Diafiltration

Sustainable flux

Functional properties

ABSTRACT

A membrane process for the recovery of $\geq 90\%$ of the soluble peptides (with antioxidant activity) found in concentrated lecithin-free egg yolk hydrolysates (LFEYH) was established. Hydrolysis of concentrated free lecithin egg yolk protein dispersions (10 and 20 %) was conducted with Alcalase 2.4L, an endoprotease from *Bacillus Licheniformis*. The obtained hydrolysates were fractionated by ultrafiltration (UF), where the effect of the membrane material and molecular weight cut-off (MWCO) was studied. Two flat sheet regenerated cellulose membranes and three tubular ceramic membranes with different MWCOs (50, 10 and 5 kDa) were tested. Different hydrodynamic operating conditions were established in all membranes to work under sustainable flux during UF. The 50 kDa ceramic membrane was found to be the most efficient in terms of flux (78.45 and $47.84 \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ for 10 and 20 % protein dispersions, respectively) and showed lower fouling. The use of diafiltration (DF), allowed recovering more than 90 % of soluble and heat-stable peptides, which also showed high antioxidant activity, from hydrolysates produced in both concentrated (10 and 20 %) egg yolk protein dispersions.

© 2020 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phospholipids are extracted from egg yolks and used in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. From this process, a by-product, free-lecithin egg yolk is generated. This by-product is a source of bioactive proteins, however, it has limited use due to its low functionality. One common method to add value to food proteins from by-products is the production of hydrolysates by enzymatic hydrolysis. This enzymatic reaction allowed obtaining biologically and functional active peptides from various food proteins (Eckert et al., 2014). In hydrolysates from free-lecithin egg yolk protein, peptides with antioxidant (Park et al., 2001; Sakanaka et al., 2004; Sakanaka

and Tachibana, 2006; Zambrowicz et al., 2012), antimicrobial (Zambrowicz et al., 2012) and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities (Eckert et al., 2014) were found.

Fractionation of lecithin-free egg yolk hydrolysates (LFEYH) peptides having different biological activities and functional properties (Park et al., 2001; Eckert et al., 2014) has been conducted by ultrafiltration. However, ultrafiltration was only used as a simple separation tool for analytical purposes, and the influence of operating parameters during the process was not considered. Otherwise, low protein concentrations have been usually employed (about 1%) during the UF and at industrial scale, dilute hydrolysates will lead to low productivity

* Corresponding author.

E-mail address: beatriz.ts@veracruz.tecnm.mx (B. Torrestiana-Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.001>

0960-3085/© 2020 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.